



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 358 339**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 11/12 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05823172 .1**

(96) Fecha de presentación : **15.11.2005**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1824886**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **29.08.2007**

(54) Título: **Anticuerpos monoclonales completamente humanos para IL-13.**

(30) Prioridad: **17.11.2004 US 629135 P**
19.10.2005 US 728604 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.05.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.05.2011

(73) Titular/es: **AMGEN Inc.**
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320-1799, US

(72) Inventor/es: **Foltz, Ian;**
Faggioni, Raffaella;
Senaldi, Giorgio;
Manchulenko, Kathy;
Kang, Jaspal S.;
Rathanaswami, Palaniswami;
Ahluwalia, Kiran;
Foord, Orit y
Klakamp, Scott

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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 monoclonales completamente humanos para IL-13 .

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención hace referencia a anticuerpos humanos que se unen específicamente a interleuquina-13 y pueden afectar a la actividad de IL-13, así como a los ácidos nucleicos que codifican tales anticuerpos, a las células anfitrionas transformadas con dicho ácido nucleico, a un método para elaborar los anticuerpos reivindicados, a un medicamento que contiene los anticuerpos reivindicados y al uso de los anticuerpos en el tratamiento de un trastorno relacionado con IL-13.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La interleuquina 13 (IL-13) es una citoquina que fue reconocida primero por sus efectos sobre las células B y los monocitos, donde regula al alza la expresión de clase II, promueve el cambio de clase IgE e inhibe la producción de citoquinas inflamatorias. El receptor de IL-13 comparte la cadena alfa del receptor de IL-4 con el receptor de IL-4. Como resultado, la IL-13 tiene muchas actividades biológicas similares a IL-4.

15

La IL-13 inhibe la liberación de citoquinas proinflamatorias y tiene actividad anti-inflamatoria *in vivo*. La IL-13 juega un papel en las respuestas alérgicas mediadas por IgE y es un mediador central del asma alérgica (Wills-Karp M., Curr. Opin. Pulm. Med., 2003; 9:21-27). En el pulmón regula la inflamación eosinofílica, la secreción de mucus, y la hipersensibilidad de las vías respiratorias. Además del asma, la IL-13 está implicada en la patogénesis de un gran número de enfermedades (Wynn TA. Annu. Rev. Immunol. 2003, 21:425-456).

20

La solicitud de Patente WO 03/0846451 describe el uso de un anticuerpo anti-IL-13 de ratón de rata monoclonal neutralizador en un modelo de asma aguda inducida por ovoalbúmina en ratones. El anticuerpo anti-IL-13 inhibe la hipersensibilidad de las vías respiratorias, la hiperplasia de las células caliciformes y la producción de mucus. Además, el tratamiento con el anticuerpo también inhibe la producción de IL-5, IL-6, eotaxina, KC, MIP-1 y MCP-1 en el pulmón.

25

30

COMPENDIO DE LA INVENCION

La invención es la propuesta en las reivindicaciones.

35

Los aspectos de la invención hacen referencia a anticuerpos y medicamentos para tratar trastornos relacionados con IL-13.

Los anticuerpos aislados pueden ser anticuerpos monoclonales o anticuerpos quiméricos y/o anticuerpos humanos o humanizados.

40

Una realización incluye moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente memoria.

45

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La invención se comprenderá mejor a partir de la Descripción Detallada y de los dibujos adjuntos, que están destinados a ilustrar y no a limitar la invención.

La **FIG.1** muestra una representación gráfica de la concentración de anticuerpo relativa frente a los datos de neutralización para cada pocillo. Los datos se utilizan para identificar pocillos con los anticuerpos de potencia más elevada.

50

La **FIG. 2** es una representación gráfica que representa la relación de un DO- ELISA de cada anticuerpo frente a la concentración de anticuerpo a un recubrimiento con antígeno de 31 ng/mL.

55

La **FIG. 3** es un gráfico que representa el porcentaje de inhibición de la liberación de eotaxina inducida por IL-13 por anticuerpos recombinantes 643 y 731 en comparación con un control de isotipo coincidente.

La **FIG. 4** es un diagrama de barras que compara la capacidad de IL-13 o IL-13Q110R par inhibir la unión de 731 o 623 a placas de ELISA recubiertas con IL-13.

60

La **FIG. 5A** es un diagrama de barras que compara la competición de receptores sobre la célula entre el anticuerpo 643 y un control de isotipo.

65

La **FIG. 5B** es un diagrama de barras que compara la competición de receptores sobre la célula entre el anticuerpo

731 y un control de isotipo.

La **FIG. 5C** es una viñeta que representa el protocolo y los diferentes resultados pronosticados a partir de la FIG. 5A y la FIG. 5E.

La **FIG. 5D** es una viñeta que representa el protocolo y los diferentes resultados pronosticados a partir de la FIG. 5B.

La **FIG. 5E** es un diagrama de barras que compara la competición de receptores sobre la célula entre el anticuerpo 623 y un control de isotipo.

La **FIG. 6A** muestra el alineamiento de un péptido derivado de la presentación en fagos reconocido por el anticuerpo 693 y parte de la secuencia de IL-13.

La **FIG. 6B** es un diagrama que muestra la estructura secundaria de IL-13 (SEQ ID NO: 72) e indica qué regiones de la IL-13 humana fueron remplazadas por IL-13 de ratón para la construcción de las proteínas quiméricas.

La **FIG. 7A** y la **FIG. 7B** son diagramas de barras que demuestran que las células T CD4⁺ de ratones inmunizados con IL-13 producen IL-13 humana pero no IL-13 murina.

La **FIG. 8** es un gráfico que demuestra que los anticuerpos anti-IL-13 731 y 623 inhiben la hipersensibilidad de las vías respiratorias.

La **FIG. 9** es un diagrama de barras que demuestra que 731 y 623 inhiben la producción de mucus.

La **FIG. 10** es una descripción de una secuencia de aminoácidos que pone de relieve un sitio de unión de mAb 623.

Las **FIG. 11A-D** son gráficos que representan el porcentaje de inhibición de liberación de eotaxina inducida por IL-13 o la variante IL-13Q110R por los anticuerpos recombinantes 623 y 731 en comparación con un control de isotipo coincidente.

Las **FIG. 12A** y **12B** son gráficos que demuestran la inhibición de la proliferación de la línea celular L-1236 (A) y HDLM-2 (B) por 623 y 731. Se añadieron mAb 623, mAb 731 o control de isotipo coincidente a la placa para concentraciones finales de 0,017 a 330 nM (titulado 1:3).

La **FIG. 13** es un gráfico que presenta el impacto de mAb 623 y 731 y hIL-13R α 2Fc sobre la expresión de CD23 en células B de sangre completa.

La **FIG. 14** es un gráfico que presenta la inhibición de la producción de mucus inducida por OVA por mAb 623 y mAb 731 en ratones humanizados para IL-13.

La **FIG. 15** es un gráfico que presenta un experimento en el cual el tratamiento con mAb 623 o 731 tuvo un pequeño efecto observable sobre el reclutamiento de leucocitos inducido por OVA en BALF.

La **FIG. 16** es un gráfico que presenta la inhibición de AHR inducida por OVA por 623 y 731 en ratones humanizados para IL-13 de una manera sensible a la dosificación.

La **FIG. 17** es un gráfico que presenta la inhibición de mucus inducida por OVA por 623 y 731 en ratones humanizados para IL-13 de una manera sensible a la dosificación.

La **FIG. 18** es un gráfico que presenta el efecto de 623 y 731 sobre la infiltración de leucocitos inducida por OVA en BALF de ratones humanizados para IL-13 de una manera sensible a la dosificación.

La **FIG. 19** es un gráfico que presenta una inhibición de la respuesta a la dosis de AHR inducida por HDM por 623 y 731

La **FIG. 20** es un gráfico que presenta una inhibición de la respuesta a la dosis de la producción de mucus inducida por HDM por 623 y 731 en ratones humanizados para IL-13.

La **FIG. 21** es un gráfico que presenta una inhibición de la respuesta a la dosis de 623 y 731 sobre la infiltración de leucocitos inducida por HDM en BALF de ratones humanizados para IL-13.

La **FIG. 22A** y **22B** son gráficos que presentan el efecto de la administración profiláctica y terapéutica de 623 sobre la AHR inducida por HDM y la infiltración de leucocitos en BALF de ratones humanizados para IL-13.

La **FIG. 23** es un gráfico que presenta los niveles de TARC en suero inducidos por OVA en ratones de tipo salvaje.

La **FIG. 24** es un gráfico que presenta los niveles de eotaxina en suero inducidos por OVA en ratones de tipo salvaje.

La **FIG. 25** es un gráfico que presenta los niveles de C10 en suero inducidos por OVA en ratones de tipo salvaje.

La **FIG. 26** es un gráfico que presenta la inhibición por el mAb 623 de los niveles de TARC en suero inducidos por OVA en ratones humanizados para IL-13.

La **FIG. 27** es un gráfico que presenta la inhibición por el mAb 623 de los niveles de eotaxina en suero inducidos por OVA en ratones humanizados para IL-13.

La **FIG. 28** es un gráfico que presenta el efecto del tratamiento con el mAb 623 sobre los niveles de C10 en suero inducidos por OVA en ratones humanizados para IL-13.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Algunas realizaciones de la invención hacen referencia a anticuerpos aislados que se unen a IL-13 y a métodos que utilizan esos anticuerpos para tratar enfermedades en seres humanos. Preferiblemente los anticuerpos son anticuerpos monoclonales totalmente humanos que se unen a IL-13 con una elevada afinidad, una elevada potencia, o ambas. En una realización, los anticuerpos, o los fragmentos de anticuerpos, se unen específicamente a regiones de la molécula de IL-13 que evitan la señalización a través del complejo con el receptor de IL-13. En una realización, los anticuerpos monoclonales totalmente humanos son neutralizadores de la actividad basada en IL-13.

En otra realización de la invención, los anticuerpos se unen a IL-13 a la vez que permiten que ésta se una a un receptor, distinto del receptor de IL-13 alfa 1. Por ejemplo, en una realización, el anticuerpo se une a IL-13 y permite que IL-13 se una a un receptor de reclamo conocido como receptor de IL-13 alfa 2. En este caso, el anticuerpo evita que IL-13 se una a su receptor de señalización, pero no al receptor de reclamo. Las realizaciones de la invención también incluyen células para producir estos anticuerpos.

Además, las realizaciones de la invención incluyen estos anticuerpos anti-IL-13 para el tratamiento de una enfermedad. Por ejemplo, los anticuerpos son útiles para tratar el asma, incluyendo tanto alérgica (atópica) como no alérgica (no atópica), el asma bronquial, la bronquitis crónica, el enfisema, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la fiebre del heno, la rinitis, la urticaria, el angioedema, la dermatitis alérgica, incluyendo la dermatitis de contacto, el síndrome de Stevens-Johnson, el choque anafiláctico, las alergias alimentarias, la queratitis, la conjuntivitis, el síndrome nefrítico resistente a esteroides, la mastocitosis, las enfermedades fibróticas tales como la fibrosis pulmonar, incluyendo la fibrosis pulmonar idiopática, la fibrosis quística, la fibrosis inducida por bleomicina, la fibrosis hepática y la esclerosis generalizada, los cánceres tales como la enfermedad de Hodgkin, los trastornos proliferativos de las células B tales como el linfoma de las células B, concretamente el linfoma de células B grandes de mediastino, las leucemias de células B, el carcinoma de ovario, las enfermedades caracterizadas por proliferación de células B no malignas tales como lupus eritematoso generalizado, artritis reumatoide, hepatitis activa crónica y crioglobulinemias, niveles elevados de auto-anticuerpos, tales como anemia hemolítica, trombocitopenia, síndrome fofolipídico y pénfigo, enfermedad inflamatoria del intestino y enfermedad de injerto versus anfitrión. En algunas realizaciones, el método de tratamiento comprende adicionalmente la verificación de la eficacia de la administración del anticuerpo siguiendo el nivel de un biomarcador, tal como eotaxina, TARC y/o C10.

Adicionalmente, los anticuerpos para IL-13 se han utilizado para influir en el papel de la interleuquina 13 (IL-13) como citoquina efectora, que juega un papel en la patogénesis del asma y otros trastornos. En animales, la administración directa de IL-13 induce asma, y el bloqueo de IL-13 inhibe el asma inducida por IL-13 o inducida por alergen. Como se muestra en la presente memoria, mAb 623 se une con una elevada afinidad a IL-13 ($K_D = 24$ pM) e IL-13R130Q ($K_D = 39$ pM), una variante de IL-13 común asociada con la alergia y el asma. Además, actualmente se ha demostrado que el mAb 623 evita que IL-13 se una a IL-13 α 1 e IL-13R α 2. In vitro, el mAb 623 inhibe la producción de eotaxina inducida por IL-13 por fibroblastos dérmicos humanos (HDF), y la regulación al alza de CD23 inducida por IL-13 en células B de sangre completa. Adicionalmente, mAb 623 también inhibe la proliferación celular de las células HDLM-2 y L-1236, dos líneas celulares derivadas de linfoma de Hodgkin que utilizan IL-13 como factor de crecimiento autocrino. De este modo, el anticuerpo parece tener una amplia variedad de características deseables referentes al tratamiento de trastornos relacionados con IL-13.

Adicionalmente, también se ha desarrollado y sometido a ensayo un modelo de ratón diseñado para examinar el asma. Como el mAb 623 no se une a IL-13 murina, se generaron ratones IL-13 KI/KO remplazando el primer exón del gen de la IL-13 murina por el ADNc que codifica la IL-13 humana, permitiendo de ese modo que la IL-13 humana sea expresada bajo el promotor de IL-13 murino y eliminando la expresión del gen IL-13 murino endógeno. Utilizando estos ratones para establecer un modelo de asma inducida por OVA, se demuestra en la presente memoria que la administración profiláctica de mAb 623 bloquea la hiper-reactividad de las vías respiratorias ("AHR" por sus siglas en Inglés) y suprime significativamente la hiperplasia con mucus. Además, en un modelo de asma inducida por ácaros del polvo doméstico, la administración profiláctica o terapéutica de mAb 623 inhibe la AHR, la hiperplasia con mucus y la infiltración eosinofílica en las vías respiratorias.

Adicionalmente, el mAb 623 también inhibe la elevación de los niveles en suero de TARC y eotaxina-1 inducida por OVA, demostrando que estos compuestos pueden ser útiles como biomarcadores. Adicionalmente, estos datos demuestran que mAb 623 y otros anticuerpos pueden neutralizar eficazmente la IL-13 *in vitro* e *in vivo*. Los anticuerpos descritos en la presente memoria, así como los creados a partir de los métodos descritos, también pueden ser utilizados y pueden mostrar propiedades similares. Los métodos para escrutar y verificar las propiedades concretas de los anticuerpos se proporcionan en la presente memoria.

Los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria, y sus fragmentos y variantes, pueden ser utilizados, a modo de ejemplo no limitante, (a) para dirigir la biosíntesis de las correspondientes proteínas, polipéptidos, fragmentos y variantes codificados en forma de productos génicos recombinantes o heterólogos, (b) como sondas para la detección y cuantificación de los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria, (c) como moldes de secuencia para preparar moléculas antisentido, y similares. Tales usos se describen más completamente más abajo.

Se describen los métodos de identificación de estos anticuerpos. En una realización, el método implica un análisis de liberación de eotaxina.

También se describen los anticuerpos que se unen a una variante de IL-13. Son especialmente relevantes aquellos anticuerpos que se unen a una variante de IL-13 con una Glutamina en la posición 110 del polipéptido de IL-13 endógeno.

Se describe un ratón que está alterado genéticamente para producir solamente IL-13 humana. Este ratón es útil para proporcionar un sujeto de ensayo para la hipersensibilidad de las vías respiratorias y la inhibición de la producción de mucus.

En algunos aspectos, los anticuerpos pueden ser utilizados para el tratamiento profiláctico o la prevención del asma o cualquiera de los trastornos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el anticuerpo puede ser utilizado para tratar profilácticamente cualquiera de las siguientes: enfermedades inflamatorias, cáncer, enfermedades fibróticas y enfermedades caracterizadas por una proliferación celular no maligna; enfermedades o trastornos inflamatorios tales como asma, incluyendo tanto alérgica (atópica) como no alérgica (no atópica), asma bronquial, bronquitis crónica, enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fiebre del heno, rinitis, urticaria, angioedema, dermatitis alérgica, incluyendo dermatitis de contacto, síndrome de Stevens-Johnson, choque anafiláctico, alergias alimentarias, queratitis, conjuntivitis, síndrome nefrítico resistente a esteroides, mastocitosis; enfermedades fibróticas tales como fibrosis pulmonar, incluyendo fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis quística, fibrosis inducida por bleomicina, fibrosis hepática y esclerosis generalizada. En realizaciones adicionales los anticuerpos anti-IL-13 se utilizan para tratar cánceres, tales como la enfermedad de Hodgkin, los trastornos proliferativos de las células B tales como el linfoma de células B, concretamente el linfoma de células B grandes del mediastino, las leucemias de células B, el carcinoma de ovario. El anticuerpo puede ser administrado antes o durante cualquier riesgo de enfermedad. En algunas realizaciones, el anticuerpo se administra en una sola dosis o en múltiples dosis. En algunas realizaciones, el anticuerpo se administra continuamente. En condiciones crónicas, el anticuerpo se puede administrar a dosis más grandes y/o continuamente. En condiciones agudas, el anticuerpo se puede administrar en una dosis única o pequeña, o relativamente poco frecuentemente.

Los métodos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para identificar biomarcadores para una enfermedad o eventos biológicos relacionados con o que tienen impacto sobre IL-13. Los biomarcadores se pueden seleccionar del grupo que consiste en: C10, TARC, eotaxina, y alguna combinación de los mismos. Se puede controlar el nivel de C10, TARC y/o eotaxina en un sujeto que se pueda beneficiar del control de un biomarcador referente a IL-13. Se puede administrar el anticuerpo a un paciente, p. ej., mAb 623, y después controlar el nivel del biomarcador para verificar la eficacia del anticuerpo. Después se puede ajustar la cantidad de anticuerpo administrado al paciente. Se contemplan moléculas que se unen a y detectan estos biomarcadores ("detectores de biomarcadores"), y su uso para detectar los biomarcadores, en relación con la determinación de la eficacia del tratamiento de un trastorno relacionado con IL-13. Por ejemplo, los anticuerpos para estos marcadores también son útiles para la detección de los biomarcadores.

Definiciones:

A menos que se defina de otro modo, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente invención tendrán todos los significados comúnmente comprendidos por los expertos en la técnica. Adicionalmente, a menos que lo requiera el contexto, los términos en singular incluirán las pluralidades y los términos en plural incluirán el singular.

Generalmente, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y las técnicas de, cultivo celular y tisular, la biología molecular, y la química de proteínas y oligo- o poli-nucleótidos y la hibridación descritas en la presente memoria son aquellas bien conocidas y utilizadas comúnmente en la técnica, como se describe en diferentes referencias generales y más específicas tales como las citadas y comentadas a lo largo de toda la presente memoria. Véase, p. ej., Singleton et al., *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology* 2^a ed., J. Wiley and Sons (Nueva York, NY

1994); Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Se utilizan técnicas convencionales para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, y cultivo de tejidos y transformación (p. ej., electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se lleva a cabo comúnmente en la técnica o como se describe en la presente memoria. Las técnicas convencionales también se utilizan para las síntesis químicas, los análisis químicos, la preparación, formulación, y liberación de fármacos, y el tratamiento de pacientes.

Según se utiliza de acuerdo con la presente descripción, se deberá entender que los siguientes términos, a menos que se indique de otro modo, tienen los siguientes significados.

"Reacción en cadena de la polimerasa" o "PCR" hace referencia a un procedimiento o técnica en la cual cantidades diminutas de una porción específica de ácido nucleico, ARN y/o ADN, se amplifican como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.683.195 presentada el 28 de Julio de 1987. Generalmente, no es necesario que la información de la secuencia de los extremos de la región de interés o más allá esté disponible, de manera que se puedan diseñar los cebadores oligonucleotídicos; estos cebadores tendrán secuencias idénticas o similares a las hebras opuestas del molde que se va a amplificar. Los nucleótidos 5' terminales de los dos cebadores pueden coincidir con los extremos del material amplificado. Se puede utilizar la PCR para amplificar secuencias de ARN específicas, secuencias de ADN específicas del ADN genómico total, y ADNc transcrito a partir del ARN celular total, secuencias de bacteriófagos o plásmidos, etc. Véase generalmente, Mullis et al., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:263 (1987); Erlich, ed., *PCR Technology* (Stockton Pres, N.Y. 1989). Según se utiliza en la presente memoria, se considera que la PCR es un ejemplo, pero no el único, de un método de reacción de la polimerasa de ácido nucleico para amplificar una muestra de ensayo de ácido nucleico que comprende el uso de un ácido nucleico conocido como cebador y una polimerasa de ácido nucleico para amplificar o generar una porción específica de ácido nucleico.

Los "anticuerpos" (Ab) e "inmunoglobulinas" (Ig) son glicoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Mientras los anticuerpos muestran especificidad de unión para un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas de tipo anticuerpo que carecen de especificidad antigénica. Los polipéptidos de esta última clase son producidos, por ejemplo, a bajos niveles por el sistema linfático y a niveles incrementados por los mielomas.

Los "anticuerpos e inmunoglobulinas nativos" son normalmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está conectada a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras el número de conexiones disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y cadena ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de numerosos dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácido concretos forman una interfaz entre los dominios variables de las cadenas ligera y pesada (Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 186:651 (1985); Novotny y Harber, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:4592 (1985); Chothia et al., *Nature* 342:877-883 (1989)).

En la presente memoria el término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y abarca específicamente los anticuerpos monoclonales intactos, los anticuerpos policlonales, los anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos bi-específicos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos incluyendo Fab y F(ab')₂, con tal que muestren la actividad biológica deseada. Las "cadenas ligeras" de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado pueden ser asignadas a uno de dos tipos claramente distintos, denominados κ y λ , basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Los fragmentos de unión se producen mediante técnicas de ADN recombinante, o mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, y anticuerpos de cadena sencilla, como se describe con mayor detalle más abajo. Se entiende que un anticuerpo distinto de un anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional" tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos.

Los anticuerpos preferidos son neutralizadores e inhiben la unión de IL-13 a un receptor de señalización, tal como el receptor alfa-1 de IL-13 (IL-13R α 1) al menos aproximadamente en un 20%, 40%, 60% u 80%, y más normalmente más de aproximadamente 85% (medido en un análisis de unión competitiva *in vitro*). Los anticuerpos pueden inhibir la unión a un receptor IL-13R α 2 de reclamo, mientras en otras realizaciones se mantiene la capacidad de IL-13 para unirse a IL-13R α 2 después de la unión del anticuerpo a IL-13.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, se pueden asignar anticuerpos intactos a diferentes "clases". Existen cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y algunas de estas se pueden dividir en "subclases" (isotipos), p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2. Los dominios constantes de las cadenas pesadas que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se

denominan α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

El término "anticuerpo monoclonal" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos esencialmente homogénea, esto es, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante del antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos ya que pueden ser sintetizados sin contaminación por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que está siendo obtenido de una población esencialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe considerar que se requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a utilizar de acuerdo con la presente invención pueden ser elaborados mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), o se pueden elaborar mediante métodos de ADN recombinante (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden ser aislados de genotecas de anticuerpos en fagos utilizando los mecanismos descritos por Clackson et al., en *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Un anticuerpo "aislado" es aquél que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de un entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían en los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo será purificado (1) en más del 95% en peso del anticuerpo determinado mediante el método de Lowry, y la secuencia de aminoácidos terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria, o (2) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes puesto que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, no obstante, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Un "anticuerpo neutralizador" es una molécula de anticuerpo que es capaz de eliminar o reducir significativamente una función efectora de un antígeno diana al cual se une. Por consiguiente, un anticuerpo "neutralizador" de IL-13 es capaz de eliminar o reducir significativamente una función efectora, tal como la actividad de señalización de IL-13 a través del receptor de IL-13. En una realización, el anticuerpo neutralizador reducirá la función efectora en 1-10, 10-20, 20-30, 30-50, 50-70, 70-80, 80-90, 90-95, 95-99, 99-100%.

"Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" y "ADCC" hacen referencia a una reacción mediada por células en la cual células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc de Ig (FcR) (p. ej., células Asesinas Naturales (NK), neutrófilos, y macrófagos) reconocen anticuerpos unidos sobre una célula diana y con posterioridad ocasionan la lisis de la célula diana. Las células primarias para mediar la ADCC, las células NK, expresan solamente Fc γ RIII, mientras los monocitos expresan Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. La expresión de los FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un análisis ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.500.362, o 5.821.337. Las células efectoras útiles para tales análisis incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células Asesinas Naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede ser evaluada *in vivo*, p. ej., en un modelo animal tal como el descrito por Clynes et al., en *PNAS (USA)* 95:652-656 (1988).

El término "variable" hace referencia al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren mucho en la secuencia entre los anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo concreto a su antígeno concreto. No obstante, la variabilidad no está uniformemente distribuida a lo largo de todos los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o regiones hipervariables en los dominios variables tanto de la cadena ligera como la cadena pesada de la Ig. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan marco (FR). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, adoptando en gran parte una configuración en lámina β , conectada por tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte, de la estructura en lámina β . Las CDR de cada cadena están sujetas entre sí en íntima proximidad por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et al., 1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran diferentes funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

La digestión de los anticuerpos con la enzima papaína, da como resultado dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, conocidos como fragmentos "Fab", y un fragmento "Fc", que no tiene actividad de unión al antígeno pero tiene la capacidad de cristalizar. La digestión de anticuerpos con la enzima pepsina, da como resultado un fragmento

F(ab')₂ en el que los dos brazos de la molécula de anticuerpo permanecen conectados y comprenden dos sitios de unión al antígeno. El fragmento F(ab')₂ tiene la capacidad de entrecruzarse con el antígeno.

5 Cuando se utiliza "Fv" en la presente memoria hace referencia al fragmento mínimo de un anticuerpo que conserva los sitios tanto de reconocimiento del antígeno como de unión al antígeno.

Cuando se utiliza "Fab" en la presente memoria hace referencia a un fragmento de un anticuerpo que comprende el dominio constante de la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada.

10 "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y unión al antígeno completo. En una especie de Fv de dos cadenas, esta región consiste en un dímero de un dominio variable de una cadena pesada y una ligera en íntima asociación no covalente. En una especie de Fv de una sola cadena, un dominio variable de una cadena pesada y una cadena ligera se pueden conectar covalentemente por medio de un conector peptídico flexible de manera que las cadenas ligera y pesada se pueden asociar en una estructura "dimérica" análoga a la de la especie de Fv de dos cadenas. Es en esta configuración en la que las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión al antígeno sobre la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis CDR confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. No obstante, incluso un único dominio variable (de medio Fc que comprende solamente tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a un antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

20 El término "región hipervariable" cuando se utiliza en la presente memoria hace referencia a los residuos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende generalmente residuos de aminoácido de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (p. ej., los residuos 24-34 (L1), 50-62 (L2), y 89-97 (L3) del dominio variable de la cadena ligera y 31-55 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) del dominio variable de la cadena pesada, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable" (p. ej., residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) del dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) del dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Los residuos de la "Región Marco" o "FR" son aquellos residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable según se define en la presente memoria.

35 El término "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR" cuando se utiliza en la presente memoria hace referencia a porciones de receptores inmunológicos que contactan con un ligando específico y determinan su especificidad. Las CDR de los receptores inmunológicos son la porción más variable de la proteína receptora, proporcionando a los receptores su diversidad, y se encuentran sobres seis bucles en el extremo distal de los dominios variables del receptor, procediendo tres bucles de cada uno de los dos dominios variables del receptor.

40 El término "epítipo" se utiliza para hacer referencia a sitios de unión para anticuerpos sobre antígenos proteicos. Los determinantes epitópicos consisten normalmente en agrupamientos químicamente activos de moléculas tales como cadenas laterales de aminoácidos o azúcares y normalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Se dice que un anticuerpo se une a un antígeno cuando la constante de disociación es $\leq 1 \mu\text{M}$, preferiblemente $\leq 100 \text{ nM}$ y muy preferiblemente $\leq 10 \text{ nM}$. Una constante de equilibrio ("K_D") incrementada o mayor significa que hay menos afinidad entre el epítipo y el anticuerpo. En otras palabras, que el anticuerpo y el epítipo son menos propensos a unirse o permanecer unidos. Una constante de equilibrio disminuida o menor significa que hay una afinidad mayor entre el epítipo y el anticuerpo. En otras palabras, es más probable que el anticuerpo y el epítipo se unan o permanezcan unidos. Un anticuerpo con una K_D de "no más de" una cierta cantidad significa que el anticuerpo se unirá al epítipo con la K_D dada, o más fuertemente (o íntimamente). En algunas realizaciones, el anticuerpo se une con una K_D de no más de 200 μM , por ejemplo, 200-180, 180-170, 170-160, 160-150, 150-140, 140-130, 130-120, 120-100, 100-80, 80-60, 60-50, 50-40, 40-30, 30-20, 20-10, 10-1, 1-0,1 pM o menos.

50 Si bien la K_D describe las características de unión de un epítipo y un anticuerpo, la "potencia" describe la eficacia del propio anticuerpo para una función del anticuerpo. Una K_D relativamente baja no significa automáticamente una elevada potencia. De este modo, los anticuerpos pueden tener una K_D relativamente baja y una elevada potencia (p. ej., se unen bien y alteran la función fuertemente), una K_D relativamente elevada y una elevada potencia (p. ej., no se unen bien pero tienen un fuerte impacto sobre la función), una K_D relativamente baja y una baja potencia (p. ej., se unen bien, pero no de una manera eficaz para alterar una función concreta) o una K_D relativamente elevada y una baja potencia (p. ej., simplemente no se une bien a la diana). En una realización, la potencia elevada representa que hay un elevado nivel de inhibición con una baja concentración de anticuerpo. En una realización, un anticuerpo es potente o tiene una elevada potencia cuando su CI₅₀ tiene un valor pequeño, por ejemplo, 130-110, 110-90, 90-60, 60-30, 30-25, 25-20, 20-15, o menos pM.

65 "Esencialmente", a menos que se especifique de otro modo junto con otro término, significa que el valor puede variar dentro de cualquier cantidad que contribuya a errores en la medida que se puede producir durante la creación o práctica de las realizaciones. "Significativo" significa que el valor puede variar con tal que sea suficiente para permitir que la invención reivindicada funcione para su uso pretendido.

El término "unión selectiva" en referencia a un anticuerpo no significa que el anticuerpo se une solamente a una única sustancia. En lugar de eso, indica que la K_D del anticuerpo para una primera sustancia es menor que la K_D del anticuerpo para una segunda sustancia. Los anticuerpos que se unen exclusivamente a un epítipo solamente se unen a ese único epítipo.

El término "aminoácido" o "residuo de aminoácido", según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a L-aminoácidos o D-aminoácidos de origen natural como se describe adicionalmente más abajo con respecto a las variantes. Las abreviaturas de una y tres letras utilizadas comúnmente para los aminoácidos se utilizan en la presente memoria (Bruce Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing, Inc., Nueva York (3ª ed. 1994)).

El término "y/o" indica 1) que incluye todas las opciones relevantes, 2) que incluye solamente una (o un subgrupo) de numerosas opciones alternativas, 3) que incluye ambas descripciones anteriores (1) o (2)), y 4) que incluye solamente una de las descripciones anteriores (1) o (2)).

El término "mAb" hace referencia a un anticuerpo monoclonal.

El término "XENOMOUSE[®]" hace referencia a cepas de ratones que han sido diseñadas para que contengan fragmentos con configuración de la línea germinal con un tamaño de 245 kb y 190 kb del locus de la cadena pesada y el locus de la cadena ligera kappa humana, como describen Green et al. *Nature Genetics* 7:13-21 (1994). Las cepas XENOMOUSE[®] son asequibles de Abgenix, Inc. (Fremont, CA).

El término "XENOMAX[®]" hace referencia al uso del "Método de Anticuerpos Seleccionados de Linfocitos" (Babcock et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:7842-7848 (1996)), cuando se utiliza con animales XENOMOUSE[®].

El término "SLAM[®]" hace referencia al "Método de Anticuerpos Seleccionados de Linfocitos" (Babcock et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:7843-7848 (1996), y Schrader, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.627.052).

Los términos "enfermedad", "estado de enfermedad" y "trastorno" hacen referencia a un estado fisiológico de una célula o de un mamífero completo en el cual se ha producido una interrupción, un cese, o un trastorno de funciones, sistemas, u órganos celulares o corporales.

El término "síntoma" representa cualquier manifestación física u observable de un trastorno, sea característico generalmente de ese trastorno o no. El término "síntomas" puede representar todas estas manifestaciones o cualquier subgrupo de las mismas.

El término "tratar" o "tratamiento" hace referencia tanto a un tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, donde el objeto es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico no deseado, tal como el desarrollo o la propagación del cáncer o el asma. "Tratamiento profiláctico" incluye los casos en los que un tratamiento disminuye la probabilidad de que un sujeto se ponga enfermo o aumente la cantidad de tiempo requerida para que el sujeto se ponga enfermo o manifieste síntomas o estados asociados con el trastorno. Para los fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no están limitados a, alivio de los síntomas, disminución del grado de la enfermedad, la estabilización (esto es, el no empeoramiento) del estado de enfermedad, el retraso o ralentización del progreso de la enfermedad, el alivio o paliación del estado de enfermedad, y la remisión (parcial o total), detectable o no detectable. "Tratamiento" también puede representar la prolongación de la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Los que necesitan tratamiento incluyen los que ya tienen la afección o trastorno así como los propensos a tener la afección o trastorno o en los que se debe prevenir la afección o trastorno. El término "inhibir", cuando se utiliza junto con una enfermedad o síntoma puede representar que el anticuerpo puede reducir o eliminar el estado o síntoma. No es necesario que el tratamiento profiláctico evite completamente la enfermedad o los síntomas. En algunas realizaciones, retrasa el comienzo de la enfermedad. En otras realizaciones, reduce la intensidad de la enfermedad o los síntomas. En algunas realizaciones, la reducción puede ser en cualquier cantidad, por ejemplo, una reducción del 1-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-95, 95-99, 99-100%. El término tratamiento puede incluir también cantidades similares de mejora o recuperación.

El término "paciente" incluye sujetos humanos y veterinarios.

"Administrar", para los fines del tratamiento, significa suministrar a un paciente. Por ejemplo, y sin limitación, semejante suministro puede ser intravenoso, intraperitoneal, por inhalación, intramuscular, subcutáneo, oral, tópico, transdérmico, o quirúrgico.

"Cantidad terapéuticamente eficaz", para los fines del tratamiento, significa una cantidad tal que podría producir a partir de su administración, ya sea sola o combinada con otro tratamiento, un cambio observable en el estado y/o los síntomas del paciente. Como se comenta en la presente memoria, y como apreciará un experto en la técnica, existen una variedad de modos en los que se puede determinar una cantidad eficaz. Por ejemplo, una cantidad

eficaz puede ser la cantidad requerida para reducir la cantidad de un biomarcador en cualquier cantidad significativa, incluyendo, por ejemplo, un 0-1, 1-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-95, 95-99, 99-100% de reducción en el biomarcador. Alternativamente, la cantidad puede ser una cantidad requerida para reducir un porcentaje similar de la cantidad de IL-13 presente en un sujeto.

Un "trastorno relacionado con IL-13" es cualquier enfermedad, trastorno, o cualquier término similar en el cual IL-13 regula o influye en la enfermedad, incluyendo opcionalmente los síntomas de la enfermedad. Los ejemplos incluyen enfermedades inflamatorias, cáncer, enfermedades fibróticas, enfermedades caracterizadas por una proliferación de células no malignas, asma, incluyendo tanto alérgica (atópica) como no alérgica (no-atópica), asma bronquial, bronquitis crónica, enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fiebre del heno, rinitis, urticaria, angioedema, dermatitis alérgica, incluyendo dermatitis de contacto, síndrome de Stevens-Johnson, choque anafiláctico, alergias alimentarias, queratitis, conjuntivitis, síndrome nefrítico resistente a esteroides, mastocitosis, enfermedades fibróticas tales como la fibrosis pulmonar, incluyendo la fibrosis pulmonar idiopática, la fibrosis quística, la fibrosis inducida por bleomicina, la fibrosis hepática y la esclerosis generalizada, cánceres, tales como la enfermedad de Hodgkins, los trastornos proliferativos de las células B tales como el linfoma de células B, concretamente el linfoma de células B grandes del mediastino, las leucemias de células B, el carcinoma de ovario, las enfermedades caracterizadas por la proliferación de células B no malignas tales como el lupus eritematoso generalizado, la artritis reumatoide, la hepatitis activa crónica y las crioglobulinemias; enfermedades caracterizadas por elevados niveles de auto-anticuerpos, tales como la anemia hemolítica, la trombocitopenia, el síndrome fosfolipídico y el pénfigo; enfermedad inflamatoria del intestino; y enfermedad de injerto versus anfitrión. En algunas realizaciones, un "trastorno dependiente del ligando de IL-13" es cualquiera de las anteriores que puede estar influenciada directamente por la unión de un anticuerpo a IL-13. En otras palabras, el trastorno es directamente el resultado de cantidades excesivas de IL-13. En algunas realizaciones, un trastorno tratable con un anticuerpo para IL-13 es cualquiera de los anteriores que puede ser tratado eficazmente mediante la adición de uno de los anticuerpos descritos actualmente. La alteración de la "actividad relacionada con IL-13" puede incluir tratar cualquiera de los trastornos anteriores con un anticuerpo; también puede incluir otros usos no terapéuticos o profilácticos del anticuerpo que pueden alterar la actividad de IL-13. En algunas realizaciones, el "trastorno relacionado con IL-13" puede incluir cualquier trastorno en el que se encuentra presente en el paciente un nivel elevado de IL-13. En algunas realizaciones, el "trastorno relacionado con IL-13" puede incluir cualquier trastorno que tenga un fenotipo que sea característico de IL-13. Los fenotipos que son característicos de un paciente con un trastorno relacionado con IL-13 pueden ser determinados y observados administrando una cantidad de IL-13 a un paciente para inducir diferentes fenotipos. La cantidad de IL-13 administrada puede variar y puede ser determinada rutinariamente por un experto en la técnica. En algunas realizaciones, un trastorno relacionado con IL-13 es aquél que es un trastorno mediado o relacionado con una citoquina TH2.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "biomarcador" puede incluir cualquier molécula que pueda rastrear o seguir el nivel de actividad relacionado con IL-13 o su concentración en una muestra. Los ejemplos de biomarcadores de IL-13 incluyen C10, TARC, y eotaxina. Un "detector biomarcador es cualquier biomolécula o técnica, que permita determinar la cantidad, y en algunas realizaciones, el cambio en la cantidad, del biomarcador en una muestra. Por ejemplo, los anticuerpos para el biomarcador, los ligandos o receptores para el biomarcador, los diferentes péptidos pequeños que se unen al receptor podrían ser incluidos todos como tipos de detectores biomarcadores.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable", para los fines del tratamiento, es una realización física que puede ser administrada a un paciente. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser, pero no están limitados a, píldoras, cápsulas, cápsulas oblongas, comprimidos, fluidos administrados oralmente, fluidos inyectables, pulverizaciones, aerosoles, grageas, neutraceuticos, cremas, lociones, aceites, soluciones, pastas, polvos, vapores, o líquidos. Un ejemplo de un vehículo farmacéuticamente aceptable es una solución isotónica tamponada, tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS).

"Neutralizar", para los fines de tratamiento, significa suprimir parcialmente o completamente la actividad química y/o biológica.

"Regular a la baja", para los fines de tratamiento, significa disminuir el nivel de una composición diana concreta.

"Mamífero" para los fines de tratamiento hace referencia a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deporte, o mascotas, tales como monos, perros, caballos, gatos, vacas, etc.

El término "polinucleótido" según se refiere en la presente memoria representa una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de ADN de hebra sencilla y doble.

El término "polinucleótido aislado" según se utiliza en la presente memoria representará un polinucleótido de origen genómico, ADNc o sintético o alguna de sus combinaciones, cuyo "polinucleótido aislado", en virtud de su origen, (1) no está asociado con todo o una porción de un polinucleótido en el cual el "polinucleótido aislado" se encuentra en la

naturaleza, (2) está conectado operablemente con un polinucleótido al que no está conectado en la naturaleza, o (3) no existe en la naturaleza como parte de una secuencia mayor.

El término "oligonucleótido" referido en la presente memoria incluye nucleótidos de origen natural y modificados unidos por conexiones oligonucleotídicas de origen natural y no natural. Los oligonucleótidos son un subgrupo de polinucleótidos que comprenden generalmente una longitud de 200 bases o menos. Preferiblemente, los oligonucleótidos tienen de 10 a 60 bases de longitud y muy preferiblemente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 a 40 bases de longitud. Los oligonucleótidos son normalmente de hebra sencilla, p. ej., para sondas; aunque los oligonucleótidos pueden ser de doble hebra, p. ej., para su uso en la construcción de un gen mutante. Los oligonucleótidos pueden ser oligonucleótidos efectores o antisentido.

El término "nucleótido de origen natural" según se utiliza en la presente memoria incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. El término "nucleótidos modificados" referido en la presente memoria incluye nucleótidos con grupos azúcar modificados o sustituidos y similares. El término "conexiones oligonucleotídicas" referido en la presente memoria incluye conexiones oligonucleotídicas tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato, fosforoanilidato, fosforamidato, y similares. Véase, p. ej., LaPlanche et al. *Nucl. Acids. Res.* 14:9081 (1986); Stec et al. *J. Am. Chem. Soc.* 106:6077 (1984); Stein et al. *Nucl. Acids Res.* 16:3209 (1988); Zon et al. *Anti-Cancer Drug Design* 6:539 (1991); Zon et al. *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, págs. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec et al. Patente de los Estados Unidos Núm. 5.151.510; Uhlmann y Peyman *Chemical Reviews* 90:543 (1990). Un oligonucleótido puede incluir una marca para la detección, si se desea.

El término "hibrida selectivamente" referido en la presente memoria significa unido detectablemente y específicamente. Los polinucleótidos, oligonucleótidos y sus fragmentos hibridan selectivamente con hebras de ácido nucleico en condiciones de hibridación y lavado que minimizan cantidades apreciables de unión detectable a ácidos nucleicos no específicos. Se pueden utilizar condiciones de alta restricción para lograr condiciones de hibridación selectivas como se sabe en la técnica y se comenta en la presente memoria. Generalmente, la homología de la secuencia de ácido nucleico entre los polinucleótidos, oligonucleótidos, o fragmentos de anticuerpo y una secuencia de ácido nucleico de interés será de al menos 80%, y más típicamente con homologías preferiblemente crecientes de al menos 85%, 90%, 95%, 99%, y 100%.

El término "secuencia de control" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para llevar a cabo la expresión y procesamiento de secuencias codificantes a las cuales están conectadas. La naturaleza de tales secuencias de control difiere dependiendo del organismo anfitrión; en procariotas, tales secuencias de control incluyen generalmente promotor, sitio de unión al ribosoma, y secuencia de terminación de la transcripción; en eucariotas, generalmente, tales secuencias de control incluyen promotores y secuencia de terminación de la transcripción. Se pretende que el término "secuencias de control" incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias compañeras de fusión.

El término "conectado operablemente" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a posiciones de componentes así descritos que están en una relación que les permite funcionar de la manera pretendida. Por ejemplo, una secuencia de control "conectada operablemente" a una secuencia codificante está conectada de tal manera que se logra la expresión de la secuencia codificante en condiciones compatibles con las secuencias de control.

El término "proteína aislada" referido en la presente memoria representa una proteína con un origen de ADNc, ARN recombinante, o sintético o alguna de sus combinaciones, que en virtud de su origen, o fuente de derivación, la "proteína aislada" (1) no está asociada con proteínas encontradas en la naturaleza, (2) está libre de otras proteínas de la misma fuente, p. ej., libre de proteínas murinas, (3) es expresada por una célula de una especie diferente, o (4) no existe en la naturaleza.

El término "polipéptido" se utiliza en la presente memoria como un término genérico para hacer referencia a proteínas nativas, fragmentos, o análogos de una secuencia de polipéptidos. Por tanto, la proteína nativa, los fragmentos, y los análogos son especies del género del polipéptido. Los polipéptidos preferidos de acuerdo con la invención comprenden las moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada humanas representadas por los SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 50, 54, 58, y 81-88, por ejemplo, y las moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera kappa humanas representadas por los SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, y 89-94, por ejemplo, así como moléculas de anticuerpo formadas por combinaciones que comprenden las moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada con moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera, tales como las moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera kappa, y viceversa, así como sus fragmentos y análogos. En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene una secuencia CDR1, CDR2, CDR3, FR1, FR2, FR3, y/o FR4 de la cadena pesada o cualquiera de las secuencias enumeradas en la Tabla 18. En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene una secuencia CDR1, CDR2, CDR3, FR1, FR2, FR3, y/o J de la cadena ligera o cualquiera de las secuencias enumeradas en las tablas 19 y 20.

A menos que se especifique de otro modo, el extremo izquierdo de las secuencias de polinucleótidos de hebra sencilla es el extremo 5'; la dirección izquierda de las secuencias de polinucleótidos de doble hebra es referida como la dirección 5'. La dirección de la adición 5' a 3' de los transcritos de ARN nacientes es referida como la dirección de transcripción; las regiones de secuencia de la hebra de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están 5' con respecto al extremo 5' del transcrito de ARN son referidas como "secuencias aguas arriba"; las regiones de secuencia de la hebra de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están 3' con respecto al extremo 3' del transcrito de ARN son referidas como "secuencias aguas abajo".

Según se utiliza en la presente memoria, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase *Immunology – A Synthesis* (2ª Edición, E.S. Golub y D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)). Los esteroisómeros (p. ej., D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tales como los aminoácidos alfa,alfa-disustituidos, los N-alquilaminoácidos, el ácido láctico, y otros aminoácidos convencionales también pueden ser componentes adecuados para los polipéptidos de la presente invención. Los ejemplos de los aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetil-lisina, ϵ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmietionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ -N-metilarginina, y otros aminoácidos e iminoácidos similares (p. ej., 4-hidroxiprolina). En la notación polipeptídica utilizada en la presente memoria, la dirección izquierda es la dirección amino terminal y la dirección derecha es la dirección carboxi terminal, de acuerdo con el uso normalizado y la convención.

El término "corresponde a" se utiliza en la presente memoria para significar que una secuencia de polinucleótidos es homóloga (esto es, es idéntica, no estrictamente relacionada evolutivamente) a toda o a una porción de una secuencia de polinucleótidos de referencia, o que una secuencia de polipéptidos es idéntica a una secuencia de polipéptidos de referencia.

Por el contrario, el término "complementario a" se utiliza en la presente memoria para representar que la secuencia complementaria es homóloga a toda o a una porción de una secuencia de polinucleótidos de referencia. Como ilustración, la secuencia de nucleótidos "TATAC" corresponde a una secuencia de referencia "TATAC" y es complementaria a una secuencia de referencia "GTATA".

Los siguientes términos están entre los utilizados para describir las relaciones de secuencia entre dos o más secuencias de polinucleótidos o aminoácidos: "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia", "identidad sustancial", y homología. Una "secuencia de referencia" es una secuencia definida utilizada como base para una comparación de secuencias. Una secuencia de referencia puede ser un subgrupo de una secuencia más grande, por ejemplo, en forma de un segmento de una secuencia de ADNc o génica completa dada en un listado de secuencias o puede comprender una secuencia de ADNc o génica completa. Generalmente, una secuencia de referencia tiene al menos 18 nucleótidos o 6 aminoácidos de longitud, frecuentemente al menos 24 nucleótidos u 8 aminoácidos de longitud, y a menudo al menos 48 nucleótidos o 16 aminoácidos de longitud. Puesto que dos secuencias de polinucleótidos o aminoácidos pueden (1) comprender cada una una secuencia (esto es, una porción de la secuencia de polinucleótidos o de aminoácidos completa) que es similar entre las dos moléculas, y (2) cada una puede comprender adicionalmente una secuencia que es divergente entre las dos secuencias de polinucleótidos o aminoácidos, las comparaciones de secuencia entre dos (o más) moléculas se realizan típicamente comparando las secuencias de las dos moléculas a lo largo de una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia.

Una "ventana de comparación", según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un segmento conceptual de al menos aproximadamente 18 posiciones de nucleótidos contiguos o aproximadamente 6 aminoácidos donde la secuencia de polinucleótidos o la secuencia de aminoácidos se comparan con una secuencia de referencia de al menos 18 nucleótidos contiguos o 6 aminoácidos y donde la porción de la secuencia de polinucleótidos de la ventana de comparación puede incluir adiciones, deleciones, sustituciones, y similares (esto es, espacios) del 20 por ciento o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones ni deleciones) para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. El alineamiento óptimo de secuencias para alinear una ventana de comparación se puede llevar a cabo mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman y Wunsch *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A)* 85:2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (paquetes de soporte lógico GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0 (Genetics Computer Group, 575 Science Dr. Madison, Wis.), GENEWORKS®, o MACVECTOR®, o mediante inspección, y se selecciona el mejor alineamiento (esto es, dando como resultado el porcentaje más elevado de homología a lo largo de la ventana de comparación) generado mediante los diferentes métodos.

El término "identidad de secuencia" significa que dos secuencias de polinucleótidos o aminoácidos son idénticas (esto es, nucleótido por nucleótido o residuo por residuo) a lo largo de la ventana de comparación. El término "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias alineadas óptimamente a lo largo de la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las cuales la base de ácidos nucleicos idénticos (p. ej., A, T, C, G, U, o I) o el residuo de aminoácidos existe en ambas secuencias para dar el número de

posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas por el número total de posiciones de la ventana de comparación (esto es, el tamaño de la ventana), y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de la secuencia. El término "identidad sustancial" según se utiliza en la presente memoria indica una característica de una secuencia de polinucleótidos o aminoácidos, donde el polinucleótido o aminoácido comprende una secuencia que tiene un porcentaje de identidad de secuencia de al menos 85 por ciento, preferiblemente un porcentaje de identidad de secuencia de al menos 90 a 95 por ciento, más preferiblemente un porcentaje de identidad de secuencia de al menos 99 por ciento, en comparación con una secuencia de referencia a lo largo de una ventana de comparación de al menos 18 posiciones de nucleótidos (6 aminoácidos), frecuentemente a lo largo de una ventana de al menos 24-48 posiciones de nucleótidos (8-16 aminoácidos), donde el porcentaje de identidad de la secuencia se calcula comparando la secuencia de referencia con la secuencia que puede incluir delecciones o adiciones que suman 20 por ciento o menos de la secuencia de referencia a lo largo de la ventana de comparación. La secuencia de referencia puede ser un subgrupo de una secuencia más grande.

Dos secuencias de aminoácidos o secuencias de polinucleótidos son "homólogas" si existe una identidad parcial o completa entre sus secuencias. Por ejemplo, una homología de 85% significa que el 85% de los aminoácidos son idénticos cuando las dos secuencias se alinean para un emparejamiento máximo. Se permiten espacios (en cualquiera de las dos secuencias que se están emparejando) para maximizar el emparejamiento; se prefieren longitudes de los espacios de 5 o menos siendo lo más preferido 2 o menos. Alternativamente y preferiblemente, dos secuencias de proteínas (o secuencias de polipéptidos derivadas de ellas de al menos 30 aminoácidos de longitud) son homólogas, como se utiliza este término en la presente memoria, si tienen una puntuación de alineamiento de más de 5 (en unidades de desviación típica) utilizando el programa ALIGN con la matriz de datos de mutaciones y una penalización del espacio de 6 o más. Véase Dayhoff, M.O., en *Atlas of Protein Sequence and Structure*, págs. 101-110 (Volumen 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) y Suplemento 2 de este volumen, págs. 1-10. Las dos secuencias o sus porciones son más preferiblemente homólogas si sus aminoácidos son idénticos en mas de o igual a 50% cuando se alinean óptimamente utilizando el programa ALIGN.

Aplicado a los polipéptidos, el término "identidad sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean óptimamente, por ejemplo mediante los programas GAP o BESTFIT utilizando los pesos de espacios por defecto, comparten una identidad de secuencia de al menos 80 por ciento, preferiblemente una identidad de secuencia de al menos 90 por ciento, más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos 95 por ciento, y muy preferiblemente una identidad de secuencia de al menos 99 por ciento. Preferiblemente, las posiciones de los residuos que no son idénticos difieren en sustituciones conservativas de aminoácidos. Las sustituciones conservativas de aminoácidos hacen referencia a la intercambiabilidad de los residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas son glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales hidroxiladas alifáticas son serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida son asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas son fenilalanina, tirosina, y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alcalinas son lisina, arginina, e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre son cisteína y metionina. Los grupos de sustituciones conservativas de aminoácidos preferidas son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutámico-aspartico, y asparagina-glutamina.

Como se comenta en la presente memoria, se contemplan variaciones de poca importancia en las secuencias de aminoácidos de moléculas de anticuerpos o inmunoglobulinas que son abarcadas por la presente invención, siempre que las variaciones en la secuencia de aminoácidos mantengan al menos un 75%, más preferiblemente al menos un 80%, 90%, 95%, y muy preferiblemente un 99%. En particular, se contemplan los reemplazos conservativos de aminoácidos. Los reemplazos conservativos son aquellos que tienen lugar en una familia de aminoácidos que están relacionados por sus cadenas laterales. Los aminoácidos codificados genéticamente se dividen generalmente en familias: (1) ácidos = aspartato, glutamato; (2) alcalinos = lisina, arginina, histidina; (3) no polares = alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares no cargados = glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Las familias más preferidas son: serina y treonina son la familia hidroxilada alifática; asparagina y glutamina son una familia que contiene amida; alanina, valina, leucina e isoleucina son una familia alifática; y fenilalanina, triptófano, y tirosina son una familia aromática.

Por ejemplo, es razonable esperar que un reemplazo aislado de leucina por isoleucina o valina, un aspartato por glutamato, una treonina por serina, o un reemplazo similar de un aminoácido por un aminoácido relacionado estructuralmente no tenga un efecto importante sobre la unión o las propiedades de la molécula resultante, especialmente si el reemplazo no implica un aminoácido en un sitio del marco. El que un cambio de aminoácido de como resultado un péptido funcional puede ser fácilmente determinado analizando la actividad específica del derivado polipeptídico. Los análisis se describen con detalle en la presente memoria.

Los fragmentos o análogos de moléculas de anticuerpos o inmunoglobulinas pueden ser preparados fácilmente por los expertos en la técnica. Los extremos amino y carboxi preferidos de los fragmentos o análogos se encuentran en las proximidades de los dominios funcionales. Los dominios estructurales y funcionales se pueden identificar por comparación de los datos de la secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos con bases de datos de secuencias públicas o registradas. Preferiblemente, se utilizan métodos de comparación computarizados para identificar motivos

de secuencia o dominios de conformación de la proteína pronosticados que existen en otras proteínas de estructura y/o función conocida. Los métodos para identificar secuencias de proteínas que se pliegan en una estructura tridimensional conocida son conocidos. Bowie et al. *Science* 253:164 (1991). Los ejemplos anteriores demuestran que los expertos en la técnica pueden reconocer motivos de secuencia y conformaciones estructurales que se pueden utilizar para definir dominios estructurales y funcionales de acuerdo con la invención.

Las sustituciones de aminoácidos preferidas son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos de proteínas, (4) alteran afinidades de unión, y (5) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o propiedades funcionales de tales análogos. Los análogos pueden incluir diferentes mutaciones de una secuencia distintas de la secuencia peptídica de origen natural. Por ejemplo, se pueden elaborar sustituciones de aminoácidos sencillas o múltiples (preferiblemente sustituciones de aminoácidos conservativas) en la secuencia de origen natural (preferiblemente en la porción del polipéptido fuera del dominio o de los dominios que forman contactos intermoleculares. Una sustitución de aminoácidos conservativa no debería cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia parental (p. ej., un aminoácido de reemplazo no debe tender a romper una hélice que existe en la secuencia parental). Los ejemplos de las estructuras de polipéptidos secundaria y terciaria reconocidas en la técnica se describen en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W.H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden y J. Tooze, eds., Garland Publishing, Nueva York, N.Y. (1991)); y Thornton et al. *Nature* 354:105 (1991).

El término "fragmento polipeptídico" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a un polipéptido que tiene una delección amino-terminal y/o carboxi-terminal, pero donde la secuencia de aminoácidos restante es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia de origen natural deducida, por ejemplo, a partir de una secuencia de ADNc completa. Los fragmentos tienen típicamente al menos 5, 6, 8 o 10 aminoácidos de longitud, preferiblemente al menos 14 aminoácidos de longitud, más preferiblemente al menos 20 aminoácidos de longitud. En otras realizaciones los fragmentos polipeptídicos tienen al menos 25 aminoácidos de longitud, más preferiblemente al menos 50 aminoácidos de longitud, e incluso más preferiblemente al menos 70 aminoácidos de longitud.

Los análogos peptídicos se utilizan comúnmente en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido molde. Estos tipos de compuesto no peptídico se denominan "miméticos peptídicos" o "peptidomiméticos". Fauchure, J. *Adv. Drug Res.* 15:29 (1986); Veber y Freidinger *TINS* pág. 392 (1985); y Evans et al., *J. Med. Chem.* 30:1229 (1987). Tales compuestos se desarrollan a menudo con la ayuda del moldeado molecular computarizado. Los miméticos peptídicos que son similares estructuralmente a péptidos útiles terapéuticamente se pueden utilizar para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente. Generalmente, los peptidomiméticos son similares estructuralmente a un polipéptido paradigma (esto es, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o una actividad farmacológica), tal como un anticuerpo humano, pero tienen una o más conexiones peptídicas remplazadas por una conexión seleccionada del grupo que consiste en: $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (cis y trans), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$, y $-\text{CH}_2\text{SO}-$, mediante métodos bien conocidos en la técnica. La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia consenso con un D-aminoácido del mismo tipo (p. ej. D-lisina en lugar de L-lisina) se puede utilizar para generar péptidos más estables. Además, los péptidos restringidos que comprenden una secuencia consenso o una secuencia consenso sustancialmente idéntica pueden ser generados mediante métodos conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch *Ann. Rev. Biochem.* 61:387 (1992); por ejemplo, añadiendo residuos de cisteína internos capaces de formar enlaces disulfuro intramoleculares que ciclan el péptido.

Según se utilizan en la presente memoria, los términos "etiqueta" o "etiquetado" hacen referencia a la incorporación de un marcador detectable, p. ej., mediante incorporación de un aminoácido radioetiquetado o anclaje a un polipéptido de radicales biotinilados que pueden ser detectados por medio de avidina marcada (p. ej., estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede ser detectada mediante métodos ópticos o colorimétricos). En ciertas situaciones, la etiqueta o marcador también pueden ser terapéuticos. Se conocen en la técnica y se pueden utilizar diferentes métodos de etiquetado de polipéptidos y glicoproteínas. Los ejemplos de las etiquetas para los polipéptidos incluyen, pero no están limitados a, los siguientes: radiosiótopos o radionúclidos (p. ej., H^3 , C^{14} , N^{15} , S^{35} , Y^{90} , Tc^{99} , In^{111} , I^{125} , I^{131}), etiquetas fluorescentes (p. ej., FITC, rodamina, fósforos de lantánidos), etiquetas enzimáticas (p. ej., peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), agentes quimioluminiscentes, grupos biotinilados, epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un informador secundario (p. ej., secuencias de pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas epitópicas). En algunas realizaciones, las etiquetas están ancladas por brazos espaciadores de diferentes longitudes para reducir los impedimentos estéricos potenciales.

El término "agente farmacéutico o fármaco" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a un compuesto químico o composición capaz de inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra apropiadamente a un paciente. Otros términos químicos de la presente memoria se utilizan de acuerdo con el uso convencional en la técnica, como se ilustra en el Diccionario de Términos Químicos de McGraw-Hill (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

Según se utiliza en la presente memoria, "sustancialmente puro" significa que la especie objeto es la especie predominante presente (esto es, sobre una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición), y preferiblemente una fracción sustancialmente purificada es una composición en la que la especie objeto comprende al menos aproximadamente 50 por ciento (sobre una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. Generalmente, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente 80 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición, más preferiblemente más de aproximadamente 85%, 90%, 95%, y 99%. Muy preferiblemente, la especie objeto se purifica hasta una homogeneidad esencial (no se pueden detectar especies contaminantes en la composición mediante los métodos de detección convencionales) donde la composición consiste esencialmente en una única especie macromolecular.

Estructura de los Anticuerpos

Se sabe que la unidad estructural básica del anticuerpo comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsable del reconocimiento del antígeno. La porción carboxi terminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa, o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgA, e IgE, respectivamente. En las cadenas ligera y pesada, las regiones variables y constantes están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. (Véase generalmente, *Fundamental Immunology*, Cap. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo.

De este modo, un anticuerpo intacto tiene dos sitios de unión. Excepto en los anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son iguales.

Las cadenas muestran todas la misma estructura general de regiones marco (FR) relativamente conservadas, unidas por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de la complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par están alineadas por las regiones marco, permitiendo la unión a un epítipo específico. Desde el extremo N al extremo C, tanto las cadenas ligeras como pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio se realiza de acuerdo con las definiciones de Kabat *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), o Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia et al. *Nature* 342:878-883 (1989).

Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos pueden ser producidos mediante una variedad de métodos incluyendo la fusión de hibridomas o la conexión de fragmentos Fab'. (Véase, p. ej. Songsivilai y Lachmann *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321 (1990), Kostelny et al. *J. Immunol.* 148:1547-1553 (1992)). La producción de anticuerpos biespecíficos puede ser un procedimiento intensivo relativamente laborioso en comparación con la producción de anticuerpos convencionales y los rendimientos y el grado de pureza son generalmente inferiores para los anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos no existen en forma de fragmentos que tienen un único sitio de unión (p. ej., Fab, Fab', y Fv).

Anticuerpos Humanos y Humanización de Anticuerpos

Los anticuerpos humanos evitan algunos de los problemas asociados con los anticuerpos que poseen regiones variables y/o constantes murinas o de rata. La presencia de tales proteínas murinas o derivadas de rata puede conducir al rápido aclaramiento de los anticuerpos o puede conducir a la generación de una respuesta inmunitaria contra el anticuerpo por parte del paciente. Con el fin de evitar la utilización de anticuerpos murinos o derivados de rata, se pueden generar anticuerpos totalmente humanos por medio de la introducción de una función de anticuerpo humano en un roedor de manera que el roedor produzca anticuerpos completamente humanos. A menos que se identifique específicamente en la presente memoria, los anticuerpos "humanos" y "completamente humanos" se pueden utilizar indistintamente en la presente memoria. El término "completamente humano" puede ser útil cuando se distinguen anticuerpos que son solamente parcialmente humanos de aquellos que son completamente, o totalmente humanos.

Un método para generar anticuerpos totalmente humanos es por medio del uso de cepas de ratones XENOMOUSE® que han sido diseñadas para que contengan fragmentos con la configuración de la línea germinal de 245 kb y 190 kb de tamaño del locus de la cadena pesada humana y el locus de la cadena ligera kappa. Véase Green et al. *Nature Genetics* 7:13-21 (1994). Las cepas XENOMOUSE® son asequibles de Abgenix, Inc. (Fremont, CA).

La producción de XENOMOUSE® se comenta y se esboza adicionalmente en las Solicitudes de Patente de los

Estados Unidos con los Núms. de Serie 07/466.608, presentada el 12 de Enero de 1990, 07/610.515, presentada el 8 de Noviembre de 1990, 07/919.297, presentada el 24 de Julio de 1992, 07/922.649, presentada el 30 de Julio de 1992, 08/031.801, presentada el 15 de Marzo de 1993, 08/112.848, presentada el 27 de Agosto de 1993, 08/234.145, presentada el 28 de Abril de 1994, 08/376.279, presentada el 20 de Enero de 1995, 08/430.938, presentada el 27 de Abril de 1995, 08/464.584, presentada el 5 de Junio de 1995, 08/464.582, presentada el 5 de Junio de 1995, 08/463.191, presentada el 5 de Junio de 1995, 08/462.837, presentada el 5 de Junio de 1995, 08/486.853, presentada el 5 de Junio de 1995, 08/486.857, presentada el 5 de Junio de 1995, 08/486.859, presentada el 5 de Junio de 1995, 08/462.513, presentada el 5 de Junio de 1995, 08/724.752, presentada el 2 de Octubre de 1996, y 08/759.620, presentada el 3 de Diciembre de 1996, y las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6.162.963, 6.150.584, 6.114.598, 6.075.181, y 5.939.598 y las Patentes Japonesas Núms. 3 068 180 B2, 3 068 506 B2 y 3 068 507 B2. Véanse también Mendez et al. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997) y Green y Jakobovits *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998). Véase también la Patente Europea Núm. EP 0 463 151 B1, fecha de publicación de la concesión el 12 de Junio de 1996, Solicitud de Patente Internacional Núm. WO 94/02602, publicada el 3 de Febrero de 1994, Solicitud de Patente Internacional Núm. WO 96/34096, publicada el 31 de Octubre de 1996, WO 98/24893, publicada el 11 de Junio de 1998, WO 00/76310, publicada el 21 de Diciembre de 2000.

En un enfoque alternativo, otros, incluyendo GenPharm International, Inc., han utilizado un enfoque de "minilocus". En el enfoque de minilocus, un locus de Ig exógeno es imitado por medio de la inclusión de porciones (genes individuales) en el locus de Ig. De este modo, se forman uno o más genes V_H, uno o más genes D_H, uno o más genes J_H, una región constante mu, y una segunda región constante (preferiblemente una región constante gamma) en un constructo para la inserción en un animal. Este enfoque se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.545.807 de Surani et al. y en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.545.806, 5.625.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, 5.770.429, 5.789.650, 5.814.318, 5.877.397, 5.874.299, y 6.255.458 cada una de Lonberg y Kay, la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.591.669 y 6.023.010 de Krimpenfort y Berns, las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.612.205, 5.721.367, y 5.789.215 de Berns et al., y la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.643.763 de Choi y Dunn, y las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos de GenPharm International con el Núm. de Serie 07/574.748, presentada el 29 de Agosto de 1990, 07/575.962, presentada el 31 de Agosto de 1990, 07/810.279, presentada el 17 de Diciembre de 1991, 07/853.408, presentada el 18 de Marzo de 1992, 07/904.068, presentada el 23 de Junio de 1992, 07/990.860, presentada el 16 de Diciembre de 1992, 08/053.131, presentada el 26 de Abril de 1993, 08/096.762, presentada el 22 de Julio de 1993, 08/155.301, presentada el 18 de Noviembre de 1993, 08/161.739, presentada el 3 de Diciembre de 1993, 08/165.699, presentada el 10 de Diciembre de 1993, 08/209.741, presentada el 9 de Marzo de 1994. Véanse también la Patente Europea Núm. 0 546 073 B1, las Solicitudes de Patente Internacional Núms. WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852, y WO 98/24884 y la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.981.175. Véase adicionalmente Taylor et al., 1992, Chen et al., 1993, Tuailon et al., 1993, Choi et al., 1993, Lonberg et al., (1994), Taylor et al., (1994), y Tuailon et al., (1995), Fishwild et., (1996).

Kirin también ha demostrado la generación de anticuerpos humanos a partir de ratones en los que, por medio de fusión de microcélulas, se han introducido grandes porciones de cromosomas, o cromosomas enteros. Véanse las Solicitudes de Patente Europeas Núms. 773 288 y 843 961.

Las respuestas de anticuerpos anti-ratón humanos (HAMA) también han conducido a la industria a preparar anticuerpos quiméricos o humanizados de otro modo. Si bien los anticuerpos quiméricos tienen una región constante humana y una región variable murina, se espera que se observen ciertas respuestas de anticuerpos anti-quiméricos humanos (HACA), concretamente en las utilizaciones crónicas o de múltiples dosis del anticuerpo. De este modo, sería deseable proporcionar anticuerpos completamente humanos contra enzimas multiméricas con el fin de menoscabar inconvenientes y/o efectos de la respuesta de HAMA o HACA.

Preparación de Anticuerpos

Los anticuerpos, descritos en la presente memoria, se prepararon utilizando la tecnología XENOMOUSE[®], como se describe más abajo. Tales ratones son capaces de producir moléculas de inmunoglobulina humana y anticuerpos y tienen una producción deficiente de moléculas de inmunoglobulina humana y anticuerpos. Las tecnologías utilizadas para lograrlo se describen en las patentes, solicitudes, y referencias referidas en la presente memoria. En particular, no obstante, una realización preferida de producción transgénica de ratones y anticuerpos a partir de estas se describe en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. de Serie 08/759.620, presentada el 3 de Diciembre de 1996 y las Solicitudes de Patente Internacional Núms. WO 98/24893, publicada el 11 de Junio, de 1998 y WO 00/76310, publicada el 21 de Diciembre de 2000. Véase también Mendez et al. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997).

Por medio del uso de semejante tecnología, se produjeron anticuerpos monoclonales completamente humanos para IL-13, como se describe con detalle más abajo. Esencialmente, las líneas XENOMOUSE[®] de ratón fueron inmunizadas con IL-13 humana, se recuperaron células linfáticas (tales como células B) de los ratones que expresaban los anticuerpos, y las líneas celulares recuperadas se fusionaron con una línea celular de tipo mieloide para preparar líneas celulares de hibridoma inmortalas. Estas líneas celulares de hibridoma se escrutaron y se seleccionaron para identificar las líneas celulares de hibridoma que producían anticuerpos específicos para IL-13. Adicionalmente, se proporciona en la presente memoria la caracterización de anticuerpos producidos por tales líneas

celulares, incluyendo análisis de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras de tales anticuerpos.

Alternativamente, en lugar de ser fusionadas a las células de mieloma para generar hibridomas, las células recuperadas, aisladas de líneas XENOMOUSE® inmunizadas de ratones, pueden ser escrutadas adicionalmente en busca de reactividad contra el antígeno inicial, preferiblemente IL-13 humana. Semejante escrutinio incluye un ELISA con la proteína IL-13 deseada y análisis funcionales tales como la producción de eotaxina-1 inducida por IL-13. Las células B individuales que secretan anticuerpos que se unen específicamente a IL-13 pueden ser aisladas utilizando un análisis de placa hemolítica específico de IL-13 (Babcock et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* i93:7843-7848 (1996)). Las células elegidas como diana para la lisis son preferiblemente glóbulos rojos de oveja (SRBC) recubiertos con IL-13. En presencia de un cultivo de células B que secreta la inmunoglobulina de interés y el complemento, la formación de una placa indica lisis mediada por IL-13 específica de las células diana.

Las células del plasma individuales específicas de un solo antígeno en el centro de la placa pueden ser aisladas y la información genética que codifica la especificidad del anticuerpo aislada de las células de plasma individuales. Utilizando la PCR con transcriptasa inversa, se puede clonar el ADN que codifica la región variable del anticuerpo secretado. Semejante ADN clonado se puede insertar después en un vector de expresión adecuado, preferiblemente una casete vectora tal como pcDNA (Invitrogen, Carlsbad, CA), más preferiblemente un pcDNA vector que contiene los dominios constantes de la cadena pesada y ligera de inmunoglobulina. El vector generado puede ser transfectado después en células anfitrionas, preferiblemente células CHO, y cultivado en un medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para inducir los promotores, seleccionar los transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

En la presente memoria, se describe el aislamiento de múltiples células de plasma individuales que producen anticuerpos específicos para IL-13. Adicionalmente, se aisló el material genético que codificaba un anticuerpo que se unía específicamente a IL-13, y ese material se introdujo en un vector de expresión adecuado y después se transfectó a células anfitrionas.

En general, los anticuerpos producidos por las líneas celulares mencionadas antes poseían cadenas pesadas de IgG1 o IgG2 completamente humanas con cadenas ligeras kappa humanas. Los anticuerpos poseían afinidades elevadas, típicamente con KD de aproximadamente 10^{-9} a aproximadamente 10^{-13} M, cuando se medían por medio de una fase sólida y una fase en solución.

Como se ha mencionado antes, los anticuerpos anti-IL-13 se pueden expresar en líneas celulares distintas de las líneas celulares de hibridoma. Las secuencias que codifican los anticuerpos concretos se pueden utilizar para la transformación de una célula anfitriona de mamífero adecuada, tal como una célula CHO. La transformación puede ser mediante cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula anfitriona, incluyendo, por ejemplo el empaquetamiento del polinucleótido en un virus (o en un vector viral) y la transducción de una célula anfitriona con el virus (o vector) o mediante procedimientos de transfección conocidos en la técnica, como se ilustra en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461, y 4.959.455. El procedimiento de transformación utilizado depende del anfitrión que se vaya a transformar. Los métodos para introducir polinucleótidos heterólogos en células de mamífero son bien conocidos en la técnica e incluyen transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación de los polinucleótidos en liposomas, y microinyección directa del ADN en núcleos.

Las líneas celulares de mamífero asequibles como anfitriones para la expresión son bien conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas asequibles de la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC), incluyendo pero no limitadas a células de ovario de hámster Chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (p. ej., Hep G2), y otras numerosas líneas celulares. Las líneas celulares de particular preferencia se seleccionan determinando qué líneas celulares tienen elevados niveles de expresión y producen anticuerpos con propiedades de unión a IL-13.

Secuencias de Anticuerpos

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y ligera de los anticuerpos anti-IL-13 humanos representativos se proporcionan en la lista de secuencias, cuyos contenidos se resumen en la siguiente Tabla 1.

TABLE 1

[illegible]

Agentes Terapéuticos de Anticuerpos

Los anticuerpos anti-IL-13 tienen valor terapéutico para tratar los síntomas y afecciones relacionados con la actividad de IL-13 (p. ej. un trastorno relacionado con IL-13). La IL-13 ha sido implicada en una amplia variedad de enfermedades y trastornos, incluyendo enfermedades inflamatorias, cáncer, enfermedades fibróticas y enfermedades caracterizadas por una proliferación de células no malignas. En realizaciones específicas, los anticuerpos anti-IL-13 descritos en la presente memoria se utilizan en el tratamiento de enfermedades inflamatorias o trastornos tales como asma, incluyendo tanto alérgica (atópica) como no alérgica (no atópica), asma bronquial, bronquitis crónica, enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fiebre del heno, rinitis, urticaria, angioedema, dermatitis alérgica, incluyendo dermatitis de contacto, síndrome de Stevens-Johnson, choque anafiláctico, alergias alimentarias, queratitis, conjuntivitis, síndrome nefrítico resistente a esteroides. En otras realizaciones se utilizan para tratar la mastocitosis. En otras realizaciones más se utilizan para tratar enfermedades fibróticas tales como fibrosis pulmonar, incluyendo fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis quística, fibrosis inducida por bleomicina, fibrosis hepática y esclerosis generalizada. En realizaciones adicionales los anticuerpos anti-IL-13 se utilizan para tratar cánceres, tales como enfermedad de Hodgkin, trastornos proliferativos de las células B tales como linfoma de células B, concretamente linfoma de células B grandes del mediastino, leucemias de células B, carcinoma de ovario.

En otras realizaciones adicionales los anticuerpos anti-IL-13 se utilizan para tratar enfermedades caracterizadas por proliferación de células B no malignas tales como lupus eritematoso generalizado, artritis reumatoide, hepatitis activa crónica y crioglobulinemias; enfermedades caracterizadas por elevados niveles de auto-anticuerpos, tales como anemia hemolítica, trombocitopenia, síndrome fosfolipídico y pénfigo; enfermedad inflamatoria del intestino; y enfermedad injerto frente a anfitrión. En algunas realizaciones, los anticuerpos se utilizan para el tratamiento o la prevención del asma en seres humanos, ratones, u otros animales.

Se reivindica el uso de los anticuerpos reivindicados en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno relacionado con IL-13 (una enfermedad, afección, etc., relacionada con IL-13). El medicamento puede contener una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo. En algunas realizaciones, la cantidad de IL-13 en el medicamento es suficiente de manera que al menos se observe un resultado beneficioso, p. ej., una disminución de un síntoma. En algunas realizaciones, la cantidad que se administra elimina todos los síntomas del trastorno relacionado con IL-13. En algunas realizaciones, la cantidad es suficiente de manera que el nivel de un biomarcador disminuye en un sujeto después de haber administrado el medicamento. En algunas realizaciones, la cantidad de anticuerpo administrada es de aproximadamente 0,001 a 1000, 0,1 a 100, 0,5 a 50, 1 a 10, 1, 3, o 10 mg de anticuerpo/kg de sujeto. Como apreciará un experto en la técnica, la cantidad real del anticuerpo puede depender del trastorno concreto (p. ej., asma, ya sea aguda o crónica), el método de administración, la frecuencia de administración, el resultado deseado, las características del paciente, y las características del anticuerpo. La cantidad real administrada puede ser determinada por un experto en la técnica, por medio de la experimentación rutinaria, a la luz de la presente descripción. En algunas realizaciones, será suficiente una única dosis. En otras realizaciones, serán beneficiosas múltiples dosis o dosis continuas. La cantidad real y el método de administración se pueden determinar a través del uso, entre otras técnicas, de biomarcadores y ejemplos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, los niveles de eotaxina, C10, y/o TARC pueden ser controlados para proporcionar el nivel óptimo de eficacia en el tratamiento del trastorno relacionado con IL-13. Como apreciará el experto en la técnica, el uso del anticuerpo en la preparación o fabricación de un medicamento puede implicar cualquiera de los anticuerpos descritos en cualquier cantidad, suficiente para tratar la afección concreta a la que está dirigido. Cualquiera de las afecciones descritas en la presente memoria, o cualquiera de los trastornos relacionados con IL-13, puede ser la afección a tratar. Como apreciarán los expertos en la técnica, los métodos de uso descritos en la actualidad se pueden emplear para crear un medicamento para su uso. En algunas realizaciones, el medicamento comprende adicionalmente un anticuerpo o detector biomarcador, para un biomarcador. El detector biomarcador del medicamento puede ser un anticuerpo u otra proteína que se una específicamente al biomarcador.

Como apreciará un experto en la técnica, la naturaleza del trastorno puede jugar un papel en la cantidad, frecuencia, y método de administración. Por ejemplo, en los trastornos crónicos, se pueden requerir cantidades relativamente más grandes, y/o dosis del anticuerpo administradas más frecuentemente. De un modo similar, en los trastornos agudos, la cantidad de anticuerpo requerida para el tratamiento, incluyendo la profilaxis, puede ser relativamente menor. En sujetos en los cuales se requiere inicialmente la sensibilización antes de la prueba, se pueden comparar ventajosamente cantidades inferiores del anticuerpo con la cantidad requerida para los sujetos que son alérgicos por naturaleza. En tales sistemas crónicos, pueden ser ventajosas cantidades incrementadas del anticuerpo, así como una mayor frecuencia de administración. La cantidad exacta puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica, a la luz de la presente descripción. Un experto en la técnica apreciará adicionalmente otros factores y por consiguiente cómo ajustar la administración del anticuerpo.

Si se desea, el isotipo de un anticuerpo anti-IL-13 se puede cambiar, por ejemplo para obtener ventaja de una propiedad biológica de un isotipo diferente. Por ejemplo, en algunas circunstancias puede ser deseable que los anticuerpos terapéuticos contra IL-13 sean capaces de fijar el complemento y participar en la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Existen numerosos isotipos de anticuerpos que son capaces de lo mismo,

incluyendo, sin limitación, los siguientes: IgM murina, IgG2a murina, IgG2b murina, IgG3 murina, IgM humana, IgG1 humana e IgG3 humana. Se apreciará que no es necesario que los anticuerpos que son generados posean semejante isotipo, en lugar de eso, el anticuerpo generado puede poseer cualquier isotipo y el anticuerpo puede ser sometido a cambio de isotipo después utilizando mecanismos convencionales que son bien conocidos en la técnica.

A modo de ejemplo, los anticuerpos anti-IL-13 comentados en la presente memoria son anticuerpos humanos. Si un anticuerpo poseía la unión a IL-13 deseada, este podía ser sometido a cambio de isotipo fácilmente para generar un isotipo IgM humano, IgG1 humano, o IgG3 humano, a la vez que todavía poseía la misma región variable (que define la especificidad del anticuerpo y algo de su afinidad). Tal molécula sería capaz de fijar el complemento y participar en la CDC.

En las técnicas de fusión célula-célula, se prepara un mieloma u otra línea celular que posee una cadena pesada con cualquier isotipo deseado y se prepara otro mieloma u otra línea celular que posee la cadena ligera. Tales células se pueden fusionar, después, y se puede aislar una línea celular que expresa un anticuerpo intacto.

Por consiguiente, como se generan anticuerpos candidato que satisfacen los atributos "estructurales" deseados comentados antes, se pueden proporcionar generalmente con al menos algunos de los atributos "funcionales" deseados por medio del cambio de isotipo.

Los anticuerpos biológicamente activos que se unen a IL-13 se utilizan preferiblemente en una preparación o formulación farmacéutica estéril para reducir la actividad de IL-13. Los anticuerpos anti-IL-13 poseen preferiblemente una afinidad adecuada para suprimir potencialmente la actividad de IL-13 dentro del intervalo terapéutico diana. La supresión resulta preferiblemente de la capacidad del anticuerpo para interferir en la unión de IL-13 a un receptor de señalización, tal como IL-13Ra1 (también conocido como IL-13 R α 1, R α 1, IL-13R alfa 1, receptor alfa 1 de IL-13, u otros términos similares). El anticuerpo puede suprimir la actividad de IL-13 interfiriendo en la capacidad de IL-13 para señalizar por medio del receptor, incluso si fuera susceptible de unión. Por ejemplo, el anticuerpo puede evitar la interacción de IL-13Ra1 con un co-receptor que sea necesario para la señalización, tal como la cadena alfa del receptor de IL-4. El anticuerpo puede ser para prevenir la actividad de IL-13 por medio de un receptor de señalización a la vez que permite la unión de IL-13 a un receptor de reclamo, tal como IL-13Ra2. En este caso, la unión al receptor de reclamo puede permitir el aclaramiento de la IL-13 unida e intensificar la capacidad del anticuerpo para suprimir la actividad de IL-13.

Cuando se utiliza para la administración *in vivo*, la formulación de anticuerpo es preferiblemente estéril. Esto se logra fácilmente mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. El anticuerpo normalmente será almacenado en forma liofilizada o en solución. La filtración estéril se puede realizar antes de o después de la liofilización y la reconstitución.

Las composiciones de anticuerpos terapéuticos generalmente se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa para solución intravenosa o un vial que tiene un adaptador que permite la retirada de la formulación, tal como un tapón perforable por una aguja para inyección hipodérmica.

La modalidad de administración del anticuerpo está de acuerdo con los métodos conocidos, p. ej., inyección o infusión por rutas subcutáneas, intravenosas, intraperitoneales, intracerebrales, intradérmicas, intramusculares, intraoculares, intraarteriales, intratecales, o intralesionales, o mediante inhalación o sistemas de liberación sostenida como se indica más abajo. En algunas situaciones el anticuerpo se administra preferiblemente mediante infusión o inyección de bolo intravenoso. En otras situaciones se puede administrar una composición terapéutica a través de la nariz o el pulmón, preferiblemente en forma de líquido o aerosol en polvo (liofilizado). La composición también se puede administrar intravenosamente, parenteralmente o subcutáneamente según se desee. Cuando se administra sistémicamente, la composición terapéutica debe ser estéril, libre de pirógeno y en solución parenteralmente aceptable prestando la debida atención al pH, la isotonicidad, y la estabilidad. Estas condiciones son conocidas por los expertos en la técnica.

Los anticuerpos para uso terapéutico, como se describe en la presente memoria, se preparan típicamente con portadores, excipientes, y otros agentes adecuados que se incorporan a las formulaciones para proporcionar mejor transferencia, liberación, tolerancia, y similares. En resumen, las formulaciones de dosificación de los anticuerpos descritos en la presente memoria se preparan para su almacenamiento o administración mezclando el anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con uno o más portadores, excipientes, o estabilizadores fisiológicamente aceptables. Estas formulaciones pueden incluir, por ejemplo, polvos, pastas, pomadas, jaleas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos) (tales como Lipofectina[®]), productos conjugados con ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones de aceite en agua y agua en aceite, Carbowax (polietilenglicoles de diferentes pesos moleculares), geles semi-sólidos, y mezclas semi-sólidas que contienen Carbowax. La formulación puede incluir tampones tales como TRIS HCl, fosfato, citrato, acetato y otras sales de ácidos orgánicos tales como ácido ascórbico; péptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente diez residuos) tales como

poliarginina, proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, ácido glutámico, ácido aspártico, o arginina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo celulosa o sus derivados, glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones tales como sodio y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN, PLURONICS o polietilenglicol.

Otros portadores, excipientes y estabilizadores aceptables son bien conocidos por los expertos en la técnica. Cualquiera de las mezclas anteriores puede ser apropiada en los tratamientos y terapias de acuerdo con la presente invención, siempre que el ingrediente activo de la formulación no sea desactivado por la formulación y la formulación sea fisiológicamente compatible y tolerable con la ruta de administración. Véanse también Baldrick P. "Pharmaceutical Excipient development: the need for preclinical guidance". *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 32(2):210-8 (2000), Wang W. "Liophilization and development of solid protein pharmaceuticals". *Int. J. Pharm.* 203(1-2):1-60 (2000), Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral delivery-some emerging concepts". *J. Pharm. Sci.* 89(8):967-78 (2000), Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 52:238-311 (1998) y las citas de las mismas para una información adicional.

Las composiciones estériles para inyectables se pueden formular de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional como se describe en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (20ª ed., Lippincot Williams y Wilkens Publishers (2003)). Por ejemplo, se puede desear una disolución o suspensión del compuesto activo en un vehículo tal como agua o aceite vegetal de origen natural como sésamo, cacahuete, o aceite de semilla de algodón o un vehículo graso sintético como oleato de etilo o similar. Se pueden incorporar tampones, conservantes, antioxidantes y similares de acuerdo con la práctica farmacéutica aceptada.

Los anticuerpos también se pueden administrar y liberar a lo largo del tiempo a partir de preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de las preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semi-permeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el polipéptido. Las matrices pueden estar en forma de artículos moldeados, películas o microcápsulas. Los ejemplos de las matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (p. ej., poli-(metacrilato de 2-hidroxietilo) como describen Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, (1981) 15:167-277 y Langer, *Chem. Tech.*, (1982) 12:98-105, o poli(alcohol vinílico), polilactidas (Patente de los estados Unidos Núm. 3.773.919, documento EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma L-glutamato de etilo (Sidman et al., *Biopolymers*, (1983) 22:547-556), etileno-acetato de vinilo no degradable (Langer et al., más arriba), copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON Depot® (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (documento EP 133.988).

Si bien polímeros tales como el etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos. Cuando las proteínas encapsuladas permanecen en el organismo durante un período prolongado, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a humedad a 37°C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden concebir estrategias racionales para la estabilización de proteínas dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través de intercambio de disulfuro, se puede lograr la estabilización modificando los residuos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, utilizando aditivos apropiados, y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

Las composiciones de liberación sostenida también incluyen preparaciones de cristales del anticuerpo suspendidos en formulaciones adecuadas capaces de mantener los cristales en suspensión. Estas preparaciones cuando se inyectan subcutáneamente o intraperitonealmente pueden producir un efecto de liberación sostenida. Otras composiciones también incluyen anticuerpos atrapados liposomalmente. Los liposomas que contienen tales anticuerpos se preparan mediante métodos conocidos per se: Patente de los Estados Unidos Núm. DE 3.218.121; Epstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) 82:3688-3692; Hwang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1980) 77:4030-4034; documentos EP 52.322; EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949; 142.641; Solicitud de patente Japonesa 83-118008; Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.485.045 y 4.544.545; y documento EP 102.324.

La dosificación de la formulación de anticuerpo para un paciente dado puede ser determinada por el médico a cargo. Al determinar la dosificación apropiada los médicos pueden tener en cuenta diferentes factores que se sabe que modifican la acción de los agentes terapéuticos, incluyendo, por ejemplo, la gravedad y el tipo de la enfermedad, el peso corporal, el sexo, la dieta, el período y la ruta de administración, otros medicamentos y otros factores clínicos relevantes. Las dosificaciones terapéuticamente eficaces se pueden determinar mediante métodos *in vitro* o *in vivo*.

La cantidad eficaz de los anticuerpos, descritos en la presente memoria, que se va a emplear terapéuticamente dependerá, por ejemplo, de los objetivos terapéuticos, la ruta de administración, y el estado del paciente. Por consiguiente, se prefiere que el terapeuta titule la dosificación y modifique la ruta de administración según se requiera para obtener el efecto terapéutico óptimo. La dosis diaria típica podría oscilar de aproximadamente 0,001 mg/kg hasta 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados más arriba. Típicamente, el médico clínico

administrará el anticuerpo terapéutico hasta alcanzar una dosis que logre el efecto deseado. El progreso de la terapia se controla fácilmente mediante análisis convencionales.

Un modo de poder determinar o verificar la dosis administrada real (o utilizada en un kit) es por medio de la identificación y el uso de biomarcadores dependientes de IL-13. Tales biomarcadores se esbozan en los Ejemplos de más abajo y en las FIG. 23-28, como los métodos de identificación de los biomarcadores y su uso. Los ejemplos de los biomarcadores relevantes incluyen C10, eotaxina, y TARC. Generalmente, para identificar un biomarcador, se puede medir la cantidad del biomarcador candidato en un sujeto que está sano y/o con un trastorno de IL-13 (p. ej., asma inducida por OVA), y comparar el nivel del biomarcador en el sujeto con el nivel del biomarcador cuando se administra al sujeto uno de los anticuerpos eficaces (p. ej., mAb 623, 731, etc.). Como la administración del anticuerpo puede bloquear la actividad de IL-13, el nivel del biomarcador candidato también debe disminuir (suponiendo que es un biomarcador real) debido a la administración del anticuerpo al sujeto.

El biomarcador, y/o un método de ensayo para él, pueden ser utilizados de diferentes maneras. Por ejemplo, el nivel de biomarcador en un sujeto puede ser seguido por medio del tratamiento de un sujeto con un anticuerpo, u otro método o composición terapéutica con un efecto similar, para permitir rastrear la eficacia del tratamiento. Se puede determinar la cantidad de biomarcador presente en el sujeto inicialmente y determinar cualquier cambio tras la adición del anticuerpo. Si el nivel del biomarcador no cambia tras la administración inicial del anticuerpo, se puede aplicar más anticuerpo al sujeto, aplicarlo más frecuentemente, o mediante una ruta alternativa. Un experto en la técnica apreciará que el nivel del biomarcador puede ser determinado en una variedad de maneras y no debe limitar indebidamente el mecanismo. Se puede utilizar cualquier mecanismo que pueda determinar la cantidad de una proteína (o ARNm, etc.), p. ej., mecanismos de ELISA, o Biacore®. Adicionalmente, en algunas realizaciones, se pueden seguir simultáneamente múltiples biomarcadores. Esto puede permitir más certeza acerca del aspecto relacionado con IL-13 que se esté controlando.

Por supuesto, los biomarcadores pueden ser utilizados simplemente para seguir el progreso de un trastorno, sin la variable adicional de control del tratamiento.

Adicionalmente, el nivel del biomarcador en un sujeto se puede utilizar para determinar si el sujeto tiene un trastorno relacionado con IL-13. Se podría considerar que los sujetos con niveles de biomarcador que están significativamente por encima o por debajo de un nivel o intervalo patrón para individuos sanos padecen un trastorno relacionado con IL-13.

Como apreciará un experto en la técnica, si bien la presente descripción comenta extensamente las afecciones o trastornos que implican cantidades excesivas de IL-13, las composiciones y métodos también se podrían aplicar a situaciones en las cuales el nivel eficaz de IL-13 es demasiado bajo. Por ejemplo, los anticuerpos no tienen que evitar la unión de IL-13 a su receptor normal y en vez de eso pueden evitar la unión de IL-13 a su receptor reclamo, aumentando de ese modo eficazmente la cantidad de IL-13 disponible en el sistema. Sin embargo, en muchas realizaciones, los anticuerpos evitarán al menos que IL-13 se una a su receptor de señalización.

Diseño y Generación de Otros Agentes Terapéuticos

De acuerdo con la presente invención y basándose en la actividad de los anticuerpos que son producidos y caracterizados en la presente memoria con respecto a IL-13, se pueden emplear agentes terapéuticos de anticuerpos avanzados para tratar enfermedades específicas. Estos agentes terapéuticos avanzados pueden incluir anticuerpos biespecíficos, inmunotoxinas, agentes terapéuticos radiomarcados, agentes terapéuticos peptídicos, terapias génicas, concretamente anticuerpos intracelulares, agentes terapéuticos antisentido, y moléculas pequeñas.

En relación con la generación de agentes terapéuticos de anticuerpos avanzados, cuando la fijación del complemento es un atributo deseable, puede ser posible esquivar la dependencia del complemento para la eliminación de células por medio del uso de anticuerpos biespecíficos, inmunotoxinas, o radiomarcas, por ejemplo.

Por ejemplo, se pueden generar anticuerpos biespecíficos que comprenden (i) dos anticuerpos, uno con especificidad para IL-13 y otro para una segunda molécula, que están conjugados entre sí, (ii) un único anticuerpo que tiene una cadena específica para IL-13 y una segunda cadena específica para una segunda molécula, o (iii) un anticuerpo de cadena sencilla que tiene especificidad tanto para IL-13 como para la otra molécula. Tales anticuerpos biespecíficos se pueden generar utilizando mecanismos que son bien conocidos; por ejemplo, en relación con (i) y (ii) véase Fanger et al. *Immunol Methods* 4:72-81 (1994) y Wright y Harris, más arriba y en relación con (iii) véase p. ej., Traunecker et al., *Int. J. Cancer (Supl.)* 7:51-52 (1992). En cada caso, la segunda especificidad puede ser elaborada según se desee. Por ejemplo, la segunda especificidad puede ser elaborada para los receptores de activación de la cadena pesada, incluyendo, sin limitación, CD16 o CD64 (véase p. ej., Deo et al. 18:127 (1997)) o CD89 (véase p. ej., Valerius et al. *Blood* 90:4485-4492 (1997)).

En algunas realizaciones, se proporciona un artículo de manufactura que comprende un recipiente, que comprende una composición que contiene un anticuerpo anti-IL-13, un inserto o etiqueta en el paquete indicando que la composición se puede utilizar para tratar una enfermedad mediada por IL-13. Preferiblemente un mamífero y, más

preferiblemente, un ser humano, recibe el anticuerpo anti-IL-13. En realizaciones preferidas, la enfermedad que se va a tratar se selecciona del grupo que consiste en asma, incluyendo tanto alérgica (atópica) como no alérgica (no atópica), asma bronquial, bronquitis crónica, enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fiebre del heno, rinitis, urticaria, angioedema, dermatitis alérgica, incluyendo dermatitis de contacto, síndrome de Stevens-Johnson, choque anafiláctico, alergias alimentarias, queratitis, conjuntivitis, síndrome nefrítico resistente a esteroides, mastocitosis, enfermedades fibróticas tales como la fibrosis pulmonar, incluyendo la fibrosis pulmonar idiopática, la fibrosis quística, la fibrosis inducida por bleomicina, la fibrosis hepática y la esclerosis generalizada, cánceres tales como la enfermedad de Hodgkin, trastornos proliferativos de las células B tales como el linfoma de las células B, concretamente el linfoma de células B grandes de mediastino, leucemias de células B, carcinoma de ovario, enfermedades caracterizadas por proliferación de células B no malignas tales como lupus eritematoso generalizado, artritis reumatoide, hepatitis activa crónica y crioglobulinemias, niveles elevados de auto-anticuerpos, tales como anemia hemolítica, trombocitopenia, síndrome fosfolipídico y pénfigo, enfermedad inflamatoria del intestino y enfermedad de injerto versus anfitrión.

En algunas realizaciones se utiliza un anticuerpo anti-IL-13 para tratar el asma. En una realización concreta el anticuerpo es el anticuerpo 623 o sus variantes descritas en la presente memoria. En otra realización concreta el anticuerpo es el anticuerpo 731 o sus variantes descritas en la presente memoria. Los ejemplos específicos de cómo se pueden utilizar estos anticuerpos para tratar el asma y otros trastornos se describen más abajo en los ejemplos.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos, incluyendo los experimentos llevados a cabo y los resultados logrados se proporcionan con fines ilustrativos solamente y no se deben considerar limitantes de las enseñanzas de la presente invención.

EJEMPLO 1: Generación de Anticuerpos Preparación de IL-13 y Antígeno de IL-13

Se utilizaron los siguientes péptidos de IL-13 en los experimentos descritos más abajo.

IL-13 Humana Recombinante (R&D 213-IL-005; SEQ ID NO: 61):

GPVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALESINVSIGCSAIEKT
QRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLHLKCLFREGQFN

IL-13 Humana Recombinante (Peprotech 200-13; SEQ ID NO: 62):

SPGPVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALESINVSIGCSAIE
KTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLHLKCLFREGQFN

IL-13 Humana Recombinante (Peprotech 200-13A; SEQ ID NO: 63):

MSPGPVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALESINVSIGCSAI
EKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLHLKCLFREGQFN

Proteína de fusión IL-13 Humana-Fc humano (con secuencia líder; SEQ ID NO: 64)

MALLLTIVIALTCLGGFASPGVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGM
YCAALESINVSIGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLHLK
CLFREGQFNEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSDGSFYLKSLTVDKSRWQGNVVFSCSVMEALHNHYTOKSLSLSPGK

Proteína de fusión IL-13 Humana-Fc de conejo (con secuencia líder; SEQ ID NO: 65):

MALLLTIVIALTCLGGFASPGVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGM
YCAALESINVSIGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLHLK
CLFREGQFNRYLDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFFPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
SQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLEQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKA
LPAPIEKTIISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMNGFYPSDISVEWENKGAED
NYKTTTPAVLSDGSYFLYNKLSVPTSEWORGVDVFTCSVMHEALHNHYTOKSISRSPGK

IL-13 Humana-Hélice A de IL-13 de Ratón (subrayado; SEQ ID NO: 66)

MHPLLNPALLALGLMALLLTIVIALTCLGGFASPGVPPSRVSLPLTLKELIEELVNITQNQKA
PLCNGSMVWSINLTAGMYCAALESINVSIGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRD
TKIEVAQFVKDLLHLKCLFREGQFN

IL-13 Humana-Hélice B de IL-13 de Ratón (subrayado; SEQ ID NO: 67)

MHPLLNPALLALGLMALLLTIVIALTCLGGFASPGVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLC
NGSMVWSINLTAGGFCV~~ALD~~SLINVSIGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKI
EVAQFVKDLLHLKCLFREGQFN

IL-13 Humana-Hélice C de IL-13 de Ratón (subrayado; SEQ ID NO: 68):

MHPLLNPALLALGLMALLLTIVIALTCLGGFASPGVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLC
NGSMVWSINLTAGMYCAALESINVSIGCSAIYRTQRI~~LHGL~~CPHKVSAGQFSSLHVRDTKI
EVAQFVKDLLHLKCLFREGQFN

IL-13 Humana-Hélice D de IL-13 de Ratón (subrayado; SEQ ID NO: 69):

MHPILLNPLLLALGLMALLLTIVIALTCLGGFASPGVPVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLC
 NGSMVWSINLTAGMYCAALESINLVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKI
EVAHFITKLLSYTKQLFRHGQQFN

Como apreciará un experto en la técnica, solamente un subgrupo de los residuos anteriores puede estar realmente implicado en la formación de un epítipo. Por ejemplo, en los SEQ ID NO: 66-69 anteriores, los epítopos pueden ser realmente la porción en hélice de cada péptido (sección subrayada). En una realización, los anticuerpos descritos en la presente memoria están dirigidos a cualquiera de los epítopos de IL-13 o sus fragmentos, incluyendo la porción en hélice de cada péptido.

Inmunización de Animales

Se desarrollaron anticuerpos monoclonales contra IL-13 inmunizando ratones XENOMOUSE® (XenoMouse® XMG2L3 y XenoMouse® XMG2, Abgenix, Inc. Fremont, CA). La proteína de fusión IL-13 humana-Fc humano (SEQ ID NO: 64) o la proteína de fusión IL-13 humana-Fc de conejo (SEQ ID NO: 65) se utilizaron como inmunógeno para la generación de anticuerpos. Cada ratón fue inmunizado por medio de la ruta de administración en la almohadilla de la pata. Los animales se inmunizaron los días 0, 4, 7, 11, 14, 18, 21 y 25. La inmunización inicial fue con 10 µg de antígeno en CpG/Alumbre por ratón. Los siguientes refuerzos fueron con 5 µg de antígeno en CpG/Alumbre por ratón. El refuerzo final el día 25 fue con 5 µg de antígeno en PBS sin coadyuvante por ratón. Se tomaron muestras de sangre de los ratones el día 20 para obtener suero para la determinación del título como se ha descrito más arriba.

Análisis del Título

El título se determinó utilizando un protocolo normalizado. Brevemente, se recubrieron placas Costar 3368 con proteína de fusión IL-13-Fc de conejo (SEQ ID NO: 65) o anticuerpo totalmente de conejo durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron utilizando Titertek Program ADG9, se secaron, y se bloquearon con 250 µl de leche desnatada sin grasa al 1%/1xPBS. Tras el bloqueo, las placas se lavaron de nuevo utilizando Titertek Program ADG9 y se secaron. Los sueros que se iban a someter a ensayo se titularon verticalmente 1:2 por duplicado a partir de una dilución inicial 1:100. Las muestras se hicieron circular en leche desnatada sin grasa al 1%/1x PBS a 50 µl/pocillo y se incubaron durante 1 hora a la temperatura ambiente.

Después de lavar utilizando Titertek Program ADG9 y secar, las placas se incubaron durante 1 hora a la temperatura ambiente con un anticuerpo anti-Fc humano de conejo secundario conjugado con POD (dilución 1:8000, 50 µl/pocillo) con una reactividad cruzada mínima para Fc de conejo en leche desnatada sin grasa al 1%/1xPBS. Las placas se lavaron después por última vez utilizando Titertek Program ADG9 y se secaron. Se añadió una solución en TMB de sustrato POD en una sola etapa (50 µl/pocillo) y se permitió que se desarrollara durante 30 minutos a la temperatura ambiente. La reacción se detuvo con HCl 1N (50 µl/pocillo) y la densidad óptica se leyó inmediatamente con un lector de Placa Titertek.

Tres animales con títulos elevados para el inmunógeno IL-13, como se muestra en la Tabla 2, se seleccionaron para la cosecha.

Tabla 2

Ratón	Recubrimiento	
	IL-13 Rb Fc	RbIgG
1	3855	<100
2	5444	<100
3	>6400	268
Sin tratamiento previo	<100	<100

Escrutinio Primario

Los animales hiperinmunes se cosecharon y se aislaron células B CD19+ para el posterior cultivo de células B. Las células fueron inducidas a proliferar y diferenciarse terminalmente en células de plasma. Los sobrenadantes de estas células del plasma se escrutaron mediante ELISA para identificar los pocillos primarios que contenían anticuerpos específicos anti-IL-13. Los cultivos se hicieron correr comúnmente con 50 a 500 células B CD19+ por pocillo para permitir la identificación de cultivos monoclonales de células de B específicas para el antígeno.

En resumen, se recubrieron con IL-13-RbFc placas Costar 3368 de 96 pocillos a 1 µg/ml durante la noche. Cada placa se lavó 5 veces con dH₂O y se añadieron a la placa 40 µl de leche al 1% en PBS. Con posterioridad, se añadieron a cada pocillo 10 µl de sobrenadante de células B. Tras una hora a la temperatura ambiente, las placas se lavaron de nuevo 5 veces con dH₂O. A cada pocillo se le añadieron 50 µl de anti-Fc anti-Humano de Conejo-HRP con una reactividad cruzada anti-conejo mínima (Jackson Laboratories; dilución 1:8000). Después de 1 hora a la temperatura ambiente, las placas se lavaron de nuevo 5 veces con dH₂O y se añadieron 50 µl de sustrato TMB

(Neogen) a cada pocillo. La reacción se detuvo después de 30 minutos mediante la adición de 50 µl de ácido clorhídrico 1N a cada pocillo y las placas se leyeron a una longitud de onda de 450 nm.

Los datos representativos resultantes del escrutinio primario se muestran más abajo en la Tabla 3. Los pocillos positivos se identificaron como los que se había encontrado que tenían una señal al menos tres veces la de un pocillo de control. Se identificaron un total de 968 pocillos con células B específicas para el antígeno positivas en el escrutinio primario. Todos estos pocillos se llevaron a escrutinio en un análisis funcional, como se describe más abajo.

Tabla 3

Placa	Pocillo	D.O. Primaria
2357	G11	2,598
2361	G5	3,218
2372	B8	2,308
2383	H5	3,05
2398	C5	2,203
2401	G12	3,566
2413	G11	3,347
2384	G12	4,057
2388	A10	4,219
2407	G11	3,448

Análisis de Producción de Eotaxina Inducida por IL-13

Los 968 pocillos positivos para el ELISA se escrutaron dos veces en un análisis de liberación de Eotaxina-1 inducida por IL-13. El análisis se realizó de manera que solamente se identificaron como neutralizadores los pocillos que contenían una elevada concentración de anticuerpo o los pocillos que contenían anticuerpo de elevada afinidad. En este análisis se identificaron como neutralizadores un total de 78 anticuerpos neutralizadores. Los datos específicos de los diferentes pocillos de interés también se muestran con fines ilustrativos en la Tabla 4.

Para el análisis, la mitad del área de las placas de 96 pocillos se sembró con 4000 células HDFa/pocillo en 50 µl de Medio 106 con un suplemento de bajo crecimiento en suero (Cascade). Las placas se incubaron después durante la noche a 37°C en CO₂ al 5%. En una placa separada, se tomaron alícuotas de 12,5 µl de anticuerpo de muestra, control negativo o control positivo en placas de análisis de 96 pocillos estériles. Se prepararon aproximadamente 600 pM de IL-13 en Medio 106 (4X concentración final) y se prepararon aproximadamente 100 ng/ml de TNF-alfa en Medio 106 (2X concentración final).

Para comenzar el análisis, se añadieron 12,5 µl de IL-13 o medio solo a cada pocillo y se dejó que se incubaran a 37°C en CO₂ al 5% durante 1 hora. Después de 1 hora de incubación, el medio de las células HDFa fue separado cuidadosamente utilizando una pipeta multicanal. Se añadieron 25 µl de TNF-alfa a cada pocillo. Se transfirieron 25 µl de muestra/IL-13 a los pocillos de HDFa/TNF-alfa y las células se incubaron a 37°C en CO₂ al 5% durante 48 horas.

Tras 48 horas de incubación, el sobrenadante de los pocillos de análisis de HDFa se recogió en una placa de fondo VEE de 96 pocillos. Las muestras se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos.

Se analizaron 30 µl de muestra en busca de liberación de Eotaxina-1 en un kit de análisis (R&D Systems) de acuerdo con el protocolo convencional con las siguientes modificaciones. (1) Se recubrió con 50 µl de Ab de captura a 2 µg/ml; (2) se utilizaron 50 µl de muestra (30 µl de muestra + 20 µl de medio para un volumen final de 50 µl); (3) se utilizaron 50 µl de Ab de detección a 0,1 µg/ml; (4) se utilizaron 50 µl de Estreptavidina-HRP a 0,5 µg/ml; y (5) se utilizaron 50 µl de Solución Sustrato.

Tabla 4

Placa	Pocillo	D.O. ELISA	Concentración Eotaxina (pg/ml)	% Inhibición	D.O. ELISA	Concentración Eotaxina (pg/ml)	% Inhibición
2357	G11	0,429	25	79	0,283	13	80
2361	G05	0,393	19	85	0,295	15	76
2372	B08	0,532	41	72	0,282	13	80
2383	H05	0,42	23	84	0,247	6	90
2398	C05	0,34	11	90	0,228	3	96
2401	G12	0,564	46	70	0,384	31	57
2413	G11	0,401	20	84	0,283	13	82
2384	G12	0,517	38	73	0,297	15	76
2388	A10	0,459	29	78	0,274	11	82
2407	G11	0,469	31	78	0,278	12	84

Análisis de Antígeno Elevado (HA) de Pocillos de Cultivo de Células B Específicas Anti-IL-13

Utilizando un método ELISA, se normalizaron sobrenadantes para la concentración de anticuerpo específico del antígeno. Utilizando un anticuerpo anti-anticuerpo diana (IL-13) de concentración conocida titulado en paralelo, se generó una curva patrón y se comparó la cantidad de anticuerpo específico del antígeno en el sobrenadante con el patrón y se determinó su concentración, véase la Tabla 5 de más abajo.

Tabla 5

Placa	Pocillo	DO ELISA determinada a diferentes diluciones de anticuerpo				Concentración Ab (ng/ml) Basada en una Curva Patrón anti-IL-13
2357	G11	3,94	1,769	0,708	0,424	386
2361	G5	4,483	2,345	0,794	0,438	532
2372	B8	3,209	1,238	0,552	0,373	240
2383	H5	4,389	2,361	0,768	0,438	523
2398	C5	2,057	0,752	0,383	0,324	114
2401	G12	4,312	2,285	0,796	0,441	521
2413	G11	3,977	1,783	0,648	0,415	360
2384	G12	4,639	3,132	1,072	0,528	856
2388	A10	4,689	3,23	1,261	0,612	1049
2407	G11	4,891	2,9	1,072	0,537	824

La cantidad de anticuerpo específico del antígeno de cada pocillo se cuantificó y se trazó frente a los datos de neutralización para ese pocillo para identificar los pocillos de potencia más elevada (FIG. 1). Los pocillos que contienen los anticuerpos de potencia más elevada son aquellos con la mejor inhibición a la concentración más baja de anticuerpo (cuadrante superior izquierdo del gráfico).

Análisis de Antígeno Limitante (LA) de Pocillos de Cultivo de Células B Específicas Anti-IL-13

El análisis del antígeno limitante es un método que clasifica por afinidad los anticuerpos específicos del antígeno preparados en sobrenadantes de cultivo de células B con respecto a todos los demás anticuerpos específicos del antígeno. En presencia de un recubrimiento muy pequeño de antígeno, solamente los anticuerpos de afinidad más elevada deberían ser capaces de unirse a cualquier nivel detectable en equilibrio. (Véase, p. ej., la Publicación PCT WO 03/048730A2).

Aquí, la IL-13 biotinilada se unió a placas con estreptavidina a cuatro concentraciones (250 ng/ml; 125 ng/ml; 62 ng/ml; y 31 ng/ml) durante 1 hora a la temperatura ambiente sobre placas de cultivo de 96 pocillos. Cada placa se lavó 5 veces con dH₂O y se añadieron a cada placa 45 µl de leche al 1% en PBS con azida de sodio al 0,05%. Esto estuvo seguido de la adición de 5 µl de sobrenadante de células B a cada pocillo. Después de 18 horas a la temperatura ambiente en un aparato de sacudimiento, las placas se lavaron de nuevo 5 veces con dH₂O. A cada pocillo se le añadieron 50 µl de Gt anti-Fc Humano-HRP a 1 µg/ml. Después de una hora a la temperatura ambiente, las placas se lavaron de nuevo 5 veces con dH₂O y se añadieron 50 µl de sustrato TMB a cada pocillo. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de ácido fosfórico 1M a cada pocillo y las placas se leyeron a una longitud de onda de 450 nm.

No obstante, numerosos pocillos incluyendo 2388A10 y 2357G11 fueron claramente superiores como se midió mediante la DO al recubrimiento con antígeno más bajo, como se ilustra en la FIG. 2. Los resultados presentados en la FIG. 2 demuestran la capacidad de los diferentes anticuerpos para unirse a una baja concentración de recubrimiento con antígeno. Los anticuerpos que daban las señales a una DO más elevada tenían la afinidad más elevada en las condiciones de este análisis. Los clones restantes se analizaron adicionalmente combinando los datos de elevada concentración de antígeno que miden la concentración de anticuerpo específico y la salida de antígeno limitante. De este modo es posible comparar la afinidad de los anticuerpos a diferentes concentraciones en sobrenadantes de cultivo de células B. Los pocillos que contienen los anticuerpos de afinidad más elevada son aquellos con la DO de ELISA más elevada en el contexto de la concentración más baja de anticuerpo específico de Ag.

Basándose en todos los datos del escrutinio, los pocillos enumerados en la Tabla 6 fueron identificados para el análisis adicional (análisis de placas y micromanipulación, PCR de células individuales y expresión recombinante). Se seleccionaron cinco pocillos basándose en la potencia (inhibición/Ab específico total): 2372B8, 2383H5, 2398C5, 2401G12 y 2413G11. Se seleccionaron tres pocillos basándose en la afinidad y la inhibición: 2357G11, 2361G5 y 2384G12, y se seleccionaron dos pocillos basándose en los datos de neutralización solos: 2388A10 y 2407G11.

Tabla 6

Placa	Pocillo	DO ELISA determinada a diferentes recubrimientos de antígeno			
		250 ng/ml	125 ng/ml	62 ng/ml	31 ng/ml
2357	G11	2,582	1,553	1,066	0,59
2361	G5	2,582	1,505	1,075	0,423
2372	B8	1,616	0,79	0,506	0,234
2383	H5	1,533	0,817	0,459	0,224
2398	C5	1,187	0,694	0,425	0,186
2401	G12	1,295	0,827	0,407	0,198
2413	G11	1,274	0,783	0,449	0,203
2384	G12	2,056	1,161	0,759	0,401
2388	A10	2,637	1,76	1,152	0,558
2407	G11	1,627	0,887	0,583	0,285

Análisis Específico de IL-13 en Placa Hemolítica

- 5 Se aislaron células que secretaban anticuerpos específicos de IL-13 de interés utilizando un análisis específico de IL-13 en placa hemolítica como describen generalmente Babcook et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:7843-7848 (1996)). Las células que se aislaron fueron identificadas en la Tabla 7 de más abajo.

Biotinilación de Glóbulos Rojos de Oveja (SRBC)

- 10 Se almacenaron SRBC en medio RPMI en forma de provisión de partida al 25%. Se obtuvo un sedimento de células empaquetadas SRBC de 250 µl tomando alícuotas de 1,0 ml de la provisión de partida en un tubo Eppendorf, centrifugando las células (centrifugación por pulsos a 8000 rpm (6800 ref) en una microcentrífuga) y eliminando el sobrenadante. Las células se lavaron dos veces con 1 ml de PBS a pH 8,6. Después el sedimento celular se
- 15 suspendió de nuevo en 4,75 ml de PBS a pH 8,6 en un tubo de 15 ml. En un tubo de 50 ml separado, se añadieron 2,5 mg de Sulfo-NHS biotina a 45 ml de PBS a pH 8,6. Una vez que la biotina se hubo disuelto completamente, se añadieron los 5 ml de SRBC y el tubo se hizo girar a la temperatura ambiente durante una hora. Los SRBC se centrifugaron a 3000 g durante 5 minutos, el sobrenadante se extrajo y los RBC se resuspendieron en 1 ml de PBS a
- 20 pH 7,4 en un tubo Eppendorf. Se lavaron los SRBC 3 veces con 1 ml de PBS a pH 7,4. Los SRBC se resuspendieron después en 4,75 ml de medio celular inmune (RPMI 1640 con FCS al 10%) en un tubo de 15 ml (provisión de partida B-SRBC al 5%). La provisión de partida se almacenó a 4°C hasta que fue necesario.

Recubrimiento con Estreptavidina (SA) de B-SRBC

- 25 Se transfirió 1 ml de provisión de partida de B-SRBC al 5% a un tubo Eppendorf nuevo. Los B-SRBC se sedimentaron, el sobrenadante se extrajo, el sedimento se volvió a suspender en 1,0 ml de PBS a pH 7,4, y se repitió la centrifugación. El ciclo de lavado se repitió 2 veces, y después el sedimento de B-SRBC se resuspendió en 1,0 ml de PBS a pH 7,4 para dar una concentración final del 5% (v/v). Se añadieron 10 µl de una solución de partida de estreptavidina de 10 mg/ml (CalBiochem, San Diego) y el tubo se mezcló y se hizo girar a la temperatura
- 30 ambiente durante 20 minutos. Las etapas de lavado se repitieron y los SA-SRBC se re-suspendieron en 1 ml de PBS pH 7,4 (5% (v/v)).

Recubrimiento de SA-SRBC con IL-13 Humana

- 35 Se recubrieron SA-SRBC con la fusión IL-13 Humana-RbFc fotobiotinilada a 100 µg/ml, después se mezclaron y se hicieron girar a la temperatura ambiente durante 20 minutos. Los SRBC se lavaron dos veces con 1,0 ml de PBS a pH 7,4 como antes. Los SRBC recubiertos con IL-13 se re-suspendieron en RPMI (+FCS al 10%) hasta una concentración final del 5% (v/v).

Determinación de la calidad de IL-13-SRBC mediante Inmunofluorescencia (IF)

- 40 Se añadieron aproximadamente 10 µl de SA-SRBC al 5% y 10 µl de SRBC recubiertos con IL-13 al 5% a un tubo Eppendorf de 1,5 ml nuevo separado que contenía 40 µl de PBS. Se añadió un anticuerpo anti-IL-13 humana de control a cada muestra de SRBC a 45 µg/ml. Los tubos se hicieron girar a la temperatura ambiente durante 20
- 45 minutos, y las células se lavaron después tres veces con 100 µl de PBS. Las células se re-suspendieron en 50 µl de PBS y se incubaron con 20 µg/ml de anticuerpo Gt-anti Fc de IgG Humana conjugado con Alexa488 (Molecular Probes, Eugene, OR). Los tubos se hicieron girar a la temperatura ambiente durante 20 minutos, y después se lavaron con 100 µl de PBS y las células se resuspendieron en 10 µl de PBS. Se aplicaron 10 µl de las células teñidas sobre un porta de microscopio de vidrio limpio, se cubrieron con un cubre de vidrio, se observaron bajo luz
- 50 fluorescente, y se puntuaron en una escala arbitraria de 0 a 4.

Preparación de Células de Plasma

Se recogió el contenido de un pocillo de cultivo de células B individuales previamente identificado mediante los diferentes análisis descritos más arriba por contener un clon de células B que secretaba la inmunoglobulina de interés. Utilizando un Pipetteman de 100-1000 µl, se recuperó el contenido del pocillo añadiendo 37°C RPMI (+FCS al 10%). Las células se re-suspendieron pipeteando y después se transfirieron a un tubo Eppendorf de 1,5 ml nuevo (vol. final aprox. 700-1000 µl). Las células se centrifugaron en una microcentrífuga a 2500 rpm durante 1 minuto a la temperatura ambiente. Después el tubo se hizo girar 180 grados y se centrifugó de nuevo a 2500 rpm. El medio congelado se extrajo y las células inmunes se resuspendieron en 100 µl de RPMI (FCS al 10%), después se centrifugaron. Este lavado con RPMI (+ FCS al 10%) se repitió y las células se re-suspendieron en 75 µl de RPMI (+ FCS al 10%) y se almacenaron en hielo hasta que estuvieron listas para su uso.

Análisis en Placa

A una muestra de 75 µl de células se le añadieron 75 µl de SRBC recubiertos con IL-13 (provisión de partida al 5% (v/v), diluido según sea necesario si el césped de SRBC era demasiado grueso), 4x provisión de partida de complemento de cobaya (Sigma, Oakville, ON) preparado en RPMI (+ FCS al 10%), y 4x provisión de partida de suero potenciador (1:900 en RPMI (+ FCS al 10%)). La mezcla (3 – 5 µl) se aplicó sobre tapas de placas TC (BD Biosciences, San Jose, CA) y las aplicaciones se cubrieron con aceite de parafina no diluido. Los portas se incubaron a 37°C durante un mínimo de 1 hora.

Tabla 7

Placa	Pocillo	Números de Células Individuales (SC)
2407	G11	SC-IL-13-557-576
2388	A10	SC-IL-13-577-596
2401	G12	SC-IL-13-597-616
2372	B8	SC-IL-13-617-636
2413	G11	SC-IL-13-637-657
2398	C5	SC-IL-13-658-670
2383	H5	SC-IL-13-671-690
2384	G12	SC-IL-13-691-710
2537	G11	SC-IL-13-711-730
2361	G5	SC-IL-13-731-750

Clonación y Expresión

Tras el aislamiento de las células de plasma individuales, se extrajo el ARNm y se llevó a cabo la PCR con transcriptasa inversa para generar ADNc que codificaba las cadenas pesada y ligera del anticuerpo secretado por cada célula. La región de la cadena pesada variable humana se clonó en un vector de expresión de IgG2. Este vector se generó clonando el dominio constante de la IgG2 humana en el sitio de clonación múltiple de pcDNA3.1+/Hygro (Invitrogen, Burlington, ON). La región de la cadena ligera variable humana se clonó en un vector de expresión de IgK o IgL. Estos vectores se generaron clonando el dominio constante de IgK humana o IgL humana en el sitio de clonación múltiple de pcDNA3.1+/Neo (Invitrogen, Burlington, ON).

Los vectores de expresión de la cadena pesada y la cadena ligera se co-transfectaron después utilizando lipofectamina en una placa de 60 mm de células 293 de riñón embrionario humano (HEK) confluentes al 70%. Las células transfectadas secretaron un anticuerpo recombinante con una especificidad idéntica a la de las células de plasma originales durante 24-72 horas. Se cosecharon 3 ml de sobrenadante a partir de las células HEK 293 y se demostró la secreción de un anticuerpo intacto con un ELISA sándwich para detectar específicamente IgG humana. La especificidad se confirmó por medio de la unión del anticuerpo recombinante a IL-13 utilizando ELISA.

Se realizaron ensayos ELISA de secreción como sigue. Se recubrieron las placas de control con 2 mg/ml de anti-H+L de IgG humana de cabra durante la noche para las placas de control, se recubrieron con IL-13 placas de 96 pocillos Costar Labcoat Universal Binding Polystyrene y se mantuvieron durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron cinco veces con dH₂O. Los anticuerpos recombinantes se titularon 1:2 para 7 pocillos del sobrenadante de lipofección no diluido. Las placas se lavaron cinco veces con dH₂O. Se añadió un anticuerpo anti-Fc de IgG humana de cabra específico conjugado con HRP a una concentración final de 1 µg/ml durante 1 hora a la temperatura ambiente para la secreción y los dos análisis de unión. Las placas se lavaron cinco veces con dH₂O. Las placas se revelaron mediante la adición de TMB durante 30 minutos y el ELISA se detuvo mediante la adición de ácido fosfórico 1 M. Cada placa de ELISA se analizó para determinar la densidad óptica de cada pocillo a 450 nm.

Purificación de Anticuerpos Anti-IL-13 Recombinantes

Para la producción a mayor escala, se lipofectaron vectores de expresión de la cadena pesada y ligera (2,5 µg de cada cadena/placa) en células HEK293 en diez placas de 100 mm que eran confluentes al 70%. Las células transfectadas se incubaron a 37°C durante 4 días, momento en el cual el sobrenadante (6 ml) se cosechó y se reemplazó por 6 ml de medio de nueva aportación. El día 7, el sobrenadante se separó y se reunió con la cosecha

inicial (120 ml en total de 10 placas).

Cada anticuerpo se purificó a partir del sobrenadante utilizando una cromatografía de afinidad (1 ml) con Proteína A-Sefarosa (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Los anticuerpos se hicieron eluir de la columna de Proteína A con 500 ml de Glicina 0,1 M (pH 2,5). Los productos eluidos se sometieron a diálisis en PBS (pH 7,4) y se esterilizaron por filtración. Los anticuerpos se analizaron mediante SDS-PAGE no reductora para evaluar la pureza y el rendimiento. La concentración también se midió mediante análisis UV a una DO de 280.

EJEMPLO 2: CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES

Se analizaron anticuerpos recombinantes en busca de la potencia en el análisis de eotaxina como se ha descrito antes. Los resultados se presentan en la Tabla 8 de más abajo. También están incluidas las CI_{50} medidas en este análisis para el receptor $\alpha 2/FC$ de IL-13 murino y el receptor $\alpha 2/FC$ de IL-13 humano. La FIG. 3 muestra el porcentaje de inhibición de la liberación de eotaxina inducida por IL-13 por los anticuerpos recombinantes 643 y 731 en comparación con un control de isotipo coincidente, p. ej., un anticuerpo monoclonal IgG2 irrelevante.

Tabla 8

CI_{50} (pM)					
mAb ID	n=1	n=2	n=3	Media	Desv. Típica
731	11	19	17	16	4
713	21	21	19	21	1
mIL-13R α 2/Fc	29	39	29	32	6
643	44	28	33	35	8
623	31	40	35	36	4
693	38	69	53	54	16
602	80	53	ND	66	NA
353	99	123	80	101	22
hIL-13R α 2/Fc	128	147	119	131	14
785	223	144	160	176	42
11.18.3	213	304	217	245	51
157	260	207	306	258	50
176	233	ND	ND	233	NA
183	1040	1842	ND	1441	NA
264	293	313	284	297	15
243	253	ND	ND	253	NA
356	1087	913	ND	1000	NA

Afinidad BiaCore

La afinidad con IL-13 humana (R&D) se investigó mediante un análisis BiaCore para seis de los anticuerpos (602, 623, 643, 693rep1, 693rep2 y 7310). Primero, se prepararon dos superficies de anticuerpo humano α de cabra de alta densidad sobre un chip BiaCore CM5 utilizando el acoplamiento con amina rutinario para la captura de mAb, tres a la vez. Todos los mAb se diluyeron hasta ~5 μ g/ml utilizando tampón de desplazamiento HBS-P que contenía 100 μ g/ml de BSA. Cada mAb purificado se capturó durante un minuto sobre una superficie de una célula de flujo diferente para cada ciclo de inyecciones de IL-13 utilizando un aparato BiaCore 2000.

Se inyectó IL-13 (R&D) utilizando el comando KINJECT a concentraciones de 100,9, 50,4, 25,2, 12,6, 6,30, 3,15, 1,58 y 0,788 nM para los mAb 693, 713 y 731 y 25,2, 12,6, 6,30, 3,15, 1,58, 0,788, y 0,394 nM para los mAb 602, 623 y 643, sobre todas las superficies durante 1,5 minutos, seguido de una disociación de veinte minutos. Las muestras de IL-13 se prepararon en tampón de desplazamiento HBS-P que contenía 100 μ g/ml de BSA. Todas las muestras se inyectaron al azar por duplicado con varios ciclos de captura de mAb/tampón KINJECT intercalados para una doble referencia.

Las superficies de anticuerpo humano α de cabra de alta densidad se regeneraron con un pulso de 12 segundos de ácido fosfórico concentrado diluido 1/100 (146 mM, pH 1,5) después de cada ciclo. El mAb 693 se hizo circular dos veces porque había una célula de flujo extra en el aparato durante la última serie de experimentos de resolución del medio.

Los datos se ajustaron a un modelo de interacción 1:1 con un término para el transporte de masa utilizando CLAMP. Los datos para los seis anticuerpos se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9

Anticuerpo	$K_a (M^{-1} s^{-1})$	$K_d (s^{-1})$	$K_D (pM)$
602	$3,0 \times 10^6$	$5,1 \times 10^{-4}$	172
623	$4,9 \times 10^6$	$2,5 \times 10^{-4}$	52
643	$4,4 \times 10^6$	$2,9 \times 10^{-4}$	66
693 rep 1	$2,0 \times 10^6$	$3,8 \times 10^{-4}$	189
693 rep 2	$2,5 \times 10^6$	$2,7 \times 10^{-4}$	109
713	$2,9 \times 10^6$	$3,4 \times 10^{-5}$	12
731	$3,9 \times 10^6$	$3,5 \times 10^{-5}$	9

Análisis Cinético

- 5 Se evaluaron las medidas cinéticas de varios anticuerpos utilizando el método KinExA®. Este método implica la determinación basada en la disolución de las medidas de afinidad formal en equilibrio.

Se acoplaron 100 µg de cada uno de los mAb a cuentas de Sefarosa 4B o Azlactona activadas con CNBr. Los grupos activos restantes de las cuentas se bloquearon como recomienda el fabricante. Las cuentas se bloquearon después con 10 mg/ml de BSA en Tris 1 Mm y se almacenaron en solución de bloqueo. Para algunos experimentos se recubrieron por adsorción directamente las cuentas de PMMA con el mAb como recomienda el fabricante y se bloquearon con 10 mg/ml de BSA en PBS y se almacenaron en solución de bloqueo.

15 Se realizaron experimentos KinExA utilizando un sistema de inmunoanálisis de flujo automático, KinExA 3000, en los cuales las cuentas acopladas con los mAb relevantes sirvieron como fase sólida. En resumen, una cantidad constante de IL-13 humana nativa o de mono macaco (10 – 650 pM), preparada purificando y estimulando PBMC de acuerdo con los protocolos convencionales, se incubó con concentraciones de titulación de mAb anti-h-IL-13 comenzando a 25 nM en el tampón de la muestra (PBS con BSA al 0,1% para reducir la unión no específica). Los complejos de antígeno/anticuerpo se incubaron a la temperatura ambiente durante 48 horas a 168 horas para permitir que se alcanzara el equilibrio. La mezcla se hizo pasar por las correspondientes cuentas acopladas con anticuerpo para acumular el antígeno no unido. Los volúmenes y las velocidades de flujo de la mezcla se hicieron variar dependiendo de la señal específica obtenida en cada experimento.

25 La IL-13 capturada se detectó utilizando soluciones que contenían un Ab secundario (ya sea un Ab anti-IL-13 policlonal o un Ab monoclonal que se une a otro epítipo) y anti-Ig de la especie conjugado con Cy5 para el anticuerpo secundario en el mismo tampón. En algunos casos la cuenta unida a IL-13 fue detectada utilizando una mezcla de SA-Cy5 y un anticuerpo biotinilado que se une a un epítipo distinto del unido al Ab inmovilizado en la cuenta.

30 Las concentraciones, los volúmenes, y las velocidades de flujo de las soluciones de anticuerpo secundario se variaron para optimizar la razón de señal a ruido en cada experimento. Las señales unidas se convirtieron en valores relativos como una proporción de control en ausencia de hIL-13. Se midieron tres réplicas de cada muestra para todos los experimentos en equilibrio. La constante de disociación en equilibrio (K_D) se obtuvo del análisis de regresión no lineal de los datos utilizando un modelo de unión homogénea de un sitio contenido en el soporte lógico KinExA. El soporte lógico calcula la K_D y determina el intervalo de confianza de 95% ajustando los datos puntuales a una curva de K_D teórica. El intervalo de confianza del 95% se da como K_D baja y K_D elevada. Las afinidades se resumen en las Tablas 10 para la IL-13 humana nativa y 11 para la IL-13 de macaco nativa.

Tabla 10

Anticuerpo	K_D	K_{Dbaja}	$K_{Delevada}$
623	24 pM	6,6 pM	60 pM
643	13 pM	6,2 pM	25 pM
713	3,6 pM	1,1 pM	7,3 pM
731	8,9 pM	6,2 pM	12 pM

Tabla 11

Anticuerpo	K_D	K_{Dbaja}	$K_{Delevada}$
623	37 pM	18 pM	64 pM
731	1,6 nM	880 pM	2,2 nM

45 La constante de la velocidad de asociación se investigó utilizando KinExA para dos de los anticuerpos, 623 y 731. Se utilizaron las mismas cuentas acopladas a IL-13 como sonda y se utilizaron los métodos "directo" o de "inyección". Estos métodos son idénticos a los análisis de equilibrio KinExA con respecto a la captura de antígeno, concentración de antígeno y detección de antígeno. En el método directo, el antígeno y el anticuerpo se mezclan de antemano y después se hacen circular en el KinExA. En el método de inyección se mezclan entre sí el anticuerpo y una titulación de antígeno durante un tiempo establecido antes de la lectura. En resumen, se mezcló hIL-13 con una cantidad de mAb que se uniría a aproximadamente 80% del antígeno basándose en los experimentos de equilibrio.

El antígeno libre presente en la muestra se sondeó repetidamente, pre-equilibrio. Puesto que las señales de unión son proporcionales a la concentración del antígeno en la solución, las señales disminuyeron a lo largo del tiempo hasta que la solución alcanzó el equilibrio. Los volúmenes y las velocidades de flujo de la mezcla de antígeno-mAb y el anticuerpo secundario marcado con Cy5 se hicieron variar dependiendo del mAb sometido a ensayo. Los datos se analizaron utilizando el soporte lógico de análisis KinExA. Este soporte lógico representa gráficamente la disminución de las señales de unión a lo largo del tiempo, y ajusta los datos puntuales recogidos a una solución exacta de las ecuaciones diferenciales de la cinética para la unión. A partir de esta curva, se determinó una solución óptima para la K_{asoc} (Tabla 12). La K_{disoc} se calculó indirectamente a partir de las soluciones para K_{asoc} y K_D .

Tabla 12

Anticuerpo	Método	K_D (pM)	K_{asoc} ($M^{-1}.s^{-1}$)	uniones K_{asoc}		K_{disoc} (s^{-1})	%Error
				k_{asoc} Elevada	k_{asoc} Baja		
623	Directo Cinética	24	1,1E+07	1,4E+07	5,1E+06	2,7E-04	1,37
623	Inyección Cinética	24	1,5E+07	2,1E+07	1,1E+07	3,6E-04	5,46
731	Inyección Cinética	8,9	4,7E+06	6,3E+06	3,4E+06	4,2E-05	4,96

Unión a la Proteína Variante de IL-13

Se investigó la capacidad de los anticuerpos 623 y 731 para unirse a una proteína variante de IL-13 en la cual la arginina 110 de tipo salvaje es remplazada por glutamina (IL-13Q110R).

En resumen, se recubrieron placas con IL-13RbFc (50 μ l de 2,5 μ g/ml) mediante incubación en 1xPBS (pH 7,4) y azida al 0,05% durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron después con 1 x PBS y se bloquearon durante 30 minutos con 100 μ l de leche desnatada sin grasa al 1%/1xPBS a la temperatura ambiente.

Se pre-incubaron IL-13 o IL-13Q110R con anticuerpos anti-IL13 durante 1 hora a la temperatura ambiente. La IL-13 se tituló verticalmente a partir de 2000 ng/ml con un volumen final de 30 μ l/pocillo. Se añadieron 30 μ l de mAb por pocillo a 40 ng/ml (sc731, 623) y 80 ng/ml (sc693), dando como resultado una concentración final de IL-13 en el primer punto de titulación de 1000 ng/ml, una concentración final de anticuerpos 623 y 731 en el primer punto de titulación de 20 ng/ml y una concentración final de anticuerpo 693 en el primer punto de titulación de 40 ng/ml.

Tras la pre-incubación, se transfirieron 50 μ l/pocillo desde la solución de pre-incubación a una placa previamente recubierta con IL-13RbFc y se incubaron durante 30 minutos a la temperatura ambiente. Las placas se lavaron y se añadió Hu IgG Fc -HRP a una concentración de 200 ng/ml. Después de 30 minutos más de incubación y posterior lavado, se añadió TMB y se incubó durante 30 minutos más. Las reacciones se detuvieron con HCl 1N y las placas se leyeron tan pronto como fue posible en un lector de microplaca de 96 pocillos Powerwave X340 (Biotek).

Como se puede observar en la FIG. 4, la pre-incubación con IL-13 inhibió la unión de ambos anticuerpos 623 y 731 a placas de ELISA recubiertas con IL-13, mientras la pre-incubación con la variante de IL-13 IL-13Q110R inhibió la unión de 731 en un grado mucho mayor que la unión de 623.

Se observa que los anticuerpos para esta variante concreta pueden ser particularmente útiles en el tratamiento de ciertas enfermedades. Por ejemplo, como se observa en la Patente de los Estados Unidos Núm. 2005/0065327, numerosos polimorfismos genéticos en el gen IL-13 han sido relacionados con enfermedades alérgicas. En particular, una variante del gen IL-13 en el cual el residuo de arginina del aminoácido 130 está sustituido por glutamina (Q130R) ha sido asociado con asma bronquial, dermatitis atópica y elevación de los niveles de IgE en suero (Véanse, p. ej., Heinzmann, A., et al. Hum Mol Genet, 2000. 9(4):págs. 549-59; Howard, T.D., et al. Am J Hum Genet, 2002, 70(1): págs. 230-6; Kauppi, P., et al. Genomics, 2001. 77(1-2): págs. 35-42; y Graves, P.E., et al. J Allergy Clin Immunol, 2000. 105(3): págs. 506-13). Esta variante de IL-13 concreta es referida en la presente memoria como variante Q110R (el residuo de arginina del aminoácido 110 está sustituido por glutamina) debido a que la secuencia señal de 20 aminoácidos ha sido eliminada del recuento de aminoácidos. Arima et al., (J Allergy Clin Immunol, 2002. 109(6): págs. 980-7) informan de que esta variante está asociada con la elevación de niveles de IL-13 en suero. La variante de IL-13 (Q110R) y los anticuerpos para esta variante son comentados en el documento WO 01/62933. Un polimorfismo promotor de IL-13, que altera la producción de IL-13, también ha sido asociado con el asma alérgica (van der Pouw Kraan, T.C., et al. Genes Immun, 1999. 1(1): págs. 61-5). Se cree que la variante induce un incremento en la incidencia del asma por medio de un aumento de la vida media eficaz del ligando de IL-13. Se cree que IL-13Q110R puede tener una afinidad menor por el receptor de IL-13 reclamo.

Como apreciará un experto en la técnica, a la luz de la presente descripción, en algunas realizaciones, los anticuerpos se pueden unir tanto a IL-13 como a una variante de IL-13 con afinidades o K_D aproximadamente iguales. Esto puede permitir el tratamiento de pacientes con ambas formas de IL-13 (tipo salvaje y variante) con un

único anticuerpo. De este modo, en algunas realizaciones, puede ser útil un anticuerpo que se puede unir a IL-13 y a una variante de IL-13 con una K_D igual o similar. En algunas realizaciones, existe menos de 20% de diferencia en la K_D del mAb completamente humano para IL-13 y para IL-13Q110R, por ejemplo, una diferencia de menos de 20-15, 15-10, 10-8, 8-6, 6-4, 4-2, 2-1, 1-0 por ciento en las K_D del anticuerpo. En algunas realizaciones, las K_D entre el tipo salvaje y la variante IL-13Q110R difieren en menos de 1000 veces, 1000-100, 100-10, 10-1, o 1-0,2 veces. Las similitudes para otras variantes de IL-13 también se pueden utilizar en la selección o utilización de anticuerpos.

Competición de las Cadenas Receptoras

Se investigó la capacidad de los anticuerpos anti-IL-13 para bloquear la unión de IL-13 a los receptores IL-13R α 1 e IL-13R α 2. Las muestras se analizaron utilizando el citómetro de flujo. Los resultados se presentan en la FIG. 5A y la FIG. 5B. Los datos demostraron la capacidad de Ab 643 (Fig. 5A) y de Ab 731 (Fig. 5B) o un anticuerpo de control de isotipo para unirse a IL-13 y los receptores implicados en el procedimiento de unión. El receptor concreto (p. ej., IL-13R α 2, IL-13R α 1, o IL-4R) que se estaba uniendo a IL-13 y permitiendo que el anticuerpo interaccionara con las células fue determinado utilizando anticuerpos neutralizadores contra todos los posibles receptores de IL-13 expresados sobre células HDFa. En la FIG. 5C y en la FIG. 5D se presenta un resumen de diferentes experimentos y de los resultados pronosticados.

En resumen, se resuspendieron células HDFa en tampón FACS para proporcionar aproximadamente 200.000 células/pocillo/100 μ l y se tomaron alícuotas de 100 μ l de células en placas de fondo VEE de 96 pocillos. Se diluyeron anticuerpos anti-receptor neutralizadores (anti-IL-13R α 1 humano (R&D Systems), anti-IL-13R α 2 humano (R&D Systems) o anti-IL-4R humano (R&D Systems) en tampón FACS a dos veces la concentración final (10 μ g/ml FINAL). También se diluyeron Abs anti-IL-13 y de Control en tampón FACS a 2X la concentración final (1 μ g/ml), como IL-13 (humana R&D; 10 ng/ml FINAL).

Se centrifugó una placa de fondo VEE de células HDFa a 180 xg durante 7 minutos y el sobrenadante se eliminó por inversión (PLACA Núm. 1). Las células se resuspendieron en 50 μ l de tampón FACS y se añadieron 50 μ l más de anti-IL-13R α 1 humano, anti-IL-13R α 2 humano, anti-IL-4R humano o tampón FACS (Sin Control de Ab para el Receptor) a los pocillos apropiados. Las células y los anticuerpos se incubaron después sobre HIELO durante 1,5 horas.

Se utilizó una segunda placa de fondo VEE para la pre-incubación Ab/IL-13 (PLACA Núm. 2). Se tomaron alícuotas de 60 μ l del anticuerpo de ensayo en una placa de fondo VEE. Se añadieron 60 μ l de IL-13 a los pocillos apropiados y la mezcla se incubó sobre hielo durante aproximadamente 1,5 horas.

Tras la incubación las células HDF se centrifugaron a 180x g durante 7 minutos y el sobrenadante se eliminó por inversión. Las células de la PLACA Núm. 1 se resuspendieron en 100 μ l de tampón FACS o 100 μ l de Ab/IL-13 y se incubaron durante 1,5 horas más.

Después de la segunda incubación las células se centrifugaron, se lavaron 1X con tampón FACS y se añadieron 100 μ l de tampón FACS, 7AAD o 2 μ g/ml de anti-IgG-Fc-Cy5 Hu a los pocillos apropiados.

Las células y el anticuerpo secundario se incubaron sobre hielo durante 20 minutos, seguido de un lavado con tampón FACS. Las células se resuspendieron después en 100 μ l de tampón FACS y se tomaron alícuotas de tubos FACS etiquetados previamente que contenían 300 μ l de tampón FACS frío.

Las muestras se analizaron utilizando el citómetro de flujo. Los resultados se presentan en la FIG. 5A y en la FIG. 5B. En la FIG. 5C y FIG. 5D se muestra un resumen del protocolo anterior y de los resultados pronosticados para cada uno de los anticuerpos. Como se muestra en la FIG. 5A, IL-13 no se une a las células DHFa en presencia de Ab643. Parece que Ab 643 evita que IL-13 se una a sus receptores sobre las células HDFa, como se muestra en cada uno de los paneles de la FIG. 5C. Como se puede observar en la FIG. 5B, este no es el caso para Ab 731. IL-13 permite que Ab731 se una a las células HDFa. Esta unión no es bloqueada por los Ab contra IL-13R α 1 o IL-4R pero si es bloqueada por los anticuerpos contra IL-13R α 2, indicando que Ab 731 evita que IL-13 se una a IL-13R α 1 o IL-4R pero no a IL-13R α 2, como se muestra en la FIG. 5D. Los resultados para el mAb 623, un anticuerpo que es similar al mAb 643, también se presentan más abajo.

La cantidad de expresión superficial de IL-13R α 1, IL-13R α 2 e IL-4R sobre las células HDFa se determinó mediante análisis FACS utilizando anticuerpos anti-Receptores. Las células HDFa preparadas como se ha descrito más arriba se incubaron con anticuerpos anti-receptor a una concentración de 5 μ g/ml sobre hielo durante 1 hora. Las células se lavaron con tampón FACS y se incubaron con anticuerpo secundario Cy5 (anti-hum) a 2 μ g/ml sobre hielo durante 30 minutos. Después del lavado, las muestras se analizaron mediante citometría de flujo. Los resultados se presentan en la Tabla 13 de más abajo.

Tabla 13

Anticuerpo Diana	Promedio de la Media Geométrica FACS
Receptor de IL-13 Alfa 1	8,39
Receptor de IL-13 Alfa 2	9,4
Receptor de IL-4 Alfa 1	9,15
Control Negativo	3,8

Además de los resultados anteriores para el mAb 643 y el mAb 731, se realizó un experimento similar para el mAb 623. Los resultados se muestran en la FIG. 5E. Los resultados para el mAb 623 son similares a los de mAb 643, sugiriendo una interacción representada en la FIG. 5C, en lugar de la representada para el mAb 731 de la FIG. 5D.

Mapeo Epitópico

Los epítomos para los complejos de anticuerpo-IL-13 se analizaron mediante tres métodos, 1) SELDI, 2) Escrutinio de genotecas de presentación en fagos de péptidos Al Azar, y 3) expresión de moléculas de IL-13 Humana/Ratón Quiméricas. Estas tres técnicas combinadas con el conocimiento de la estructura de IL-13 produjeron una visión coherente de los sitios de unión relativos y las regiones antigénicas de estos mAb. Esto ha permitido la identificación de epítomos funcionales, concretamente para las regiones implicadas en la unión al receptor de señalización.

En cuanto al examen inicial, el análisis de transferencia puntual de unión de mAb a la proteína purificada IL-13 reveló qué anticuerpos se unían a qué forma (lineal o conformacional) del epítipo. Los mAb 693 y 785 se unieron al antígeno desnaturalizado, el epítipo lineal. Los mAb 602, 623, 643, y 713, se unieron a la IL-13 no reducida (epítipo conformacional) pero no al antígeno desnaturalizado reducido. El mAb 763 no presentó unión. Después de esto, los epítomos lineales se mapearon utilizando una genoteca de presentación en fagos de péptidos al azar. Después de dos rondas de inmunopurificación de mAb 693 frente a una genoteca de péptidos al azar de 12 unidades expresada sobre fagos, se secuenció un aglutinante específico individual y se alineó con los residuos 109-120 (Hélice D) de IL-13. (FIG. 6A). Los anticuerpos para IL-13 se agruparon en 3 clasificaciones diferentes, aunque las clasificaciones no siempre se corresponden con los epítomos determinados mediante otros métodos. Se escogió un anticuerpo de cada clasificación para el mapeo mediante SELDI. La Tabla 14 demuestra los resultados de la clasificación de los anticuerpos para IL-13.

Tabla 14

mAb	VH	VL	Clasificación
353	VH4-59/D2-21/JH3b	A30/JK3	1
713	VH3-23/D6-19/JH6b	V2-1/JL1	1
731	VH3-23/D6-19/JH6b	V2-1/JL1	1
602	VH3-15/D1-26/JH6b	V2-7/JL3	2
623	VH3-15/D1-26/JH6b	V2-7/JL3	2
643	VH3-15/D1-26/JH6b	V2-7/JL3	2
693	VH4-4/D5-5/JH6B	V2-14/JL2	3

Mapeo de Epítomos Utilizando SELDI

El complejo anticuerpo-antígeno fue digerido con una elevada concentración de Lys-C y Asp-N. El epítipo fue determinado después por medio de SELDI e identificado mediante la masa del fragmento. La Tabla 15 muestra las masas pronosticadas para los péptidos obtenidos mediante la digestión de IL-13 digerida con la endoproteinasa Lys-C.

Tabla 15

Masa	Posición	Corte Mis.	Secuencia Péptido IL-13	SEQ ID NO:
9442,7	21-108	3	GPVPPSTALRELIEELVNIT QNQKAPLCNGSMVWSINLTA GMYCAALES LINVSGCSAIEKTQRM LSGFCPHKVSAGQFS SLHVRDTK	73
7829,9	21-93	2	GPVPPSTALRELIEELVNIT QNQKAPLCNGSMVWSINLTA GMYCAALES LINVSGCSAIE KTQRM LSGFCPHK	74
7729,8	45-116	3	APLCNGSMVWSINLTAGMYC AALES LINVSGCSAIEKTQR MLSGFCPHKVSAGQFSSLHV RDTKIEVAQFVK	75
6815,3	45-108	2	APLCNGSMVWSINLTAGMYC AALES LINVSGCSAIEKTQR MLSGFCPHKVSAGQFSSLHV RDTK	76

Las masas identificadas después de la escisión fueron 6842,8 (para el fragmento peptídico 45-108), 7733,7 (para el fragmento peptídico 45-116), y 9461,4 (para el fragmento peptídico 21-108). De este modo, el sitio de unión para mAb 713 se determinó para que estuviera entre los residuos 45-108 de IL-13.

Matriz Peptídica para el Mapeo de Epítomos Conformacionales

Se generó una matriz peptídica de 101, péptidos de 12 unidades, que abarcaban los residuos 21-132 de la secuencia de IL-13 (SIGMA-Genosys). Cada péptido consecutivo se compensó con un aminoácido del anterior, produciendo una genoteca solapante, anidada. La matriz fue sondeada con el mAb 713 y se detectó la unión del mAb 713 a los péptidos incubando las membranas PVDF con anticuerpo secundario conjugado con HRP seguido de un aumento de la quimioluminiscencia. Se observaron dos aplicaciones consecutivas, correspondientes a los aminoácidos 70 a 80 de IL-13 y tres aplicaciones consecutivas, correspondientes a los aminoácidos 83 a 92 de IL-13. La matriz también se sondeó con el mAb 731. También se observó una aplicación, correspondiente a los aminoácidos 70 a 80 de IL-13. Asimismo se realizó un experimento similar para determinar el epítipo para el mAb 623, y se describe en el Ejemplo 10 de más abajo. Los resultados indicaron que el mAb 623 se une a los residuos 21-29.

Mapeo Epitópico Utilizando Moléculas Quiméricas de IL-13 de Ratón

Las secuencias de la Hélice A, la Hélice B, la Hélice C, y la Hélice D de ratón fueron barajadas con secuencias humanas generando cuatro nuevas quimeras de ratón. Una representación de la localización de las hélices se muestra en la FIG. 6B. Ninguno de los mAb se unió a la IL-13 de ratón. Las cuatro quimeras son las siguientes:

**MHPLLNP LLLALGLMALLTTVIALTCLGGFASPGVPVRSVSLPLTLKELIEELVNITQNQKA
PLCNGSMVWSINLTAGMYCAALESINVS GCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRD
TKIEVAQFVKDLLLHLKCLFREGQFN (SEQ ID NO: 77);**

**MHPLLNP LLLALGLMALLTTVIALTCLGGFASPGVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLC
NGSMVWSINLTAGGFCVALDSLTVNVS GCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKI
EVAQFVKDLLLHLKCLFREGQFN (SEQ ID NO: 78);**

**MHPLLNP LLLALGLMALLTTVIALTCLGGFASPGVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLC
NGSMVWSINLTAGMYCAALESINVS GCSAIEKTQRILHGLCPHKVSAGQFSSLHVRDTKI
EVAQFVKDLLLHLKCLFREGQFN (SEQ ID NO: 79);**

**MHPLLNP LLLALGLMALLTTVIALTCLGGFASPGVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLC
NGSMVWSINLTAGMYCAALESINVS GCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKI
EVAHFITKLLSYTKQLFRHGQQFN (SEQ ID NO: 80).**

Las quimeras se expresaron después y las proteínas quiméricas de IL-13 secretadas fueron detectadas en un análisis ELISA. Los resultados se resumen en la Tabla 16, el "" indica que la unión era débil en el ELISA sándwich.

Tabla 16

mAb	IL-13 Hu	Hélice A Ratón	Hélice B Ratón	Hélice C Ratón	Hélice D Ratón	Epítipo	Clasificación
693	Si	Si	Si	Si	No	Hélice D	3
785	Si	Si	Si	Si	No	Hélice D	
713	Si	Si	Si	No	Si	Hélice C	1
731	Si	Si	Si	No	Si	Hélice C	1
602	Si	Si	Si	Si	Si		2
623	Si	Si	Si	Si	Si		2
643	Si	Si	Si	Si	Si		2

Los resultados de los tres estudios anteriores de los epítomos de IL-13 se resumen en la Tabla 17.1

Tabla 17.1

mAb	Presentación en fagos	SELDI	Aplicaciones	Quimera	Recipiente
3.1.2.4	21-33			Hélice A	
693	109-121			Hélice D	3
785	111-128			Hélice D	
713		45-108	70-80 y 83-92	Hélice C	1
731			70-80	Hélice C	1
602					2
623			21-29		2
643					2

De este modo, parece que algunos de los anticuerpos descritos en la presente memoria utilizan varias posiciones de epítopos posibles diferentes.

5

Análisis de Clasificación de Anticuerpos

Los anticuerpos anti-IL-13 fueron agrupados en tres clasificaciones diferentes midiendo la capacidad de dos anticuerpos para unirse al antígeno al mismo tiempo (un anticuerpo que captura el antígeno sobre una cuenta y el otro anticuerpo utilizado para la detección). Se restó la señal sobre las cuentas en ausencia de antígeno de la señal obtenida en presencia del antígeno. La señal de cada anticuerpo de detección se dividió por la señal del anticuerpo de captura para determinar las veces que se incrementa la unión como se muestra en la Tabla 17.2. Los anticuerpos se clasificaron después basándose en patrones de clasificación similares sobre los anticuerpos de captura. Los datos identificaron la presencia de tres clasificaciones de unión al anticuerpo para los nueve anticuerpos de detección sometidos a ensayo.

10

15

TABLA 17.2

		Ab utilizado para la Detección									
		353	11,18	713	731	693	623	602	643	785	G2
Ab sobre Cuentas	353	1,0	2,3	0,6	0,6	2,5	3,1	2,9	3,0	3,3	0,2
	11,18	4,2	1,0	6,6	6,9	2,3	0,9	0,8	0,9	0,7	0,5
Clasificación:		1	2	1	1	3	2	2	2	2	N/A

En resumen, se añadieron cuentas conjugadas con anti-IgG1, 2, 3, 4 humana de ratón (BD Pharmingen 555784) al anticuerpo capturado (353 y 11,18; 5 µg/ml) en tubos Eppendorf oscurecidos individuales. Los tubos se hicieron girar en la oscuridad a 4°C durante la noche. Se tomaron alícuotas de las cuentas de cada pocillo de una placa de filtración (2500 de cada cuenta/pocillo) y se lavaron.

20

Se añadieron IL-13Rblg (5 µg/ml) y controles (medio solamente) a la placa de filtración 60 µl/pocillo, que después se incubó en la oscuridad a la temperatura ambiente durante 1 hora en un aparato de sacudimiento y con posterioridad se lavó 2 veces.

25

Se añadieron anticuerpos secundarios diluidos en medio a 60 µl/pocillo (1 anticuerpo por pocillo). Los anticuerpos se utilizaron a las siguientes concentraciones (353B – 5 g/ml; 11.18.31 – 5 µg/ml; 713 – 0,56 µg/ml; 731 – 1,28 µg/ml; 693 – 2,7 µg/ml; 623 – 5,7 µg/ml; 602 – 11 µg/ml; 643 – 4,3 µg/ml; 785 – 5,5 µg/ml; 763 – 5,7 µg/ml; control G2 – 5 µg/ml). Las placas se incubaron después durante dos horas a la temperatura ambiente y se lavaron.

30

Se añadió Mo-anti-hulG G1,2,3,4 biotinilado (BD Pharmingen Núm. 555785) diluido en medio a 5 µg/ml a cada pocillo (60 µl/pocillo) y las placas se incubaron en la oscuridad durante 1 hora en un aparato de sacudimiento a la temperatura ambiente. Después de lavar se añadieron 60 µl/pocillo de Estreptavidina-PE (5 µg/ml; Pharm Núm. 554061) diluida en medio. Las placas se incubaron en la oscuridad durante 20 minutos en el aparato de sacudimiento a la temperatura ambiente y se lavaron dos veces.

35

Cada pocillo se resuspendió en 80 µl de tampón de almacenamiento/bloqueo (PBS, 10 mg/ml de BSA, azida de sodio al 0,05% p/v) pipeteando arriba y abajo cuidadosamente varias veces para resuspender las cuentas. Cada pocillo se analizó leyendo en un Luminex con la compuerta ajustada entre 8.400 y 14.500.

40

La plataforma Luminex es una tecnología basada en cuentas de fluorescencia que permite hacer circular múltiples análisis de una vez. El lector Luminex es capaz de averiguar eventos de señalización positiva sobre diferentes microesferas codificadas. Esto permite recubrir cada cuenta por separado, mezclar después las microesferas juntas recubiertas diferencialmente y después en un análisis de una etapa unir el anticuerpo a cada una de las microesferas diferentes. Para la isotipificación de los anticuerpos, las microesferas fueron recubiertas de tal manera que cada cuenta fue capaz de unirse específicamente a un isotipo de cadena pesada o cadena ligera concreto. Las microesferas se mezclaron después entre si y añadió el sobrenadante del hibridoma para cada anticuerpo. Después

45

de una incubación de 20 minutos, las microesferas se lavaron, y el anticuerpo unido se detectó utilizando un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente. Las microesferas se leyeron después utilizando el lector Luminex.

5 EJEMPLO 3: DATOS IN VIVO Ratones con IL-13 Humanizada

Se generaron ratones con IL-13 humanizada, en los que el gen que codifica la IL-13 murina estaba interrumpido por la inserción de un ADNc que codificaba la IL-13 humana, en Lexicon (The Woodlands, Texas). Los ratones fueron retrocruzados sobre la cepa A/J para asegurarse de que los ratones eran susceptibles a la hiper-reactividad de las vías respiratorias inducida por alérgenos como se ha descrito previamente (Ewert et al., (2000) Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.).

Para demostrar que los ratones con IL-13 humanizada producen solamente IL-13 humana y no IL-13 murina, se compararon la producción de citoquina a partir de células T CD4⁺ específicas de OVA derivadas de ratones con IL-13 humanizada (6-8 semanas de edad) con células T CD4⁺ derivadas de ratones WT. Los ratones se sensibilizaron mediante inyección i.p. con 50 µg de OVA/1 mg de Imject Alum (Pierce, Rockford, IL) en solución salina estéril al 0,9% o con PBS (3 ratones por tratamiento). Siete días después de la sensibilización, los ratones fueron sacrificados, y se prepararon suspensiones de los bazo de una sola célula. Los eritrocitos se lisaron, y los esplenocitos lavados se resuspendieron a 5×10^6 células/ml en medio completo que consistía en HL-1 (BioWhittaker, Walkersville, MD) con FCS inactivado con calor al 10%, L-glutamina 2 mM, y 50 mg/ml de sulfato de neomicina. Después se cultivaron los esplenocitos durante 4 días a 37°C en presencia de 200 µg/ml de OVA para generar células T CD4⁺ reactivas a Ag. Las células T CD4⁺ (5×10^5 células/pocillo) se aislaron y después se incubaron con esplenocitos (5×10^5 células/pocillo) tratados con mitomicina C recién aislados (25 µg/ml) de ratones WT en medio completo en presencia de 200 µg/ml de OVA en placas de 96 pocillos (250 µL/pocillo) durante 96 horas.

Los sobrenadantes de cultivo libres de células se recogieron y se sometieron a ensayo en busca de la producción de citoquina. Se determinaron las concentraciones de IL-13 humana y murina (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN) mediante ELISA de acuerdo con el protocolo del fabricante. Como se esperaba, las células T CD4⁺ obtenidas de ratones con IL-13 humanizada después de la re-estimulación con OVA in vitro produjeron IL-13 humana y no IL-13 murina (FIG- 7A). En contraste, las células T CD4⁺ obtenidas de ratones WT produjeron IL-13 murina e IL-13 no murina (FIG. 7B).

35 Hiper-Reactividad de las Vías Respiratorias

Los anticuerpos anti-IL-13 731 y 623 fueron sometidos a ensayo en modelos de asma inducida por OVA utilizando los ratones con IL-13 humanizada descritos antes. Para la medición de la reactividad de las vías respiratorias a la administración intravenosa de acetilcolina, se utilizó un protocolo de 24 días. Brevemente, se inmunizaron los ratones mediante una inyección intraperitoneal de OVA (10 µg; calidad bruta IV; Sigma) en PBS (0,2 ml). El PBS se utilizó como control. Catorce días después de la inmunización; los ratones fueron anestesiados con una mezcla de cetamina y xilazina [45 y 8 mg por kilogramo de peso corporal (mg/kg), respectivamente] y se sensibilizaron intratraquealmente con 50 µl de una solución al 1,5% de OVA o un volumen equivalente de PBS como control.

Siete días después de la primera sensibilización con antígeno, los ratones se sensibilizaron de nuevo intratraquealmente con OVA o PBS. Los anticuerpos 731 y 623 se administraron intraperitonealmente a una dosis de 100 µg/ratón un día antes de cada sensibilización (días 13 y 20). Los ratones de control recibieron PBS o un control de isotipo IgG2 irrelevante. Tres días después de la sensibilización intratraqueal final, los ratones fueron anestesiados con pentobarbital sódico (90 mg/kg), intubados, ventilados a una tasa de 120 respiraciones/minuto con un volumen tidal constante de aire (0,2 ml), y paralizados con bromuro de decametónio (25 mg/kg). Después de establecer una presión de las vías respiratorias estable, se inyectó intravenosamente acetilcolina (50 µg/kg), y se midió la presión de las vías respiratorias dinámicas durante 5 minutos. Se midió la hipersensibilidad de las vías respiratorias (AHR) a la sensibilización con acetilcolina. La hipersensibilidad de las vías respiratorias a la sensibilización con acetilcolina es definida por el aumento integrado en el tiempo de la presión pico en las vías respiratorias [índice de presión en las vías respiratorias-tiempo (APTI) en centímetros de H₂O x segundo]. * P<0,005, en comparación con el grupo de control con OVA + IgG2 [análisis de la varianza de una vía (ANOVA) seguido de un test de las menores diferencias significativas de Fisher para múltiples comparaciones]. El tratamiento con 731 o 623 dio como resultado una reversión completa de la AHR inducida por OVA (FIG. 8). En este ejemplo, la reversión completa significa que la adición del anticuerpo con OVA da como resultado un efecto similar a aquél en el que no hay OVA y se añaden solamente anticuerpos (p. ej., IgG2). n=4 ratones/grupo en los grupos con PBS, PBS+IgG2, PBS+731 y OVA; n=5 ratones/grupo en el grupo con OVA+IgG2; n=6 ratones/grupo en el grupo con PBS+623 y OVA+731; n=8 ratones/grupo en el grupo con OVA+623. Los datos son la media ± ET.

65 Producción de Mucus Inducida por OVA

Se utilizó un protocolo de 18 días para la medida de la producción de mucus inducida por OVA. Tras el cebado

subcutáneo con Ovoalbúmina (OVA, 25 µg; calidad bruta IV) (Sigma) en 2 mg de Inject Alum los días 0 y 7, los ratones fueron anestesiados con isofluorano y sensibilizados intranasalmente con 50 µl de una solución al 1,5% de OVA en PBS los días 14, 15, y 17. Los ratones de control recibieron alumbre como cebado o PBS como sensibilización.

Los anticuerpos 731 y 623 fueron administrados intraperitonealmente a una dosis de 100 µg/ratón los días 13, 15, y 17. Los ratones de control recibieron PBS. El día 18 los ratones fueron sacrificados y los pulmones fueron recogidos después de haber sido perfundidos. El tejido pulmonar, incluyendo las vías respiratorias centrales y periféricas, fue fijado en formalina al 10%, lavado con etanol del 70%, deshidratado, embebido en metacrilato de glicol, cortado en secciones de 4 µM, montado en portas, y teñido con hematoxilina y eosina, más Ácido peryódico-Schiff (PAS). Se examinaron las secciones de pulmón (una sección por animal) a un aumento 20x. Se seleccionaron cinco campos al azar y para cada sección se contó el número de bronquios de cada campo. Las secciones se puntuaron en una escala de 0 a 4 (0: <5% células caliciformes PAS⁺; 1: de 5 a 25%; 2: de 25 a 50%; 3: de 50 a 75%; 4: >75%). Para obtener la puntuación histológica de células caliciformes (expresada como unidades arbitrarias; U) la suma de las puntuaciones de las vías respiratorias de cada pulmón se dividió por el número de bronquios examinados. Cinco de los ocho ratones murieron en el grupo tratado con OVA. No murió ningún ratón en los demás grupos. La administración de 731 y 623 revirtió eficazmente el incremento inducido por OVA en las células que contenían mucus en las vías respiratorias (FIG. 9). Los datos son la media ± ET. n=3 para el grupo con OVA/OVA/PBS (inicialmente n=8); n=8 para el grupo con OVA/OVA/731, n=4 para el grupo con OVA/OVA/623; n=4 para el grupo con OVA/PBS/PBS, n=5 para los grupos con Alumbre/OVA/PBS, y Alumbre/PBS/PBS. *p<0,01 vs grupo OVA/OVA/PBS por medio del test de la t de Student no emparejado.

El uso anterior de los modelos murinos y las medidas de mucus y AHR para someter a ensayo el asma es un modelo exacto y científicamente aceptado para someter a ensayo la eficacia de un fármaco para tratar el asma. (Willis-Karp M., Murine models of asthma in understanding dysregulation in human asthma. *Immunopharmacology*, 25:48:263-8 (2000)). Por otra parte, se pronostica que el modelo es fiable para aquellos trastornos relacionados con IL-13 que comparten síntomas que son similares a al menos uno de los síntomas mostrados en estos modelos de ratón. Como tales, este y otros modelos animales semejantes serán suficientes para someter a ensayo de un modo similar los otros trastornos relacionados con IL-13 identificados.

EJEMPLO 4: ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE ANTICUERPOS

Se secuenciaron las cadenas pesadas variables y las cadenas ligeras variables para los anticuerpos mostrados en la Tabla 1 para determinar sus secuencias de ADN. La información de la secuencia completa para todos los anticuerpos anti-IL-13 se muestra en la lista de secuencias presentada adjunta, incluyendo las secuencias de nucleótidos y aminoácidos.

La Tabla 18 muestra las secuencias de aminoácidos de los genes de la cadena pesada para una variedad de los anticuerpos para IL-13 descritos en la presente memoria. La Tabla 18 también muestra las secuencias de aminoácidos correspondientes a las CDR y las regiones marco para cada anticuerpo, junto con una comparación con su secuencia de la línea germinal.

La Tabla 19 muestra las secuencias de aminoácidos de los genes de la cadena ligera kappa para una variedad de los anticuerpos para IL-13 descritos en la presente memoria. La Tabla 19 también muestra las secuencias de aminoácidos correspondientes a las CDR y las regiones marco para cada anticuerpo, junto con una comparación con su secuencia de la línea germinal.

La Tabla 20 muestra las secuencias de aminoácidos de los genes de la cadena ligera lambda para una variedad de los anticuerpos para IL-13 descritos en la presente memoria. La Tabla 20 también muestra las secuencias de aminoácidos correspondientes a las CDR y las regiones marco para cada anticuerpo, junto con una comparación con su secuencia de la línea germinal.

Tabla 18

Célula Individual	SEQ ID NO	V Pesada/D/J	FR1	CDR1	FR2
-	81	Línea germinal VH3 - 21/D1 - 26/JH3b	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYSMN	WVRQAPGKGLEWVS
157	22		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYSMN	WVRQAPGKGLEWVS
183	30		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYSMN	WVRQAPGKGLEWVS
176	26		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYSMN	WVRQAPGKGLEWVS
243	18		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYSMN	WVRQAPGKGLEWVS
264	14		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYSMN	WVRQAPGKGLEWVS
	82	Línea germinal	QVQLQESGGGLVKPSETLSLTCTVS	GGSISSYYWS	WIRQPPGKGLEWIG
353	6	VH4 - 59/D2 - 21/JH3B	QVQLQESGGGLVKPSETLSLTCTVS	GGSISSYYWS	WIRQPPGKGLEWIG
-	83	Línea germinal	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYAMS	WVRQAPGKGLEWVS
713	34	VH3 - 23/D6 - 19/JH6B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYAMS	WVRQAPGKGLEWVS
731	38		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYAMS	WVRQAPGKGLEWVS
-	84	Línea germinal	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYAMS	WVRQAPGKGLEWVS
785	58	VH3 - 23/D3 - 3/JH4B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYAMS	WVRQAPGKGLEWVS
-	85	Línea germinal	QVQLQESGGGLVKPSETLSLTCTVS	GGSISSYYWS	WIRQAPGKGLEWIG
693	42	VH4 - 4/D5 - 5/JH4B	QVQLQESGGGLVKPSETLSLTCTVS	GGSISSYYWS	WIRQAPGKGLEWIG
-	86	Línea germinal	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS	GFTFSNAWMS	WVRQAPGKGLEWVG
623	50	VH3 - 15/D1 - 26/JH6B	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS	GFTFSNAWMS	WVRQAPGKGLEWVG
643	46		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS	GFTFSNAWMS	WVRQAPGKGLEWVG
602	54		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS	GFTFSNAWMS	WVRQAPGKGLEWVG
-	87	Línea germinal	QVQLVESGGGVQPGRSRLRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
11.18	2	VH3 - 33/D6 - 19/JH5B	QVQLVESGGGVQPGRSRLRLSCVAS	GFTFSSYDMH	WVRQAPGKGLEWVA
-	88	Línea germinal	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYSMN	WVRQAPGKGLEWVS

356	10	VH3-21/NA/JH6B	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS	GFTFSDYNMH	WVRQAPFGKLEWVS
-----	----	----------------	---------------------------	------------	----------------

Tabla 18 (cont.)

Célula Individual	SEQ ID NO	CDR2	FR3	CDR3	FR4
-	81	SISSSSYIYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA R		WGQGTMTVTSS
157	22	YISTSYNVIYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA R	DQVGATLDAFDI	WGQGTMTVTSS
183	30	YISSSYNIYYGDSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA R	DQVGATLDAFDI	WGQGTMTVTSS
176	26	YISTSNSYIYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA R	DQVGATLDAFDI	WGQGTMTVTSS
243	18	YISTSNSYIYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA R	DQVGATLDAFDI	WGQGTMTVTSS
264	14	YISTSNSYIYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA R	DQVGATLDAFDI	WGQGTMTVTSS
	82	YIYSGSTNYPNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLKLSSTVAADTAVYYCA R		WGQGTMTVTSS
353	6	YIYSGSTNYPNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLKLSSTVAADTAVYYCA R	DGGHYWDDAFDI	WGQGTMTVTSS
-	83	AISGGGSTYYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA K		WGQGTMTVTSS
713	34	AFSGGGSTYYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCV Q	DGLGPYFYNYGMDV	WGQGTMTVTSS
731	38	AFSGGGSTYYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCV Q	DGLGPYFYNYGMDV	WGQGTMTVTSS
-	84	AISGGGSTYYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA K		WGQGTMTVTSS
785	58	AISGGGSTYYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA K	ADFWSGTLNGFDY	WGQGTMTVTSS

-	85	RIYTGSTNYNPSLKS	RVTMSVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCA R	WGQGLVTVSS
693	42	RIYMTGRNTNSSLKS	RVTMSIDTSKNQSLKLSFMTAADTAVYYCA R	WGQGLVTVSS
-	86	RIKSKIDGGTTDYAAPVK G	RFTISRDDSKNTLYLQMNLSLKTEDTAVYYCT T	WGQGLVTVSS
623	50	RIRSEIDGGTTNYAAPVK G	RFTISRDDSKNTLYLQMNLSLKTEDTAVYYCA T	WGQGLVTVSS
643	46	RIRSEIDGGTTNYAAPVK G	RFTISRDDSKNTLYLQMNLSLRTEDTAVYYCA T	WGQGLVTVSS
602	54	RIRSKIDGGTTNYAAPVK G	RFTISRDDSKNTLYLQMNLSLKTEDTAVYYCA T	WGQGLVTVSS
-	87	VIWYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCA R	WGQGLVTVSS
11.18	2	VIWYDGSNKYYADSVQG	RFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCT S	WGQGLVTVSS
-	88	SISSSSYIYYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCA R	WGQGLVTVSS
356	10	SISYSSTIYYADSVRG	RFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVFYCA R	WGQGLVTVSS

Tabla 19

Célula Individual	SEQ ID NO	Ligera - - V Kappa/J	FR1	CDR1	FR2
157	89	Línea Germinal	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC	RASQIGRNDLG	WYQQKPGKAPKRLIY
183	24	A30 (VK1) / JK3	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC	RASQIGDDLG	WYQQKPGKAPKRLIY
176	32		DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC	RASQIGDDLG	WYQQKPGKAPKRLIY
243	28		DIQMTQSPSSLSASVGDRTVFTC	RASQDITDDL	WYQQKPGKAPKRLIY
264	20		DIQMTQSPSSLSASVGDRTVFTC	RASQDITDDL	WYQQKPGKAPKRLIY
353	16		DIQMTQSPSSLSASVGDRTVFTC	RASQDITDDL	WYQQKPGKAPKRLIY
	8		DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC	RASQIGRNDLG	WYQQKPGKAPKRLIY
-	90	Línea Germinal	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC	RASQIGNTYLA	WYQQKPGKVPKLLIY

11.18	4	A20/JK3	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQGISNYLA	WYQQKPGKVPKVLII
-	91	Línea Germinal A20/JK2	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQIRNDLG	WYQQKPGKAPKRLII
356	12		DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQIRNDLG	WYQQKPGKAPKRLII

Tabla 19 (Cont.)

Célula Individual	SEQ ID NO	CDR2	FR3	CDR3	J
157	89	AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC		FGPGTKVDIK
183	24	AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC	LQHNSYPFT	FGPGTRVDIK
176	32	AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC	LQHNSYPFT	FGPGTKVDIK
243	28	AASSLQS	GVPPRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC	LQHNSYPFT	FGPGTKVDIR
264	20	AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC	LQHNSYPFT	FGPGTKVDIR
353	16	AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC	LQHNSYPFT	FGPGTKVDIR
	8	DASSLQS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC	LQHDSYPFT	FGPGTKVDIK
-	90	AASTLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC		FGPGTKVDIK
11.18	4	AASTLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC	QKINSAPFT	FGPGTKVDIK
-	91	AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC		FGQGTKLEIK
356	12	AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC	LQHNSYPWT	FGQGTKVEIK

Tabla 20

Célula Individual	SEQ ID NO	Ligera -V- Lambda/J	FR1	CDR1	FR2
-	92	V2-1/JL1	SYELTQPPSVSVSPQQTASITC	SGDKLGDKYAC	WYQQKPGQSPVLVIY
713	36		SYELTQPPSVSVSPQQTASITC	SGDKLGDKYTC	WFQKKPGQSPVLVIY
731	40		SYELTQPPSVSVSPQQTASITC	SGDKLGDKYAC	WFQKKPGQSPVLVIY
-	93	Línea Germinal V2-14/JL2	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITC	GGNNIGSKSVH	WYQQKPGQAPVLVVIY
693	44		SYVLTQPPSVSVAPGQTARITC	GGNNIGSKGVH	WYQQKPGQAPVLVVIY
785	60		SYVLTQPPSVSVAPGQTARITC	GGNNIGNKIVH	WYQQKPGQAPVLVVIY
-	94	Línea Germinal	SYELTQPPSVSVSPGQTARITC	SGDALPKKYAY	WYQQKSGQAPVLVIY

623	52	V2 - 7 / JL3	SYELTQPPSVSVSPGQTARITC	SGDALPEKYAY	WYQQKSGQAPVLVIY
643	48		SYELTQPPSVSVSPGQTARITC	SGDALPEKYAY	WYQQKSGQAPVLVIY
602	56		SYELTQPPSVSVSPGQTARITC	SGDALPEKYAY	WYQQKSGQAPVLVIY

Tabla 20 (Cont.)

Célula Individual	SEQ ID NO	CDR2	FR3	CDR3	J
-	92	QDSKRPS	GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC		FGTGTKVTVL
713	36	HDSKRPS	GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC	QAWDSSTVY	FGTGTKVTVL
731	40	HDSKRPS	GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC	QAWDSSTVY	FGTGTKVTVL
-	93	DDSDRPS	GIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYC		FGGGTKLTVL
693	44	DDSDRPS	GIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYC	QVWVSSSDHHVV	FGGGTKLTVV
785	60	DDSDRPS	GIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYC	QVWVSSSDHHVV	FGGGTKLTVL
-	94	EDSKRPS	GIPERFSGSSSGTMTLTISGAQVEDEADYYC		FGSGTKLTVL
623	52	EDSKRPS	GIPERFSGSSSGTMTLTISGAQVEDEADYYC	HSTDSSGNHGV	FGSGTKLTVL
643	48	EDSKRPS	GIPERFSGSSSGTMTLTISGAQVEDEADYYC	HSTDSSGNHGV	FGSGTKLTVL
602	56	EDTKRPS	GIPERFSGSSSGTMTLTISGAQVEDEADYYC	YSTDSSGNHGV	FGSGTKLTVL

En algunas realizaciones, se utilizan las secuencias anteriores para generar variantes de los anticuerpos. Por ejemplo, la creación de variantes puede implicar el uso de las secuencias anteriores y la interrupción estructural (por secciones o regiones del anticuerpo) de las secuencias para identificar regiones idénticas, similares y no conservadas del anticuerpo. Las secciones del anticuerpo que están muy conservadas o son idénticas se mantendrán en la variante, mientras que se puede permitir que las secciones que varían enormemente entre los anticuerpos varíen en la nueva variante. De este modo, se pueden crear fácilmente variantes "conservadas" utilizando la lista anterior de secuencias de anticuerpos. Como apreciará un experto en la técnica, ya existen muchas variantes enumeradas antes, p. ej., 713 y 731 o 623 y 643 que difieren en sus secuencias de aminoácidos. En algunas realizaciones, se permite que difieran no más del 40% de los aminoácidos en cada una de las secciones anteriores (p. ej., CDR1, CDR2, CDR3, FR1, J, etc.), por ejemplo, se permite que el 40-30, 30-20, 20-15, 15-10, 10-5, 5-2, 2-1, o 1% o menos de los aminoácidos de cada sección se cambien por aminoácidos no conservativos para que el anticuerpo resultante se considere un anticuerpo variante. Como se demuestra en la presente memoria, las variantes parecen conservar sus diferentes funciones. Se pueden encontrar pautas adicionales en la identificación de anticuerpos que se unen al mismo epítipo y después analizar las secuencias en busca de similitudes estructurales (primaria, secundaria, terciaria, etc.) solo entre esos anticuerpos.

En algunas realizaciones, también se contemplan los anticuerpos que se unen a IL-13, con al menos un subgrupo de la secuencia identificada más arriba. Por ejemplo, se puede utilizar un anticuerpo completamente humano para IL-13 con una región CDR1 como se ha descrito antes, o, más concretamente, con una región CDR1 que tiene la secuencia GFTF en ella. De un modo similar, también se puede utilizar un anticuerpo con una región CDR2 de la cadena ligera que termina en Kn o una región CDR2 de la cadena pesada que termina en VKG, o una región CDR3 que empieza por GMDV. De un modo similar, cualquiera de las secuencias o subsecuencias anteriores puede ser utilizada, especialmente cuando las secuencias son comunes a todos los anticuerpos.

Como se observa en la presente memoria, en algunas realizaciones, los anticuerpos se unen con la misma afinidad a IL-13 que lo hace a otras variantes de IL-13. En algunas realizaciones, las otras variantes de IL-13 incluyen la variante Q110R. Tales anticuerpos, y sus variantes, pueden ser creados mediante los métodos descritos más arriba. Se pueden encontrar pautas adicionales mediante comparaciones de secuencias para identificar las regiones conservadas en los anticuerpos que se unen con una afinidad similar a la IL-13 de tipo salvaje y a otras variantes de IL-13. Las variantes de IL-13 son conocidas en la técnica y son fácilmente identificadas por los expertos en la técnica. Los ejemplos de las variantes de IL-13 pueden ser encontrados en Heinzmann et al., (Genetic variants of IL-13 signaling and human asthma and atopy, *Human Molecular Genetics*, 9:549-559 (2000)).

EJEMPLO 5: USO DE ANTICUERPOS ANTI-IL-13 COMO AGENTES DE DIAGNÓSTICO PARA LA DETECCIÓN DE IL-13 EN UNA MUESTRA

Se puede desarrollar un Análisis de Inmunoabsorción con Enzima Ligada (ELISA) para la detección de IL-13 en una muestra. En el análisis, los pocillos de una placa de microtitulación, tal como una placa de microtitulación de 96 pocillos, o una placa de microtitulación de 384 pocillos, son adsorbidos durante varias horas con un primer anticuerpo monoclonal completamente humano dirigido contra IL-13. El anticuerpo inmovilizado sirve como anticuerpo de captura para IL-13 que puede estar presente en una muestra de ensayo. Los pocillos se enjuagan y se tratan con un agente de bloqueo tal como proteína de leche o albúmina para evitar la adsorción no específica del analito.

Con posterioridad los pocillos se tratan con una muestra de ensayo que se sospecha que contiene IL-13, o con una solución que contiene una cantidad patrón de los antígenos.

Después de enjuagar la muestra de ensayo o patrón, los pocillos se tratan con un segundo anticuerpo anti-IL-13 monoclonal completamente humano que está etiquetado por conjugación con biotina. El anticuerpo anti-IL-13 etiquetado sirve como anticuerpo de detección. Después de enjuagar el exceso de segundo anticuerpo, los pocillos se tratan con peroxidasa de rábano picante conjugada con avidina (HRP) y un sustrato cromogénico adecuado. La concentración del antígeno en las muestras de ensayo se determina mediante comparación con una curva patrón desarrollada a partir de muestras patrón.

EJEMPLO 6: TRATAMIENTO DE EPOC EN SERES HUMANOS

Se identifica un paciente que padece EPOC. Se administra al paciente una dosis de 5 mg/kg de anticuerpo anti-IL-13 623 y/o 731 mediante inyección intravenosa. Se determina el nivel de eotaxina, C10 y/o TARC en el paciente. Si el nivel de eotaxina, C10, y/o TARC es demasiado elevado, se administra mAb al paciente hasta obtener un nivel "normal" de eotaxina, C10, y/o TARC. El anticuerpo anti-IL-13 causa la inhibición de la producción de mucus, el desarrollo de hiperplasia del epitelio bronquial, y el espasmo de la musculatura lisa bronquial. Esta inhibición de la producción de mucus y de la contracción de la musculatura lisa reduce el bloqueo del paso de aire con una mejora de la ventilación.

EJEMPLO 7: TRATAMIENTO DE BRONQUITIS CRÓNICA EN SERES HUMANOS

Se identifica un paciente que padece EPOC caracterizada por bronquitis crónica. Se administra al paciente mediante inyección intravenosa, una dosis de 5 mg/kg de un anticuerpo anti-IL-13 descrito en la presente memoria, preferiblemente 623 o 731. Se determina el nivel de eotaxina, C10, y/o TARC en los pacientes. Si el nivel de eotaxina, C10, y/o TARC es demasiado elevado, se administra al paciente mAb adicional hasta que se obtiene un nivel "normal" de eotaxina, C10, y/o TARC. El anticuerpo anti-IL-13 ocasiona una inhibición parcial o completa de la producción de mucus y de la contracción de la musculatura lisa bronquial en los tejidos respiratorios inflamados. Esta inhibición de la producción de mucus y de la contracción de la musculatura lisa reduce el bloqueo del paso de aire con una mejora de la ventilación.

EJEMPLO 8: TRATAMIENTO DEL ENFISEMA EN SERES HUMANOS

Se identifica un paciente que padece enfisema. Se administra al paciente mediante inyección intravenosa, una dosis de 5 mg/kg de un anticuerpo anti-IL-13. Se determina el nivel de eotaxina, C10, y/o TARC en el paciente. Si el nivel de eotaxina, C10, y/o TARC es demasiado elevado, se administra al paciente mAb adicional hasta que se obtiene un nivel "normal" de eotaxina, C10, y/o TARC. El anticuerpo anti-IL-13 ocasiona un descenso parcial o completo del producto infiltrado de células inflamatorias en los tejidos respiratorios. Adicionalmente, el anticuerpo anti-IL-13 puede bloquear la capacidad que tiene IL-13 para inducir proteasas dañinas para el tejido.

EJEMPLO 9: TRATAMIENTO DEL ASMA EN SERES HUMANOS

Se identifica un paciente que padece asma. Se administra al paciente mediante inyección intravenosa, una dosis de 5 mg/kg de un anticuerpo anti-IL-13 descrito en la presente memoria, preferiblemente 623 o 731. Se determina el nivel de eotaxina, C10, y/o TARC en el paciente. Si el nivel de eotaxina, C10, y/o TARC es demasiado elevado, se administra al paciente mAb adicional hasta que se obtiene un nivel "normal" de eotaxina, C10, y/o TARC. Se proporciona después una administración de refuerzo. El anticuerpo anti-IL-13 reduce la gravedad del daño tisular en los pulmones y el paso de aire ocasionado por la respuesta inmunitaria del paciente.

EJEMPLO 10: MAPEO DEL EPÍTOPO DE IL-13 CONFORMACIONAL RECONOCIDO POR MAB 623.

Se generó una matriz de péptidos solapantes (similar a la descrita en el Ejemplo 2) que abarcaba la secuencia de IL-13 humana para determinar con mayor especificidad dónde se une el mAb 623 a IL-13. Debido a que el mapeo fue insuficiente con los procedimientos convencionales, se utilizó un protocolo optimizado especialmente adecuado para la detección de sitios de unión conformacionales. Se sondearon con mAb 623 los barridos peptídicos que contenían péptidos derivados de IL-13 humana de 12 unidades desplazados por un aminoácido. La unión de mAb 623 a estos péptidos derivados de IL-13 humana de la matriz fue analizada mediante transferencia electroquímica del anticuerpo unido al péptido sobre membranas PVDF, seguida de detección con un anticuerpo anti-IgG humana marcado con peróxidos y quimioluminiscencia. Se identificó una región de unión. Parece que el epítipo de mAb 623 para IL-13 incluye la secuencia TQNQKAPLCN (SEQ ID NO: 95) (residuos 20-29 del bucle A, del SEQ ID NO: 96, FIG. 10).

EJEMPLO 11: ESCRUTINIO DE ALTA RESOLUCIÓN DE IL-13 HUMANA CON MAB 623

Este ejemplo proporciona un análisis de alta resolución adicional y un resultado para las características de unión del mAb 623 para IL-13 humana. Se acopló con amina un Ab monoclonal anti-humano de cabra (específico de Fc) para las cuatro células de flujo de un chip Biacore® CM5 a una elevada capacidad de superficie (4800-5400 unidades de resonancia, UR, de pAb) con un aparato Biacore 2000®. El tampón de desplazamiento y el tampón de preparación de la muestra para todos los experimentos fue HBS-P desgasificado que contenía 100 µg/ml de BSA. El mAb 623 fue diluido hasta 10,1 µg/ml en HBS-P para capturar el mAb sobre la superficie del biosensor. El mAb 623 fue capturado sobre las células de flujo 1, 2, y 4. Como promedio, fueron capturadas 552, 211, y 390 UR de mAb, respectivamente, sobre las células de flujo tridimensionales para cada ciclo utilizando velocidades de flujo que variaban entre 10-50 µl/min para lograr tiempos de contacto que variaban entre 12-60 segundos. La célula de flujo tres sirvió como control. Todas las inyecciones con antígeno IL-13 (R&D Systems) fueron a 23°C con una velocidad de flujo de 100 µl/min. Se inyectaron al azar muestras diluidas seriadamente (a la mitad) de 12,6-0,394 nM por triplicado durante 60 segundos con varias inyecciones de tampón intercaladas para una referencia doble. La fase de disociación de los sensogramas se siguió durante 30 minutos. La superficie de captura fue regenerada con una inyección, 15 segundos, de ácido fosfórico 146 mM, pH 1,5. Los datos del sensograma se procesaron utilizando la versión Scrubber 1.1g. Los datos de las tres células de flujo se ajustaron globalmente a un modelo de interacción 1:1 incluyendo un término para el transporte de masa; se dejó que los valores R_{max} para cada célula de flujo se ajustaran localmente como es apropiado en este caso puesto que los niveles de captura fueron diferentes en cada una de las tres células de flujo. El modelo ajustó los datos satisfactoriamente y dio los resultados $K_a = 7,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_d = 2,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $K_D = 34 \text{ pM}$.

EJEMPLO 12: KINEXA 623 Y 731 PARA IL-13 DE TITÍ COMÚN

Este ejemplo proporciona los datos de afinidad para mAb 623 y mAb 731 para IL-13 de tití común a partir del análisis KINEXA. Se realizaron experimentos con K_D controlada así como antígeno controlado, de un modo similar a los otros experimentos KINEXA, para IL-13 de tití común con mAb 623. El análisis de la curva n reveló que la K_D final

era 403 pM. También se realizaron numerosos experimentos para mAb 731 y mediante análisis de la curva n, se determinó que la K_D para 731 era < 7 pM.

EJEMPLO 13: ESCRUTINIO DE LA RESOLUCIÓN DEL MEDIO DE LOS MAB 623 Y 731 CON VARIANTES DE IL-13 HUMANA (IL-13Q110R)

Este ejemplo presenta las características de unión de mAb 623 y el mAb 731 para IL-13Q110R. Se utilizó la resonancia de plasmón superficial libre de etiqueta (SPR), o un dispositivo Biacore®, para medir la afinidad del anticuerpo para el antígeno. Para este fin, se preparó una superficie de anticuerpo humano α de cabra de alta densidad sobre un chip Biacore® CM5 utilizando el acoplamiento con amina rutinario sobre un aparato Biacore 2000®. El mAb 731 se diluyó a 4,7 $\mu\text{g/ml}$ y el mAb 623 a 5,2 $\mu\text{g/ml}$ en tampón de desplazamiento HBS-P desgasificado (solución salina tamponada con Hepes que contenía Polisorbato 20 al 0,005%) que contenía 100 Mg/ml de BSA. Se desarrolló un protocolo de captura para ambos mAb. Antes de la inyección con cada muestra de antígeno, se capturó cada mAb sobre una célula de flujo diferente durante 30 segundos a una velocidad de flujo de 10 $\mu\text{l/min}$. Siguió una etapa de lavado, de cuatro minutos, a 100 $\mu\text{l/min}$, para estabilizar la línea base de mAb. La variante de IL-13 humana (Preprotech, Inc.) se inyectó durante 90 segundos a un intervalo de concentración de 23,6-0,185 nM (2x dilución seriada) seguido de una disociación de 15 minutos. Las muestras de variante de IL-13 se prepararon en HBS-P que contenía 100 $\mu\text{g/ml}$. Todas las muestras se inyectaron al azar por triplicado con varias inyecciones de tampón intercaladas para una referencia doble. Se regeneraron las superficies de anticuerpo humano α de cabra de alta densidad con un pulso de 15 segundos de ácido fosfórico 146 mM (pH 1,5) después de cada ciclo. Se utilizó una velocidad de flujo de 100 $\mu\text{l/min}$ para todos los ciclos de inyección de IL-13 variante. Los datos del sensograma se procesaron utilizando Scrubber 1.1 g y se ajustaron en Clamp 2000 para un modelo de interacción 1:1 con la inclusión de un término para el transporte de masa. Las constantes de unión resultantes se enumeran en la Tabla 21. Los grupos de datos para los mAb fueron de alta calidad mostrando una alta reproducibilidad. Un modelo de interacción 1:1 describió ambos complejos de IL-13/mAb adecuadamente.

Tabla 21

Muestra	R_{max}	K_a ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (pM)
731	45	$5,11 \times 10^6$	$5,02 \times 10^{-5}$	9,8
623	26	$5,62 \times 10^6$	$2,18 \times 10^{-4}$	38,8

EJEMPLO 14: INHIBICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE EOTAXINA INDUCIDA POR IL-13 Y VARIANTE IL13Q110R

Este ejemplo presenta datos adicionales referentes a la capacidad de los anticuerpos para inhibir las variantes de IL-13 y para inhibir la producción de eotaxina. Se sometieron a ensayo los anticuerpos anti-IL-13 en busca de su capacidad para inhibir la producción de eotaxina en células HDFa, una línea celular de fibroblastos dérmicos humanos primarios que expresa IL-13R α 1, IL-13R α 2 e IL-4R α . Las células se sembraron durante la noche a 4000 células/pocillo en placas de 96 pocillos. Por separado, se pre-incubó IL-13 o IL-13Q110R durante una hora a 37°C a 300 pM con o sin anticuerpos anti-IL-13 a una concentración inicial de 10 nM. La mezcla de IL-13 o IL-13Q110R y anticuerpo se añadió después a las células tratadas con 50 ng/ml de TNF α y se incubó durante 2 días a 37°C. En este punto los sobrenadantes se recogieron y se analizaron en busca de la presencia de eotaxina utilizando un ELISA cuantitativo. Los experimentos se realizaron dos o tres veces con datos puntuales por triplicado. Los resultados se presentan en la Tabla 22 de más abajo. También están incluidas las CI50 para la IL-13 medida en este análisis. Las FIG. 11A-D muestran el porcentaje de inhibición de la liberación de eotaxina inducida por IL-13 o variante IL-13Q110R por los anticuerpos recombinantes 623 y 731 en comparación con un control de isotipo coincidente, p. ej., un anticuerpo monoclonal de control IgG2.

Tabla 22

	CI ₅₀ (pM)			
	IL-13 300 pM	IL-13Q110R 300 pM	IL-13 600 pM	IL-13Q110R 600 pM
623	56	106	113	277
731	28	54	56	140

EJEMPLO 15: NEUTRALIZACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD DE IL-13 IN VITRO POR 623 Y 731

Este ejemplo demuestra la capacidad de los anticuerpos para inhibir la proliferación de las células HDLM-2 y L-1236, dos líneas celulares derivadas de linfoma de Hodgkin sensibles a IL-13. Se ha demostrado que estas dos líneas celulares no solamente secretan IL-13 si no que también utilizan esta citoquina como factor de crecimiento, posiblemente por medio de un mecanismo autocrino o paracrino (Trieu et al., Claudio JO et al., Soluble interleukin-13R α 2 decoy receptor inhibits Hodgkin's lymphoma growth in vitro and in vivo, *Cancer Res*, 64:3271-3275 (2004)). Después de 72 horas de incubación con el compuesto relevante, se evaluó la proliferación celular mediante la incorporación de 3H-timidina. Se calculó el porcentaje de proliferación celular en presencia de inhibidor en comparación con pocillos de control con células solas (producción 100%). Los valores se trazaron como la concentración (nM) de inhibidor de IL-13 vs porcentaje de proliferación celular. Los datos representan la media de

cinco (análisis con L-1236) y cuatro (análisis con HDLM-2) experimentos. La neutralización de IL-13 por medio del mAb623 y el mAb 731 dio como resultado una inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de ambas líneas celulares (FIG. 12A y FIG. 12B). El mAb 623 tuvo una CE_{50} de 390 pM en el análisis de proliferación de L-1236 (FIG. 12A) y de 4,5 nM en el análisis de proliferación de HDLM-2 (FIG. 12B). 731 tuvo una CE_{50} de 5,2 pM en el análisis de proliferación de L-1236 (FIG. 12A) y de 0,18 nM en el análisis de proliferación de HDLM-2 (FIG. 12B). hIL-13E α 2/Fc tuvo una CE_{50} de 59 pM en el análisis de proliferación de L-1236 (FIG. 12A) y de 0,6 nM en el análisis de proliferación de HDLM-2 (FIG. 12B). Los niveles de IL-13 medidos en el sobrenadante de las células HDLM-2 y L-1236 fueron de 2,6 ng/ml y de 118 pg/ml respectivamente.

EJEMPLO 16: INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CD23 INDUCIDA POR IL-13 EN LINFOCITOS B

Se ha demostrado que IL-13 induce la regulación al alza de CD23 en linfocitos B (Punnonen et al., Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:3730-3734 (1993)). Este Ejemplo demuestra la capacidad de los mAb 623 y 731 para inhibir la expresión inducida por IL-13 de CD23 sobre los linfocitos B de sangre completa. Se añadieron concentraciones crecientes de mAb 623, mAb 731 o control de isotipo a sangre completa humana en presencia de IL-13 humana recombinante (10 ng/ml). Después de 24 horas a 37°C, las células B se inmunotifñeron utilizando anticuerpos anti-CD19 y anti-CD23 y se analizaron por medio de FACS. Los resultados (FIG. 13) se expresaron como la expresión de la Media Geométrica de las células CD23 y CD19⁺ superficiales en comparación con los pocillos de control que contenían IL-13 solamente. Los datos representan la media de cuatro (hIL-13R α 2/Fc), seis (731) y once (623 y hlgG2) donantes.

La neutralización de IL-13 por los mAb 623 y 731 dio como resultado una inhibición dependiente de la dosis de la expresión de CD23 con una CI_{50} de 6,2 nM y 0,87 nM respectivamente. hIL-13R α 2/Fc tuvo una CI_{50} de 4,0 nM (FIG. 13).

EJEMPLO 17: ENSAYO ADICIONAL DE MAB 623 Y 731 EN MODELOS DE ASMA

Como se ha observado antes, puesto que el mAb 623 y el mAb 731 no presentan reacción cruzada con la IL-13 murina, se generaron ratones con IL-13 humanizada a partir de ratones 129 x C57BL/6 mediante la desorganización genética del gen de la IL-13 murina a través de la introducción del ADNc que codificaba el gen de IL-13 humana (Lexicon, The Woodland, Texas).

ASMA INDUCIDA POR OVOALBÚMINA (OVA) ADICIONAL EN ESTUDIOS PROFILÁCTICOS CON RATONES HUMANIZADOS CON IL-13

ESTUDIO CON OVA PROFILÁCTICO A DOSIS FIJAS DE MAB 623 Y MAB 731

Este experimento se realizó de una manera similar a la del Ejemplo 3 anterior, utilizando el protocolo de 24 días. Las muestras se examinaron en busca de la eficacia de los anticuerpos sobre la reducción de la producción de mucus inducida por OVA en las vías respiratorias. De este modo, el ejemplo demuestra la eficacia de los anticuerpos en el tratamiento del asma y trastornos relacionados con IL-13 similares.

Para examinar el efecto del mAb 623 y del mAb 731 sobre el contenido de mucus del epitelio de las vías respiratorias, se tiñeron rebanadas de pulmón con hematoxilina y eosina más ácido peryódico-Schiff (PAS). Las secciones de pulmón (una sección por animal) se examinaron a un aumento 20x. Se seleccionaron al azar cinco campos en cada sección. En cada campo, se contó el porcentaje de células caliciformes positivas a PAS en cada bronquio. Los datos se expresan como el porcentaje medio de células caliciformes positivas a PAS/bronquio. Los datos son la media $\pm$ ET (mostrados en la FIG. 14). En los grupos de control el número de células caliciformes que contenían mucus por bronquio es menor del 4%. La sensibilización con ova aumentó el número de células que contenían mucus en los bronquios hasta 19% en el grupo con OVA y hasta 37% en el grupo con OVA + IgG2. Como se puede observar en la figura, el tratamiento con mAb redujo el porcentaje de células que contenían mucus en los bronquios hasta un 9%. El tratamiento con mAb 731 redujo el porcentaje de células que contenían mucus en los bronquios hasta un 2%.

Para examinar adicionalmente el efecto del mAb 623 y el mAb 731 sobre el reclutamiento de leucocitos en las vías respiratorias, después de las mediciones de AHR (Ejemplo 3), se sacrificaron los ratones y se recogió el fluido del lavado bronqueoalveolar (BALF) enjuagando los pulmones dos veces con 1 ml de PBS. Los recuentos celulares se determinaron mediante evaluación con microscopía óptica de las preparaciones de citosina. Los datos son la media $\pm$ ET y se muestran en la FIG. 15. El tratamiento con 623 o 731 no tuvo un efecto notable sobre el reclutamiento de leucocitos inducido por OVA en BALF.

DOSIS RESPUESTA PROFILÁCTICA A OVA CON MAB 623 Y MAB 731

Este ejemplo demuestra la dependencia de la dosis del efecto inhibitor del mAb 623 y el mAb 731 sobre la AHR, la producción de mucus y el reclutamiento de leucocitos en BALF inducidos por OVA,. Los ratones fueron inmunizados

de acuerdo con el protocolo de 24 días descrito antes en el Ejemplo 3 (utilizado para obtener los datos para la FIG. 8). Los días 13 y 20 se administraron i.p. mAb 623 o mAb 731 a dosis de 0,3, 1, 3, o 10 mg/kg. Los ratones de control recibieron PBS o una IgG2 irrelevante (10 mg/kg) como control de isotipo. Se determinó el APTI como se ha descrito antes (para la FIG. 8). n=4 ratones/grupo en los grupos con PBS, y OVA; n=6 ratones/grupo en los grupos con PBS + IgG2, y OVA + IgG2; n=7 ratones/grupo en los grupos con OVA + 623 (3 mg/kg), y OVA + 731 (0,3 mg/kg); n=8 ratones/grupo en los grupos con OVA + 623 (10 mg/kg), OVA + 623 (1 mg/kg), OVA + 623 (0,3 mg/kg), OVA + 731 (10 mg/kg), OVA + 731 (3 mg/kg), y OVA + 731 (1 mg/kg). Los datos son la media $\pm$ ET. A la dosis de 0,3 mg/kg ni 623 ni 731 inhibieron la AHR inducida por OVA, mientras las dosis de 1 mg/kg y superiores inhibieron la AHR a acetilcolina hasta la línea base (PBS) (véase. FIG. 16).

Esta sección del ejemplo demuestra adicionalmente la dependencia de la dosis del efecto inhibitor de mAb 623 y mAb 731 sobre la producción de mucus inducida por OVA. Los pulmones fueron recogidos y tratados como se ha descrito antes (para la FIG. 14). Los datos se expresan como el porcentaje medio de células caliciformes positivas a PAS/bronquio. Los datos son la media $\pm$ ET. Tanto el mAb 623 como el mAb 731 mostraron una inhibición dependiente de la dosis similar del % de células PAS+ en las vías respiratorias de ratones tratados con OVA (FIG. 17).

Esta sección del ejemplo demuestra adicionalmente que el mAb 623 y el mAb 731 no inhibían el reclutamiento de leucocitos inducido por OVA en BALF a ninguna de las dosis sometidas a ensayo (FIG. 18). Se recogió el BALF y se realizaron los recuentos de células como se ha descrito antes (en referencia a la FIG. 15). Los datos son la media $\pm$ ET.

En este experimento la IgG2 de control de isotipo sometido a ensayo a una dosis de 10 mg/kg inhibió la AHR inducida por OVA en 85%. Por otra parte la IgG2 de control de isotipo no tuvo efecto sobre la hiperplasia con mucus y causó un incremento aparente en el número de leucocitos de BALF en comparación con el grupo con OVA en 146%. De este modo, cabe esperar cierta variabilidad en la eficacia de los anticuerpos y la superación de esta variabilidad será una cuestión rutinaria a la luz de las presentes enseñanzas y el conocimiento de un experto en la técnica. Los resultados indican que se pueden requerir niveles elevados de anticuerpos para observar el fenotipo concreto de inhibición del reclutamiento de leucocitos inducido por OVA en BALF.

EJEMPLO 18: ASMA INDUCIDA POR ÁCAROS DEL POLVO DOMÉSTICO (HDM) EN RATONES CON IL-13 HUMANIZADA: ESTUDIOS PROFILÁCTICOS Y TERAPÉUTICOS

EJEMPLO CON HDM PROFILÁCTICO DOSIS RESPUESTA CON MAB623 Y MAB 731

El principal alérgeno del polvo doméstico proviene de los ácaros. Este Ejemplo utiliza un alérgeno clínicamente relevante y representativo para un modelo de asma. Un experto en la técnica consideraría este ejemplo y sus resultados por ser representativo de la eficacia de los anticuerpos en otros organismos, incluyendo los seres humanos.

Los días 1, 7 y 14 se sensibilizaron los ratones con tres administraciones intratraqueales de HDM (100 μ g) en 50 μ l de PBS. Los días -1, 6 y 13 se administraron intraperitonealmente 623 o 731 a dosis de 10, 3, 1, 0,3 mg/kg. Los ratones de control recibieron PBS o una IgG2 irrelevante (p. ej., control negativo) como control de isotipo a una dosis de 10 mg/kg. El día 17 se midió la reactividad de las vías respiratorias de los ratones a la administración intravenosa de acetilcolina como se ha descrito antes (FIG. 8). n=2 ratones/grupo en el grupo con PBS; n=3 ratones/grupo en los grupos con HDM, HDM + IgG2; n=4 ratones/grupo en los grupos con PBS + IgG2; n=6 ratones/grupo en los grupos con HDM + 731 (10 mg/kg), y HDM + 731 (0,3 mg/kg); n=8 ratones grupo en los grupos con HDM + 623 (10 mg/kg), HDM + 623 (3 mg/kg), OVA + 623 (1 mg/kg), HDM + 623 (0,3 mg/kg), HDM + 731 (3 mg/kg), y HDM + 731 (1 mg/kg). Los datos son la media $\pm$ ET. Los resultados se muestran en la FIG. 19. A la dosis de 0,3 mg/kg 623 y 731 no tuvieron efecto sobre la AHR inducida por HDM, mientras las dosis de 1 mg/kg y superiores inhibieron la AHR hasta niveles de la línea base (FIG. 19). Debido al pequeño número de animales en los grupos con HDM y HDM + IgG2, la AHR medida en estos grupos fue muy variable (APTI 579 $\pm$ 463 y 415 $\pm$ 213 en los grupos con HDM y HDM + IgG2 respectivamente). A la dosis de 10 mg/kg el mAb 623 redujo el porcentaje de células PAS+ en el pulmón de los ratones sensibilizados con HDM hasta la línea base (grupo con PBS).

De una manera similar a la descrita antes, se examinó la sensibilidad a la dosis de la inhibición de la producción de mucus inducida por HDM por el mAb 623 y el mAb 731 en ratones con IL-13 humanizada. Se recogieron los pulmones y se trataron como se ha descrito en referencia a la FIG. 14 y se examinaron. Los datos se expresan como el porcentaje de la media de células caliciformes positivas a PAS/bronquio. Los datos son la media $\pm$ ET. A una dosis de 10 mg/kg el mAb redujo el % de células PAS+ hasta la línea base, mientras las dosis inferiores no fueron tan eficaces. A una dosis de 0,3 mg/kg el mAb no tuvo efecto sobre el porcentaje de células PAS+, pero a dosis superiores reduce el porcentaje de células PAS+ hasta niveles de la línea base (grupo con PBS) (FIG. 20).

De una manera similar a los experimentos descritos antes, el mAb 623 y el mAb 731 se sometieron a ensayo y se determinó que inhibían el reclutamiento de leucocitos inducido por HDM de una manera dependiente de la dosis, comenzando a una dosis de 1 mg/kg (véase la FIG. 21). Se recogió el BALF y se realizaron recuentos de células

como se ha descrito en relación con los datos para la FIG. 15. Los datos son la media $\pm$ ET. El control de isotipo causó un aparente incremento en el número de leucocitos reclutados por HDM en el BALF (497 ± 156 en comparación con $198 \pm 42 \cdot 10^3$ células/ml BALF en los grupos con HDM + IgG2 y HDM respectivamente).

5 ESTUDIO CON HDM TERAPÉUTICO Y PROFILÁCTICO A UNA DOSIS FIJA DE MAB 623

Este Ejemplo demuestra la eficacia del mAb 263 como agente profiláctico y terapéutico en el modelo de HDM. En este ejemplo, se administró el mAb 623 a la dosis fijada de 100 μ g/ratón de acuerdo con 3 programas diferentes: i) un día antes de cada sensibilización con HDM (tratamiento profiláctico); ii) un día antes de la última sensibilización con HDM y iii) el mismo día de la última sensibilización con HDM (tratamientos terapéuticos). El fenotipo alérgico fue evaluado 3 días después de la última sensibilización con HDM. De este modo, se determinaron los tiempos de administración del anticuerpo, y la eficacia resultante. En realizaciones alternativas, este enfoque se puede aplicar para los demás anticuerpos.

Los ratones fueron sensibilizados con tres administraciones intratraqueales de HDM (100 μ g) en 50 μ l de PBS el día 1, 7, y 14. Se administraron 623 o el control de isotipo IgG2 intraperitonealmente a la dosis de 100 μ g/ml de acuerdo con 3 programas diferentes: el día -1, 6 y 13 (tratamiento profiláctico), el día 13 o el día 14 (tratamiento terapéutico). Los ratones de control recibieron PBS o una IgG2 irrelevante como control de isotipo. El día 17 se midieron la reactividad de las vías respiratorias a la administración intravenosa de acetilcolina y la infiltración de leucocitos en BALF como se ha descrito antes (en referencia a la FIG. 8 y la FIG. 15). $n=8$ ratones/grupo en los grupos con PBS, HDM, HDM + IgG2 (día -1, 6 y 13), HDM + IgG2 (día 13), HDM + IgG2 (día 14), HDM + 623 (día 13); $n=10$ en los grupos con HDM + 623 (día -1, 6 y 13), HDM + 623 (día 14). Los datos son la media $\pm$ ET. Como se muestra en la FIG. 22A, cuando se administró profilácticamente antes de cada sensibilización con HDM, el mAb 623 inhibió completamente la AHR inducida por HDM. Además, 623 inhibió completamente la AHR inducida por HDM cuando se administró terapéuticamente el día antes de la última sensibilización con HDM. Por el contrario, la administración terapéutica el mismo día de la sensibilización tuvo un efecto pequeño sobre la AHR (FIG. 22A). El mAb 623 inhibió el reclutamiento de leucocitos en BALF cuando se administró profilácticamente antes de cada sensibilización con HDM (FIG. 22B).

Como apreciará un experto en la técnica, los ejemplos utilizados para caracterizar estos anticuerpos se pueden aplicar fácilmente a cualquier anticuerpo para IL-13 y sus variantes. De este modo, los ejemplos representan cómo un experto en la técnica podría determinar fácilmente y rutinariamente si un anticuerpo, o una variante de un anticuerpo descrito en la presente memoria, podrían funcionar alterando la actividad de IL-13.

Como apreciará un experto en la técnica, mientras los resultados anteriores frecuentemente se centran en los aspectos profilácticos de los anticuerpos, los métodos y los resultados anteriores son extensibles a métodos para el tratamiento como terapia. Por ejemplo, una vez que se identificado un sujeto que padece un trastorno relacionado con IL-13, se puede administrar una cantidad eficaz del anticuerpo. Como apreciará un experto en la técnica, se pueden requerir cantidades adicionales del anticuerpo en comparación con la cantidad para uso profiláctico. Por ejemplo, la cantidad a añadir puede ser 1-10, 10-100, 100-1000 veces o más por encima de las cantidades para la prevención, descritas antes. Esto se puede requerir cuando el trastorno da como resultado grandes cantidades de IL-13 o cuando se tienen que eliminar grandes cantidades de IL-13 con el fin de reducir los síntomas del trastorno. En situaciones alternativas, se pueden requerir cantidades inferiores para tratar a un sujeto con un trastorno relacionado con IL-13 que para prevenir el trastorno. Por ejemplo, en situaciones en las que una única dosis del anticuerpo es suficiente para unirse y eliminar sustancialmente todo el exceso de IL-13, mientras, para prevenir el trastorno, se puede tener que administrar una cantidad similar, pero una cantidad administrada continuamente. Adicionalmente, la cantidad puede ser administrada de diferentes maneras, por ejemplo i.v., y la cantidad se puede administrar continuamente, si se desea. Los resultados anteriores son completamente coherentes con y sugerentes del hecho de que los anticuerpos funcionarán como agente terapéutico así como profiláctico. Como apreciará un experto en la técnica, se pueden requerir en algunas situaciones dosis múltiples y/o continuas, p. ej., tratamiento a lo largo de la vida del sujeto.

Adicionalmente, como apreciará un experto en la técnica, la naturaleza del anfitrión concreto también puede influir en la manera y la cantidad de tratamiento. Por ejemplo, en sujetos que son crónicos (naturalmente sensibles al compuesto y que no necesitan ser sensibilizados a él) para un trastorno (p. ej., asma) cabría esperar que cantidades adicionales, administradas mediante métodos más eficaces (p. ej., i.v. en lugar de s.c.) a lo largo de un período de tiempo más prolongado tuvieran una mayor probabilidad de funcionar, a la luz de los resultados anteriores y el conocimiento de un experto en la técnica. Por ejemplo, mientras los modelos y las dosis anteriores pueden ser representativos de modelos de infección aguda, las dosis anteriores pueden ser insuficientes cuando se administran como se ha descrito antes, en una forma de modelo crónico (p. ej., en monos que habían sido expuestos a diferentes agentes a lo largo de períodos de tiempo prolongados). Este resultado coincide con lo que un experto en la técnica esperaría ya que los niveles elevados de IL-13 requerirían lógicamente cantidades adicionales de anticuerpo. Además, un experto en la técnica podría esperar que, dadas dosis mas grandes de anticuerpo, administradas de manera suficientemente frecuente, se producirían los mismos o similares resultados, como se ha descrito antes. Los solicitantes observan que esto es coherente con los resultados mostrados en la publicación PCT Núm. WO 2005/007699, que demuestra que mientras los bajos niveles de anticuerpos para IL-13 no son

sustancialmente eficaces en modelos de monos, niveles superiores producían resultados significativos y pronosticados. Como se ha observado antes, un método por el cual se pueden determinar los niveles de anticuerpo requeridos (para cualquier trastorno dependiente de IL-13) es por medio del control de los niveles de biomarcadores en el sujeto. Los ejemplos de estos biomarcadores se describen en la presente memoria.

EJEMPLO 19: CARACTERIZACIÓN DE BIOMARCADORES DEPENDIENTES DE IL-13: EFECTO DE MAB623 SOBRE LOS NIVELES EN SUERO DE TARC, EOTAXINA Y C10 EN EL MODELO DE ASMA INDUCIDA POR OVA EN RATONES CON IL-13 HUMANIZADA

Este Ejemplo demuestra y verifica los biomarcadores dependientes de IL-13 en suero que pueden ser utilizados en el entorno clínico. Se midieron los niveles en suero de TARC, C10 y eotaxina inducidos por OVA en ratones y se estudiaron los efectos de la inhibición de IL-13 sobre esos niveles. (Se ha demostrado que IL-13 induce la liberación de TARC, C10, y eotaxina (véanse, p. ej., Ma et al., The C10/CCL6 chemokine and CCR1 play critical roles in the pathogenesis of IL-13-induced inflammation and remodeling, *J Immunol.*, 172(3):1872-81 (2004); Zhu et al., IL-13-induced chemokine responses in the lung: role of CCR2 in the pathogenesis of IL-13-induced inflammation and remodeling. *J Immunol.* 168(6):2953-62 (2002); Nomura et al., Interleukin-13 induces thymus and activation-regulated chemokine (CCL17) in human peripheral blood mononuclear cells, *Cytokine.*, 20(2):49-55 (2002); Zhu et al., Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production, *J Clin Invest.*, 103(6):779-88 (1999)). Como apreciará un experto en la técnica, el mecanismo esbozado en este enfoque podría ser utilizado para identificar también otros marcadores.

Se llevó a cabo primero un estudio de asma inducida por OVA en ratones A/J de tipo salvaje para establecer el tiempo de inducción de TARC, eotaxina y C10 en suero. Los días 1 y 7 los ratones fueron inmunizados con OVA (25 µg de OVA en 2 mg de Alumbre, i.p.) o Alumbre como control. Los días 14, 15 y 17, los ratones se anestesiaron con una mezcla de cetamina y xilazina [45 y 8 mg/kg, respectivamente] y se sensibilizaron con OVA (750 µg en 50 µl, intranasal) o un volumen equivalente de PBS como control. Se recogió sangre a las 3, 6 y 24 horas de la sensibilización final. Los niveles en suero de TARC y eotaxina se midieron por medio de ELISA (Duoset, R&D Systems). Los niveles en suero de C10 se midieron por medio de un ELISA sándwich. En resumen, se titularon muestras de suero 1:2 sobre placas con anticuerpo anti-C10 (R&D Systems) durante 1 hora. Se añadió anticuerpo de detección anti-C10 biotinilado (R&D System), seguido de incubación de 1 µg/ml de estreptavidina-HRP. El C10 capturado se determinó utilizando una reacción de sustrato TMB y se cuantificaron los valores en ng/ml de cada muestra a partir de una curva patrón sobre la placa. n=6 ratones/grupo. Los datos son la media ± ET. En el grupo con OVA/OVA los niveles en suero de TARC y eotaxina aumentaron a las 3 y 6 horas en comparación con el grupo con Alumbre/PBS; los niveles en suero de TARC eran elevados todavía a las 24 horas en comparación con el grupo con Alumbre/PBS, aunque en un grado menor que a las 3 y 6 horas; los niveles en suero de C10 aumentaron a las 3, 6 y 24 horas en comparación con el grupo con Alumbre/PBS, con una inducción máxima a las 24 horas (resultados mostrados en la FIG. 23, FIG. 24, y FIG.25).

A continuación se evaluó la capacidad de la administración profiláctica de mAb 623 para inhibir los niveles en suero de TARC, eotaxina y C10 utilizando ratones con IL-13 humanizada. Como apreciará un experto en la técnica, esto se puede utilizar para cualquiera de los presentes anticuerpos.

Los ratones fueron inmunizados de acuerdo con el protocolo de asma inducida por OVA descrito en referencia a la FIG. 23, FIG. 24, y FIG. 25. El mAb 623 se administró intraperitonealmente a una dosis de 100 µg/ratón (5 mg/kg) los días 13, 15 y 17 del estudio. Los ratones de control recibieron PBS o IgG2 irrelevante como control de isotipo. La sangre se recogió 1 y 4 horas o 2 y 6 horas después de la sensibilización final. Se midieron los niveles de TARC en suero mediante ELISA (Duoset Kit, R&D System). n=15 ratones/grupo en el grupo con OVA (n=8 para el grupo de 1 y 4 horas y n=7 para el grupo de 2 y 6 horas); n=14 ratones/grupo en el grupo con OVA + IgG2 (n=7 para el grupo de 1 y 4 horas y n=7 para el grupo de 2 y 6 horas); n=17 ratones/grupo en el grupo de OVA + 623 (n=8 para el grupo de 1 y 4 horas y n=9 para el grupo de 2 y 6 horas); n=15 ratones/grupo en el grupo con Alumbre (n=7 para el grupo con 1 y 4 horas y n=8 para el grupo con 2 y 6 horas); Los datos son la media ± ET. El mAb 623 inhibió la inducción de TARC, con una inhibición máxima a los puntos horarios de 2 y 4 horas (véase la FIG. 26). De este modo parece que TARC es un marcador adecuado.

Para hacer un seguimiento de la influencia sobre la eotaxina, se trataron los ratones como se ha descrito y comentado más arriba en referencia a la FIG. 26. Se midieron los niveles de eotaxina en suero por medio de ELISA (Duoset Kit, R&D System). Los datos son la media ± ET. El mAb 623 mostró una inducción de eotaxina a las 1, 2, 4 y 6 horas (véase la FIG. 27). De este modo, parece que la eotaxina es un marcador adecuado.

Para hacer un seguimiento de la influencia sobre los niveles de C10, se trataron los ratones como se ha descrito más arriba en referencia a la FIG. 26. Se midieron los niveles de C10 en suero por medio de ELISA como se ha descrito en referencia a la FIG. 25. Los datos son la media ± ET. El mAb 623 tuvo un pequeño efecto visible sobre los niveles de C10 en cualquiera de los puntos horarios sometidos a ensayo (FIG. 28). Se cree que C10 tiene un tiempo hasta el máximo más largo (p. ej., como se muestra en la FIG. 25) y probablemente se requiere un tiempo adicional para observar el impacto sobre C10 del anticuerpo como biomarcador y para el uso de C10 como

biomarcador.

De este modo, por medio de los métodos descritos más arriba, un experto en la técnica será fácilmente capaz de identificar marcadores adicionales que pueden tener uso en los siguientes trastornos relacionados con IL-13 y su tratamiento.

EJEMPLO 20: USO DE BIOMARCADORES EN UN SUJETO QUE RECIBE MAB 623 Y/O MAB 731

Este ejemplo esboza cómo se puede utilizar un biomarcador, tal como uno de los caracterizados más arriba, para controlar y ajustar la cantidad o frecuencia de un anticuerpo que es administrado al sujeto.

Se identifica un sujeto con asma. Se administra al sujeto una cantidad de partida de mAb 623 y/o 731, p. ej., 1-10 mg/kg, cada unidad de tiempo concreta. Después de esto, se miden los niveles de eotaxina en el sujeto cada hora por medio de ELISA. La cantidad y/o frecuencia de mAb administrado se incrementan hasta que el nivel de eotaxina se reduce a un nivel indicativo de tratamiento adecuado del sujeto. Este nivel puede ser cualquier descenso significativo, por ejemplo, cualquier descenso mostrado en los experimentos anteriores o el máximo descenso alcanzable por medio de la administración del anticuerpo. Una vez que se ha observado este descenso, se pueden mantener la cantidad y/o la frecuencia de la administración del anticuerpo e incluso disminuir, si fuera apropiado. De este modo, los biomarcadores pueden permitir la determinación de la cantidad óptima de anticuerpo necesaria.

Como apreciará un experto en la técnica, este ejemplo puede permitir a un experto en la técnica determinar qué cantidad suficiente o terapéuticamente suficiente del anticuerpo puede ser para cada sujeto. Administrando una cantidad de partida de un anticuerpo, se puede incrementar la cantidad del anticuerpo, hasta que la presencia del biomarcador empiece a declinar, identificando de ese modo una cantidad o dosis suficiente terapéuticamente para el sujeto. Adicionalmente, esto también se puede utilizar para identificar cómo (p. ej., subcutáneamente, intravenosamente, etc.) y con qué frecuencia (p. ej., 1, más de una vez, una dosis por unidad de tiempo, continuamente, etc.) se debe administrar el anticuerpo para un resultado deseado. Como apreciará un experto en la técnica, se podría utilizar cualquiera de los anticuerpos para cualquier trastorno relacionado con IL-13, especialmente los enumerados en la presente memoria.

EJEMPLO 21: USO DE BIOMARCADORES COMO DIAGNÓSTICO

Este ejemplo expone en detalle cómo se pueden utilizar los biomarcadores para identificar un paciente con un trastorno relacionado con IL-13. Se identifica el nivel de eotaxina, TARC, y/o C10 presente en un individuo sano (p. ej., un sujeto sin un trastorno relacionado con IL-13). Después de esto, se caracteriza el nivel de eotaxina, TARC, y/o C10 en otros sujetos. Aquellos con niveles elevados (en comparación con los individuos sanos) de eotaxina, TARC, y/o C10 serán aquellos que pueden padecer un trastorno relacionado con IL-13. Para una confirmación adicional, los sujetos con niveles elevados de eotaxina, TARC, y/o C10 pueden tener adicionalmente sus niveles de los otros biomarcadores en comparación con los niveles del otro biomarcador en un sujeto sano.

De este modo, este ejemplo proporciona un método que permite a un experto en la técnica identificar a un paciente con un trastorno o enfermedad relacionado con IL-13. Alternativamente, se pueden examinar el nivel de IL-13 en un sujeto o las propiedades de IL-13 en el sujeto y compararlos con los que no tienen un trastorno relacionado con IL-13. Por ejemplo, se puede utilizar uno de los anticuerpos descritos en la presente memoria como agente de diagnóstico, permitiendo detectar cualquier cambio en la IL-13 asequible del sujeto y comparar la cantidad detectada con una cantidad de control de un patrón sano, o una cantidad pre-enfermedad para el individuo (p. ej., un control interno).

Como apreciará un experto en la técnica, en algunas realizaciones, cada uno de los trastornos relacionados con IL-13 no tendrá que estar asociado necesariamente con un incremento en la eotaxina, TARC o C10. Las diferentes enfermedades podrían tener diferentes biomarcadores, algún subgrupo de los anteriores, y algún trastorno relacionado con IL-13 podría no tener biomarcadores en absoluto.

El ejemplo anterior se puede utilizar para ayudar a identificar a un individuo que padece uno de los trastornos relacionados con IL-13 comentados en la presente memoria. De este modo, en algunas realizaciones, el uso de detectores de biomarcadores (p. ej., anticuerpos para los biomarcadores) es en forma de agente de diagnóstico. En otras realizaciones, como la descrita en el Ejemplo 5, los propios anticuerpos pueden ser utilizados como herramienta de diagnóstico para identificar pacientes con niveles elevados de IL-13. Como la KD de los anticuerpos es conocida, se puede determinar la cantidad de IL-13 en una muestra por medio de la unión de la IL-13 de una muestra al mAb.

EJEMPLO 22: DETERMINACIÓN DE TRASTORNOS RELACIONADOS CON IL-13

Este ejemplo demuestra un método por medio del cual se puede determinar si un trastorno es un trastorno relacionado con o dependiente de IL-13. Se identifica un sujeto con un trastorno candidato. Esto se realiza seleccionando al azar un sujeto de la población. Como alternativa, esto se puede realizar seleccionando un

candidato que está demostrando síntomas que son característicos de uno de los trastornos descritos en la presente memoria. Se examinan los niveles de eotaxina, TARC, y/o C10 del sujeto. Se administran al paciente 10 mg/kg de mAb 623 o 731. Se vuelven a examinar los niveles de eotaxina, TARC, y/o C10 del sujeto. Esto se puede repetir varias veces. Si se observa una disminución en el nivel de los biomarcadores, el trastorno puede ser caracterizado como un trastorno relacionado con IL-13.

5

En realizaciones alternativas, se utiliza una cantidad mayor del anticuerpo en administraciones progresivas del anticuerpo. En realizaciones alternativas, se examinan los tres biomarcadores y los tres deben mostrar disminuciones para que el trastorno se caracterice como un trastorno relacionado con IL-13. En realizaciones alternativas, se puede correlacionar adicionalmente una disminución en los síntomas del trastorno candidato junto con la disminución del biomarcador o los biomarcadores.

10

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> ABGENIX, INC.
Foltz, Ian
5 Faggioni, Raffaella
Senaldi, Giorgio
Manchulenko, Kathy
Kang, Jaspal, S. Rathanaswami, Palaniswami
Ahluwalia, Kiran
10 Foord, Orit
Klakamp, Scott
- <120> ANTICUERPOS MONOCLONALES COMPLETAMENTE HUMANOS PARA IL-13
- 15 <130> ABGENIX.119VPC

<150> 60/629,135
<151> 17-11-2004
- 20 <150> 60/728,604
<151> 19-10-2005-

<160> 96
- 25 <170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1
<211> 366
<212> ADN
30 <213> Homo sapiens
- <400> 1
caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgtag cgtctggatt caccttcagt agctatgaca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatgggtatg atggaagtaa taaatactat 180
gcagactccg tgcagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtac gagcgaagat 300
agcagtggct ggtacgacgg ctggttcgac ccctggggcc aggggaaccct ggtcaccgtc 366
tcctca
- 35 <210> 2
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens
- 40 <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 Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Asp 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 Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Ser Glu Asp Ser Ser Gly Trp Tyr Asp Gly Trp Phe Asp Pro Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
- <210> 3
<211> 321
45 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 3
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcgagtca gggcattagc aattatttag cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagttc ctaaggctct gatctatgct gcattccactt tgcaatcagg ggtcccatct 180
cgattcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagatgttg caacttatta ctgtcaaaag tataacagtg cccatttcac tttcggccct 300
gggaccaaag tggatatcaa a 321

5 <210> 4
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 4
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser 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 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 5
<211> 360
15 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 5
cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctgggtg ctccatcagt acttactact ggagctggat ccggcagccc 120
ccagggaaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactacaat 180
ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgagag agatggtgga 300
cactactggg atgatgcttt tgatatctgg ggccaaggga caatggtcac cgtctcttca 360

20 <210> 6
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25 <400> 6
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 Thr Tyr
20 25 30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp 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 Gln 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 Asp Gly Gly His Tyr Trp Asp Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

30 <210> 7
<211> 321
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica_misclánea

<222> 20, 68, 140, 205, 217, 232, 233, 240, 265

5 <223> n = A, T, C o G

<400> 7

```

gacatccaga tgacccagtn tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttncc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag actgggtatca gcagaaacca 120
gggaaaagccc ctaagcgccn gatctatgat gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatg tgggncagaa ttcactntca ctatcagcag cnngcagccn 240
gaagattttg caacttatta ctgtntacag catgatagtt acccattccc tttcggccct 300
gggaccaaag tggatatcaa a                                     321

```

10 <210> 8

<211> 75

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 8

```

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

```

<210> 9

<211> 357

20 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 9

```

gagggtgcagt tgggtggagtc tggggggaggc ctggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gattataaca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggttagagtg ggtctcatcc attagtata gtagtactta catatactac 180
gcagactcag tgaggggccc attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctacactttat 240
ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtat tttactgtgc gagagaagac 300
tactactact acggtttgga cgtctggggc caagggacca cgggtcaccgt ctcctca 357

```

25 <210> 10

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <400> 10

```

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

```

<210> 11

35 <211> 321

<212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca ggacattaga aatgatttag gctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagcgcct gatttatgat gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caatttatta ctgtctacaa cataatagtt acccgtggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 12
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Asp
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 13
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ctggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccctcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccaggaaagg ggctggagtg ggtctcatac attagtacca gtaatagtta catatactac 180
 gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctcactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcaa 300
 gtgggagcta cccttgatgc ttttgatatt tggggccaag ggacaatggt caccgtctct 360
 tca 363

<210> 14
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys 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
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Thr Ser Asn Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gln Val Gly Ala Thr Leu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120

<210> 15

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

5 <400> 15
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgctt ctgtaggaga cagagtcacc 60
 ttcacttgcc gggcaagtca ggacattaca gatgatttag gctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagcgcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatagtt acccattcac cttcggtcct 300
 gggaccaaag tggatatcag a 321

<210> 16
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Phe Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Thr Asp Asp
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg 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 Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Arg
 100 105

15 <210> 17
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20 <400> 17
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ctggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 ttcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccaggaaagg ggctggagtg ggtctcatatc attagtagca gtaatagtta catatactac 180
 gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctcactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcaa 300
 gtgggagcca cccitgatgc ttttgatatac tggggccaag ggacaatggt caccgtctct 360
 tca 363

25 <210> 18
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys 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
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Thr Ser Asn Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gln Val Gly Ala Thr Leu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

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

5

<400> 19
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgctt ctgtaggaga cagagtcacc 60
 ttcaacttgcc gggcaagtca ggacattaca gatgatttag gctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagcgcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatagtt acccattcac cttcggtcct 300
 gggaccaaag tggatatcag a 321

10 <210> 20
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Phe Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Thr Asp Asp
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg 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 Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Arg
 100 105

15

<210> 21
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20

<400> 21
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ctgggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcatac attagtacta gttataatta catatactac 180
 gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcaa 300
 gtgggagcta cccctgatgc ttttgatatt tggggccaag ggacaatggt caccgtctct 360
 tca 363

25 <210> 22
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 22
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys 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
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Thr Ser Tyr Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gln Val Gly Ala Thr Leu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 23
 <211> 321
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens

<400> 23
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga .cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gggcattgga gatgatttag gctgggtatca gcagaagcca 120
 gggaaagccc ctaagcgcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatagtt acccattcac tttcggccct 300
 gggaccagag tggatatcaa a 321

10 <210> 24
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 24
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Gly Asp Asp
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg 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 Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Val Asp Ile Lys
 100 105

20 <210> 25
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ctggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccaggaaagg ggctggagtg ggtctcatal attagtagca gtaatagtta catatactac 180
 gcagactcag tgaaggggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctcactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcaa 300
 gtgggagcta cccttgatgc ttttgatata tggggccaag ggacaatggt caccgtctct 360
 tca 363

25 <210> 26
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 26

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

<210> 27
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgctt ctgtaggaga cagagtcacc 60
 ttcacttgcc gggcaagtca ggacattaca gatgatttag gctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagcgcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtccccacca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatagtt acccattcac cttcggtcct 300
 gggaccaaag tggatatcag a 321

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

<400> 28
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Phe Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Thr Asp Asp
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Arg
 100 105

<210> 29
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 29
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ctggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcatatc attagtagta gttataatta catatactac 180
 ggagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240
 ttgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcaa 300
 gtgggagcta ccttggatgc ttttgatatac tggggccaag ggacaatggt caccgtctct 360
 tca 363

<210> 30
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys 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
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Tyr Asn Tyr Ile Tyr Tyr Gly Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gln Val Gly Ala Thr Leu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 31
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 31
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gggcattgga gatgatttag gctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagcgcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatagtt acccattcac tttcggccct 300
 10 gggaccaaaag tggatatcaa a 321

<210> 32
 <211> 107
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

<400> 32
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Gly Asp Asp
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg 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 Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 33
 <211> 369
 <212> ADN
 20 <213> Homo sapiens

<400> 33
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgcc a tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaaagg ggtctggagt ggtctcagct tttagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgt gcaagatggg 300
 ctggggccct acttctacaa ctacgggatg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc 360
 25 gtctctctca 369

<210> 34
 <211> 123
 30 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34
 Glu Val Gln Leu Leu 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 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 Phe Ser Gly Ser 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 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
 Val Gln Asp Gly Leu Gly Pro Tyr Phe Tyr Asn Tyr Gly Met Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 35
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 35
 tcctatgaac tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac agccagcatc 60
 acctgtctctg gagataaatt gggggataaa tatacttgct gggtttcaaca gaagccaggc 120
 cagtcctctg tgctgggtcat ctatcacgat agcaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactcttg ggacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
 gatgaggctg actattactg tcaggcgtgg gacagcagca cttatgtctt cggaactggg 300
 accaaagtca ccgtcctagg t 321

<210> 36
 <211> 107
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 36
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Thr
 20 25 30
 Cys Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 His Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Tyr Val
 85 90 95
 Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 100 105

20 <210> 37
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

25 <400> 37
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacccttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggc 120
 ccagggaaag ggctggagtg ggtctcagct tttagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgt gcaagatggg 300
 ctggggccct acttctacaa ctacggtatg gacgtctggg gccaaggagc cacggtcacc 360
 gtctcctca 369

<210> 38
 30 <211> 123
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

```

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

```

5

<210> 39

<211> 321

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10

<400> 39

```

tcctatgaac tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac agccagcatc 60
acctgctctg gagataaatt gggggataaa tatgcttgct ggtttcaaca gaagccaggc 120
cagtcacctg tgctgggtcat ctatcacgat agcaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
ttctctggct ccaactctgg ggacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
gatgaggctg actattactg tcaggcgtgg gacagcagca cttatgtctt cggaactggg 300
accaaagtca ccgtcctagg t                                     321

```

<210> 40

15

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

```

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

```

20

<210> 41

<211> 354

<212> ADN

25

<213> Homo sapiens

<400> 41

```

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcagtg tctctggcgg ctccatcagt agttactatt ggagctggat ccggcagccc 120
gccgggaagg gactggagtg gattggcgct atctatatga ctgggagaac caactacaat 180
tcttccctca agagtcgagt caccatgtca atagacacgt ccaagaacca gctctccctg 240
aagttgagtt ttatgaccgc cgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agaaagtgga 300
tccagctata gttacgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca          354

```

30

<210> 42

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

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

5

<210> 43
 <211> 328
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10

<400> 43

tcctatgtgc tgactcagcc accctcgggtg tcagtggccc caggacagac ggccaggatt 60
 acctgtgggg gaaacaacat tggaagtaaa ggtgttcact ggtaccagca gaagccaggc 120
 caggccctg tgctggtcgt ctatgatgat agcgaccggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggg cgaagccggg 240
 gatgagggcg actattactg tcagggtgtgg gttagtagta gtgatcatca tgtgggtattc 300
 ggcggaggga ccaagctgac cgtcgtag 328

15

<210> 44
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 44

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

20

<210> 45
 <211> 378
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

25

<400> 45

gagggtgcagt tgggtggagtc tggggggaggc ttggtaaagc ctgggggggtc ccttagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggttggccgt attagaagtg agattgatgg tgggacgaca 180
 aattacgctg caccctgaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaacacg 240
 ctgtatctgc aaatgaacag cctgagaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtgccaca 300
 gatcagggtg gagcttacta cggggactac tacgggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360
 acggtcaccg tctcctca 378

30

<210> 46
 <211> 126

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 46
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Arg Ser Glu Ile Asp Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Thr Asp Gln Val Gly Ala Tyr Tyr Gly Asp Tyr Tyr Gly
 100 105 110
 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 47
 <211> 327
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 47
 tcctatgagc tgacacagcc accctcggtg tcagtgtccc caggacaaac ggccaggatc 60
 acctgctctg gagatgcgtt gccagaaaaa tatgcttatt ggtaccagca gaagtcaggc 120
 caggccccctg tgctgggtcat ctatgaggac agcaaacgac cctccgggat ccctgagaga 180
 ttctctggct ccagctcagg gacaatggcc accttgacta tcagtggggc ccagggtggag 240
 gatgaagctg actactactg tcattcaaca gacagcagtg gtaatcatgg ggtgttcggc 300
 ggaggggacca agctgaccgt cctaggt 327

<210> 48
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 48
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Glu Lys Tyr Ala
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ser Ser Gly Thr Met Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Val Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys His Ser Thr Asp Ser Ser Gly Asn His
 85 90 95
 Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105

<210> 49
 <211> 379
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 49
 gaggtgcagt tgggtgagagt ctggggggagg cttgggtaaag cctgggggggt cccttagact 60
 ctctgtgca gcctctggat tcactttcag taacgcctgg atgagctggg tccgccaggc 120
 tccaggggaag gggctggagt gggttggccg tattagaagt gaaattgatg gtgggacaac 180
 aaactacgct gcacccgtga aaggcagatt caccatctca agagatgatt caaaaaacac 240
 gctgtatctg caaatgaaca gcctgaaaac cgaggacaca gccgtgtatt actgtgccac 300
 agatcagggtg ggagcttact acggggacta ctacggtatg gacgtctggg gccaaaggac 360
 cacggtcacc gtctcctca 379

<210> 50

<211> 126
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 50
 1 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 10 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 15 Gly Arg Ile Arg Ser Glu Ile Asp Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Ala
 20 Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 25 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 30 Tyr Cys Ala Thr Asp Gln Val Gly Ala Tyr Tyr Gly Asp Tyr Tyr Gly
 35 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 40 115 120 125

<210> 51
 <211> 327
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 51
 tcctatgagc tgacacagcc accctcgggtg tcagtgtccc caggacaaac ggccaggatc 60
 acctgctctg gagatgcatt gccagaaaaa tatgcttatt ggtaccagca gaagtcaggc 120
 caggccccctg tgctgggtcat ctatgaggac agcaaacgac cctccgggat ccctgagaga 180
 ttctctggct ccagctcagg gacaatggcc accttgacta tcagtggggc ccaggtggag 240
 gatgaagctg actactactg tcattcaaca gacagcagtg gtaatcatgg ggtgttcggc 300
 ggaggggacca agctgaccgt cctaggt 327

15 <210> 52
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 52
 1 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 5 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Glu Lys Tyr Ala
 10 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 15 Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 20 Ser Ser Gly Thr Met Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Val Glu
 25 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys His Ser Thr Asp Ser Ser Gly Asn His
 30 Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 35 100 105 95

25 <210> 53
 <211> 378
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

30 <400> 53
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtaaagc ctgggggggtc tcttagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggttgccgt attagaagca aaattgatgg tgggacaata 180
 aactacgctg caccctgtaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaacacg 240
 ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtgccaca 300
 gatcaggtgg gagcttacta cggggactac tacgggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360
 acgggtcaccg tctcctca 378

<210> 54
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 54
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ile Asp Gly Gly Thr Ile Asn Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Thr Asp Gln Val Gly Ala Tyr Tyr Gly Asp Tyr Tyr Gly
 100 105 110
 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 55
 <211> 327
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10

<400> 55
 tcctatgagc tgacacagcc accctcgggt tcagtgtccc caggacaaac ggccaggatc 60
 acctgctctg gagatgcatt gccagaaaaa tatgcttatt ggtaccagca gaagtcaggc 120
 caggcccttg tgctgggtcat ctatgaggac accaaacgac cctccgggat ccctgagaga 180
 ttctctggct ccagctcagg gacaatggcc accttgacta tcagtggggc ccaggtggag 240
 gatgaagctg actactattg ttattcaaca gacagcagtg gtaatcatgg ggtgttcggc 300
 ggagggacca agctgaccgt cctaggt 327

15

<210> 56
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 56
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Glu Lys Tyr Ala
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Glu Asp Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ser Ser Gly Thr Met Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Val Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Thr Asp Ser Ser Gly Asn His
 85 90 95
 Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105

25

<210> 57
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

30

<400> 57
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgcc a tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtgggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagccgat 300
 ttttggagtg gtacattatg ggggtttgac tactggggcc aggggaaccct ggtcaccgct 360
 tcctca 366

<210> 58
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 58
 Glu Val Gln Leu Leu 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 Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu 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 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 Ala Asp Phe Trp Ser Gly Thr Leu Trp Gly Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 59
 <211> 327
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15 <400> 59
 tcctatgtgc tgactcagcc accctcgggtg tcagtggccc caggacagac ggccaggatt 60
 acctgtgggg gaaacaacat tggaaataaa attgtgcact ggtaccagca gaagccaggc 120
 caggccccctg tgctgggtcgt ctatgatgat agcgaccggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccggg 240
 gatgaggccg actattactg tcagggtgtgg gatagtagta gtgatcatgt ggtattcggc 300
 ggagggacca agctgaccgt cctagggt 327

20 <210> 60
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 60
 Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Asn Lys Ile Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
 35 40 45
 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
 85 90 95
 Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105

25 <210> 61
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 61

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

<210> 62
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 62
 Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu
 1 5 10 15
 Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly
 20 25 30
 Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala
 35 40 45
 Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr
 50 55 60
 Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln
 65 70 75 80
 Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe
 85 90 95
 Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Arg
 100 105 110
 Phe Asn

<210> 63
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 63
 Met Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile
 1 5 10 15
 Glu Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn
 20 25 30
 Gly Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala
 35 40 45
 Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys
 50 55 60
 Thr Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly
 65 70 75 80
 Gln Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln
 85 90 95
 Phe Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly
 100 105 110
 Gln Phe Asn
 115

<210> 64
 <211> 364
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 64

```

Met Ala Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly
 1      5      10      15
Phe Ala Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu
 20      25      30
Ile Glu Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys
 35      40      45
Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys
 50      55      60
Ala Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu
 65      70      75      80
Lys Thr Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala
 85      90      95
Gly Gln Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala
 100     105     110
Gln Phe Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu
 115     120     125
Gly Arg Phe Asn Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 130     135     140
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 145     150     155     160
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 165     170     175
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 180     185     190
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 195     200     205
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 210     215     220
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 225     230     235     240
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 245     250     255
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 260     265     270
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 275     280     285
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 290     295     300
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 305     310     315     320
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 325     330     335
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 340     345     350
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 355     360

```

<210> 65
 <211> 367
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 65
 Met Ala Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly
 1 5 10 15
 Phe Ala Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu
 20 25 30
 Ile Glu Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys
 35 40 45

Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys
 50 55 60
 Ala Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu
 65 70 75 80
 Lys Thr Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala
 85 90 95
 Gly Gln Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala
 100 105 110
 Gln Phe Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu
 115 120 125
 Gly Arg Phe Asn Arg Tyr Leu Asp Lys Thr Val Ala Pro Ser Thr Cys
 130 135 140
 Ser Lys Pro Thr Cys Pro Pro Pro Glu Leu Leu Gly Pro Ser Val
 145 150 155 160
 Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 165 170 175
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Asp Asp Pro Glu
 180 185 190
 Val Gln Phe Thr Trp Tyr Ile Asn Asn Glu Gln Val Arg Thr Ala Arg
 195 200 205
 Pro Pro Leu Arg Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser
 210 215 220
 Thr Leu Pro Ile Ala His Gln Asp Trp Leu Arg Gly Lys Glu Phe Lys
 225 230 235 240
 Cys Lys Val His Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 245 250 255
 Ser Lys Ala Arg Gly Gln Pro Leu Glu Pro Lys Val Tyr Thr Met Gly
 260 265 270
 Pro Pro Arg Glu Glu Leu Ser Ser Arg Ser Val Ser Leu Thr Cys Met
 275 280 285
 Ile Asn Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Lys Asn
 290 295 300
 Gly Lys Ala Glu Asp Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Ala Val Leu Asp Ser
 305 310 315 320
 Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Asn Lys Leu Ser Val Pro Thr Ser Glu
 325 330 335
 Trp Gln Arg Gly Asp Val Phe Thr Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 340 345 350
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
 355 360 365

<210> 66
 <211> 150
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 66
 Met His Pro Leu Leu Asn Pro Leu Leu Leu Ala Leu Gly Leu Met Ala
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly Phe Ala
 20 25 30
 Ser Pro Gly Pro Val Pro Arg Ser Val Ser Leu Pro Leu Thr Leu Lys
 35 40 45
 Glu Leu Ile Glu Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro
 50 55 60
 Leu Cys Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met
 65 70 75 80
 Tyr Cys Ala Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala
 85 90 95
 Ile Glu Lys Thr Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val
 100 105 110
 Ser Ala Gly Gln Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu
 115 120 125
 Val Ala Gln Phe Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe
 130 135 140
 Arg Glu Gly Gln Phe Asn
 145 150

10 <210> 67
 <211> 146
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

```

<400> 67
Met His Pro Leu Leu Asn Pro Leu Leu Leu Ala Leu Gly Leu Met Ala
 1      5      10      15
Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly Phe Ala
 20      25      30
Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu
 35      40      45
Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly
 50      55      60
Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Gly Phe Cys Val Ala
 65      70      75      80
Leu Asp Ser Leu Thr Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr
 85      90      95
Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln
100      105      110
Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe
115      120      125
Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Gln
130      135      140
Phe Asn
145

```

```

<210> 68
<211> 146
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 68
Met His Pro Leu Leu Asn Pro Leu Leu Leu Ala Leu Gly Leu Met Ala
 1      5      10      15
Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly Phe Ala
 20      25      30
Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu
 35      40      45
Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly
 50      55      60
Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala
 65      70      75      80
Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Tyr Arg Thr
 85      90      95
Gln Arg Ile Leu His Gly Leu Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln
100      105      110
Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe
115      120      125
Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Gln
130      135      140
Phe Asn
145

```

```

<210> 69
<211> 147
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 69

```

```

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

```

```

<210> 70
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 70
Tyr Lys Ile Gly Glu Pro His Lys Asp Thr Tyr Met
 1      5      10

```

```

<210> 71
<211> 51
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 71
Thr Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly
 1      5      10      15
Gln Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln
 20 30
Phe Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly
 35 40 45
Arg Phe Asn
50

```

```

<210> 72
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 72
Met Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu Glu
 1      5      10      15
Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly Ser
 20 25 30
Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala Leu
 35 40 45
Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr Gln
 50 55 60
Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln Phe
 65 70 75 80
Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe Val
 85 90 95
Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Arg Phe
 100 105 110
Asn

```

```

<210> 73
<211> 88
<212> PRT

```


<213> Homo sapiens

<400> 73

```

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

```

5

<210> 74

<211> 73

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 74

```

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

```

<210> 75

<211> 72

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 75

```

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

```

20

<210> 76

<211> 64

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 76

```

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

```

30

<210> 77

<211> 150

<212> PRT

<213> Homo sapiens

```

<400> 77
Met His Pro Leu Leu Asn Pro Leu Leu Leu Ala Leu Gly Leu Met Ala
1 5 10 15
Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly Phe Ala
20 25 30
Ser Pro Gly Pro Val Pro Arg Ser Val Ser Leu Pro Leu Thr Leu Lys
35 40 45
Glu Leu Ile Glu Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro
50 55 60
Leu Cys Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met
65 70 75 80
Tyr Cys Ala Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala
85 90 95
Ile Glu Lys Thr Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val
100 105 110
Ser Ala Gly Gln Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu
115 120 125
Val Ala Gln Phe Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe
130 135 140
Arg Glu Gly Gln Phe Asn
145 150

```

```

<210> 78
<211> 146
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 78
Met His Pro Leu Leu Asn Pro Leu Leu Leu Ala Leu Gly Leu Met Ala
1 5 10 15
Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly Phe Ala
20 25 30
Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu
35 40 45
Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly
50 55 60
Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Gly Phe Cys Val Ala
65 70 75 80
Leu Asp Ser Leu Thr Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr
85 90 95
Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln
100 105 110
Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe
115 120 125
Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Gln
130 135 140
Phe Asn
145

```

```

<210> 79
<211> 146
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 79

```

```

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

```

```

<210> 80
<211> 147
5 <212> PRT
   <213> Homo sapiens

```

```

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

```

```

10 <210> 81
    <211> 109
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens

```

```

15 <400> 81
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys 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
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45
Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
      50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
      100      105

```

<210> 82
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 82
 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 Gly Lys Gly Leu Glu Trp 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 Gln 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 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 100 105

<210> 83
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 83
 Glu Val Gln Leu Leu 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 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 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 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 100 105

15

<210> 84
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 84
 Glu Val Gln Leu Leu 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 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 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 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105

25

<210> 85
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 85

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 Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Tyr Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln 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 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105

<210> 86
 <211> 111
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 86
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

10 <210> 87
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 87
 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 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105

20 <210> 88
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 88

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

<210> 89
 <211> 98
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 89
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg 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 Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp
 85 90 95
 Ile Lys

10 <210> 90
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 90
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
 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 Thr 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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp
 85 90 95
 Ile Lys

20 <210> 91
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 91

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

<210> 92
 <211> 97
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 92
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30
 Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val
 85 90 95
 Leu

10 <210> 93
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 93
 Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
 35 40 45
 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val
 85 90 95
 Leu

20 <210> 94
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 94

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

<210> 95
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 95
 Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn
 1 5 10

<210> 96
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 96
 Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu Glu Leu
 1 5 10 15
 Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly Ser Met
 20 25 30
 Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala Leu Glu
 35 40 45
 Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr Gln Arg
 50 55 60
 Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe Val Lys
 85 90 95
 Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Arg Phe Asn
 100 105 110

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humano, humanizado o quimérico aislado que se une a IL-13, donde el anticuerpo humano aislado se une a IL-13 humana con una K_D de menos de 55 pM, donde dicha K_D se determina por medio de un análisis Biacore o KinExA basado en una solución y donde:
 - i. el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido que consiste en los aminoácidos 20-29 del SEQ ID NO: 96; o
 - ii. el anticuerpo se une a los residuos 21-33 o 70-80 del SEQ ID NO: 72; o
 - iii. el anticuerpo comprende los aminoácidos del SEQ ID NO: 50 de la cadena pesada y comprende los aminoácidos del SEQ ID NO: 52 de la cadena ligera; o
 - iv. el anticuerpo comprende los aminoácidos del SEQ ID NO: 38 de la cadena pesada y comprende los aminoácidos del SEQ ID NO: 40 de la cadena ligera; o
 - v. el anticuerpo comprende los aminoácidos de las CDR1, CDR2 y CDR3 del SEQ ID NO: 50 de la cadena pesada, como se muestra en la Tabla 18 y comprende los aminoácidos de las CDR1, CDR2 y CDR3 del SEQ ID NO: 52 de la cadena ligera, como se muestra en la Tabla 20; o
 - vi. el anticuerpo comprende los aminoácidos de las CDR1, CDR2 y CDR3 del SEQ ID NO: 38 de la cadena pesada, como se muestra en la Tabla 18 y comprende los aminoácidos de las CDR1, CDR2 y CDR3 del SEQ ID NO: 40 de la cadena ligera, como se muestra en la Tabla 20.
2. El anticuerpo humano aislado de la reivindicación 1, donde el anticuerpo humano aislado se une a IL-13 con una K_D de menos de 50 pM.
3. El anticuerpo aislado, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
4. Un medicamento que comprende un anticuerpo aislado, como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Un ácido nucleico que codifica un anticuerpo como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
6. Un vector viral que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 5.
7. Una célula anfitriona transformada con un ácido nucleico como se reivindica en la reivindicación 5 o un vector viral como se reivindica en la reivindicación 6.
8. Un método para elaborar un anticuerpo, como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende la expresión del anticuerpo a partir de una célula anfitriona como se reivindica en la reivindicación 7.
9. El anticuerpo humano aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o semejante anticuerpo en un medicamento como se reivindica en la reivindicación 4, para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con IL-13.
10. Un anticuerpo aislado o medicamento para su uso como se reivindica en la reivindicación 9, donde el trastorno relacionado con IL-13 es una enfermedad inflamatoria, una enfermedad pulmonar obstructiva crónica o asma.
11. El uso de un anticuerpo, como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno relacionado con IL-13.
12. El uso de un anticuerpo como se reivindica en la reivindicación 11, donde el trastorno relacionado con IL-13 es una enfermedad inflamatoria, una enfermedad pulmonar obstructiva crónica o asma.

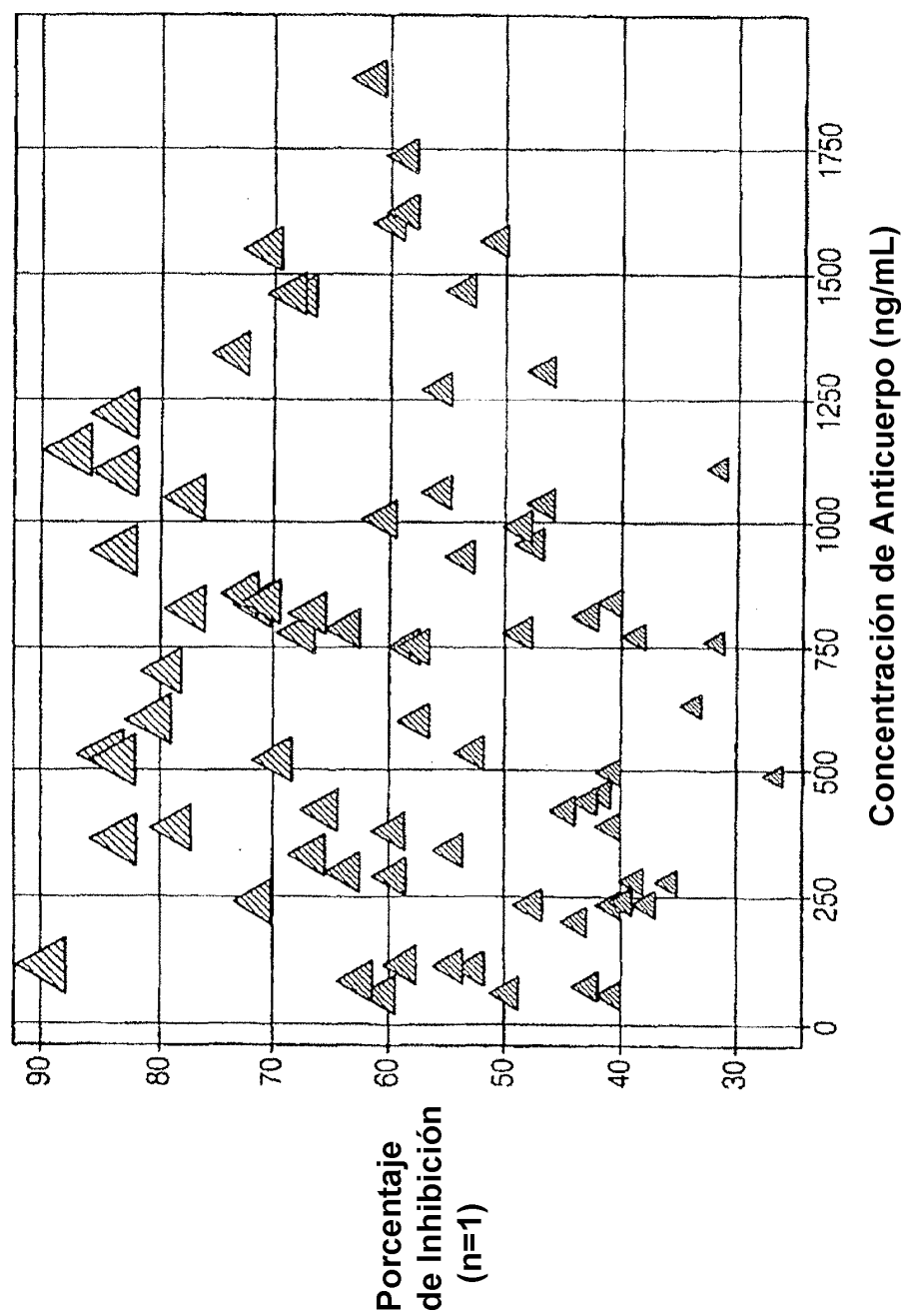


FIG. 1

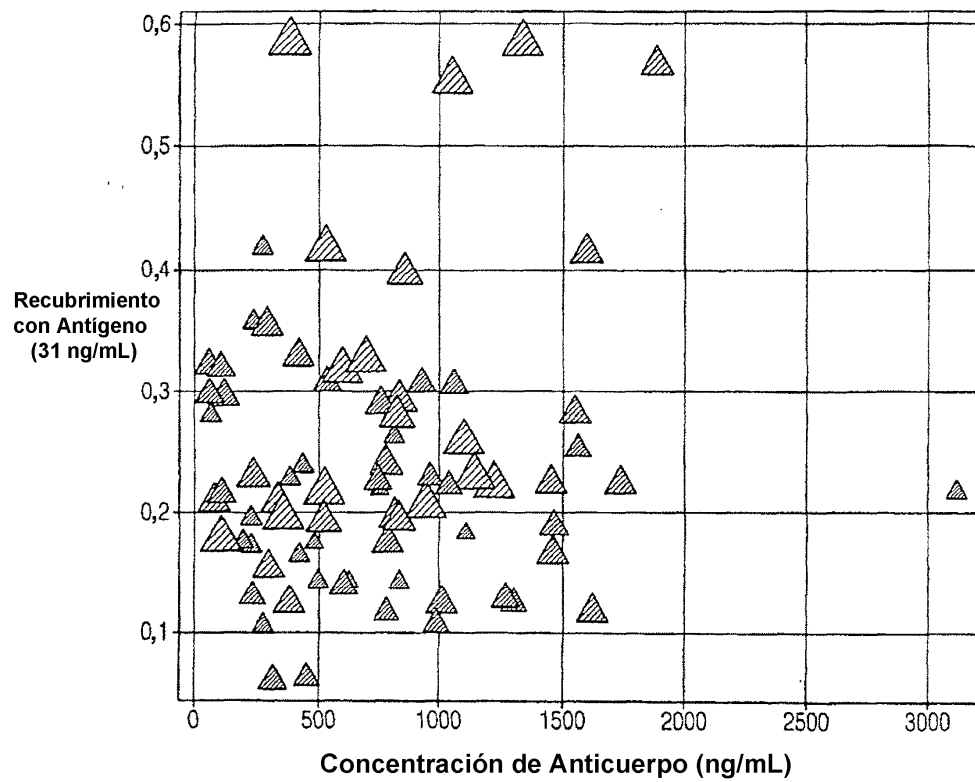


FIG. 2

Inhibición de la Liberación de Eotaxia Inducida por IL-13 por Anticuerpos Anti-IL13

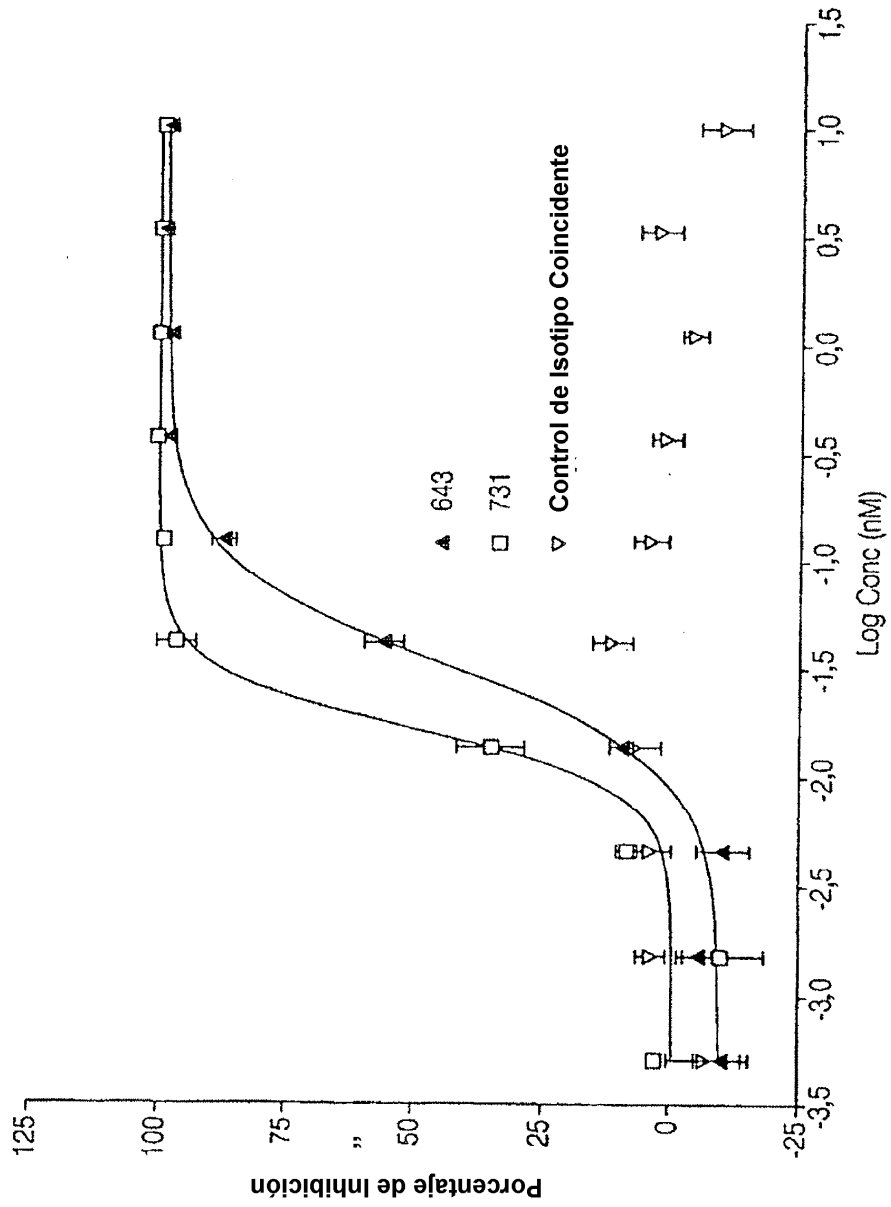


FIG. 3

Capacidad de IL13 o IL13Q110R para inhibir la unión de 731 o 623 a
placas de ELISA recubiertas con IL13

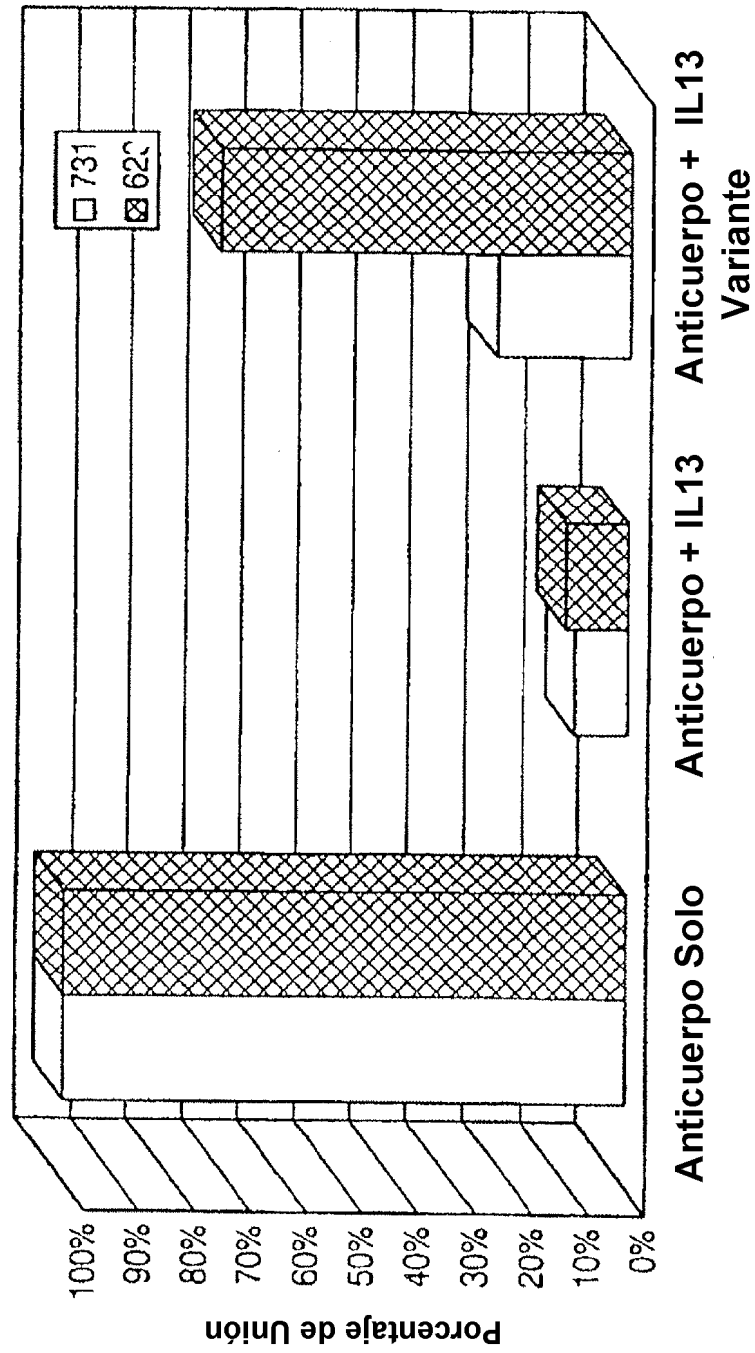


FIG. 4

Competición de Receptores Sobre la Célula

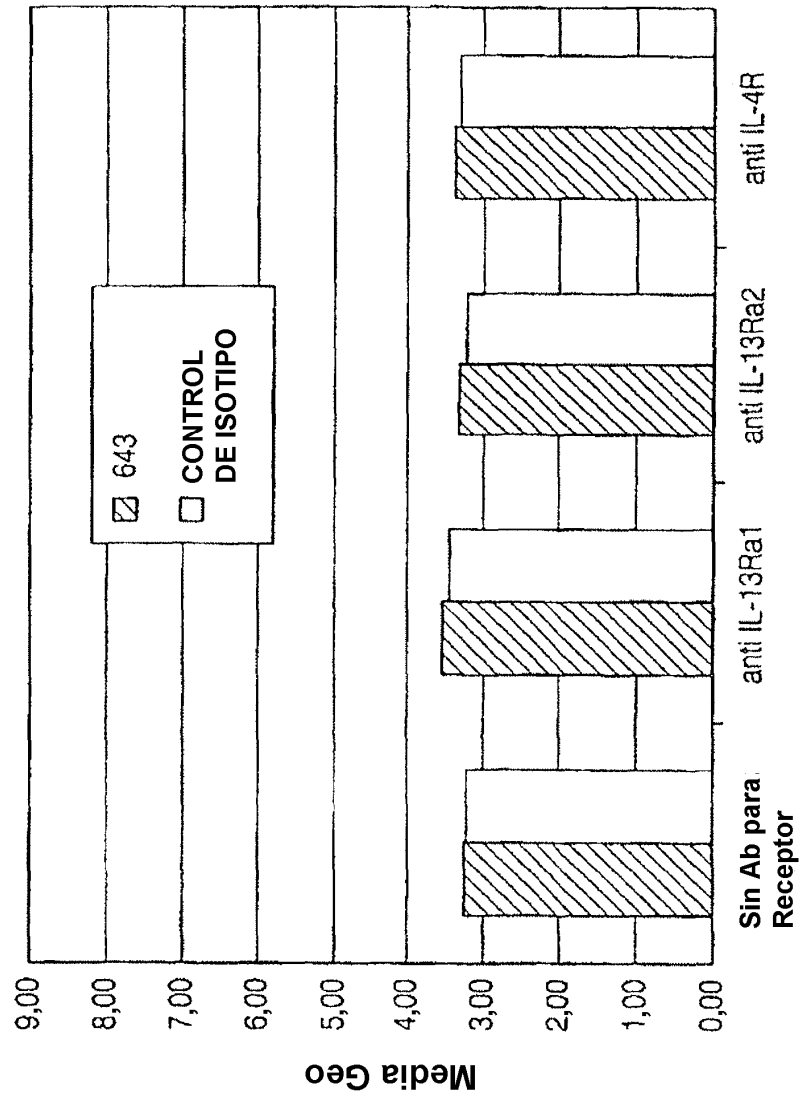


FIG. 5A

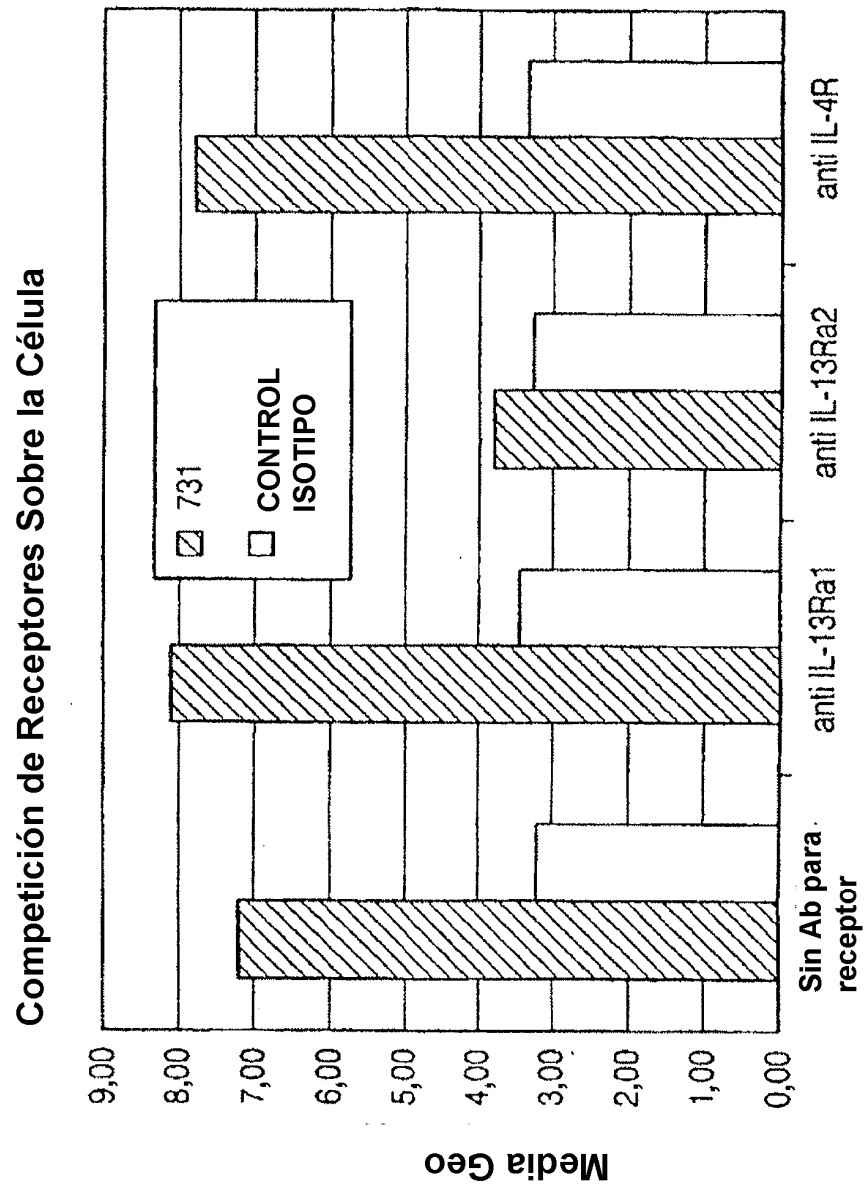


FIG. 5B

FIG. 5C

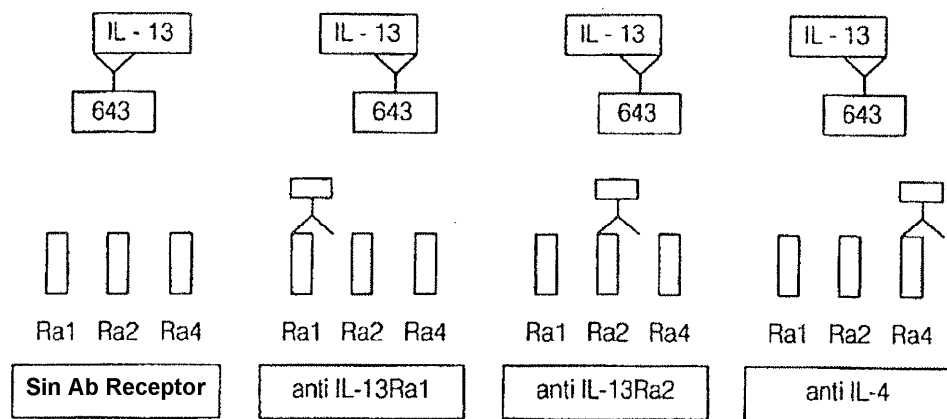
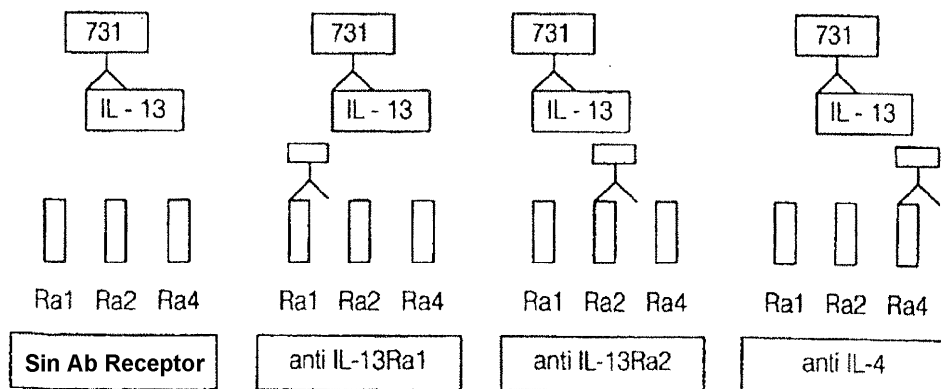


FIG. 5D



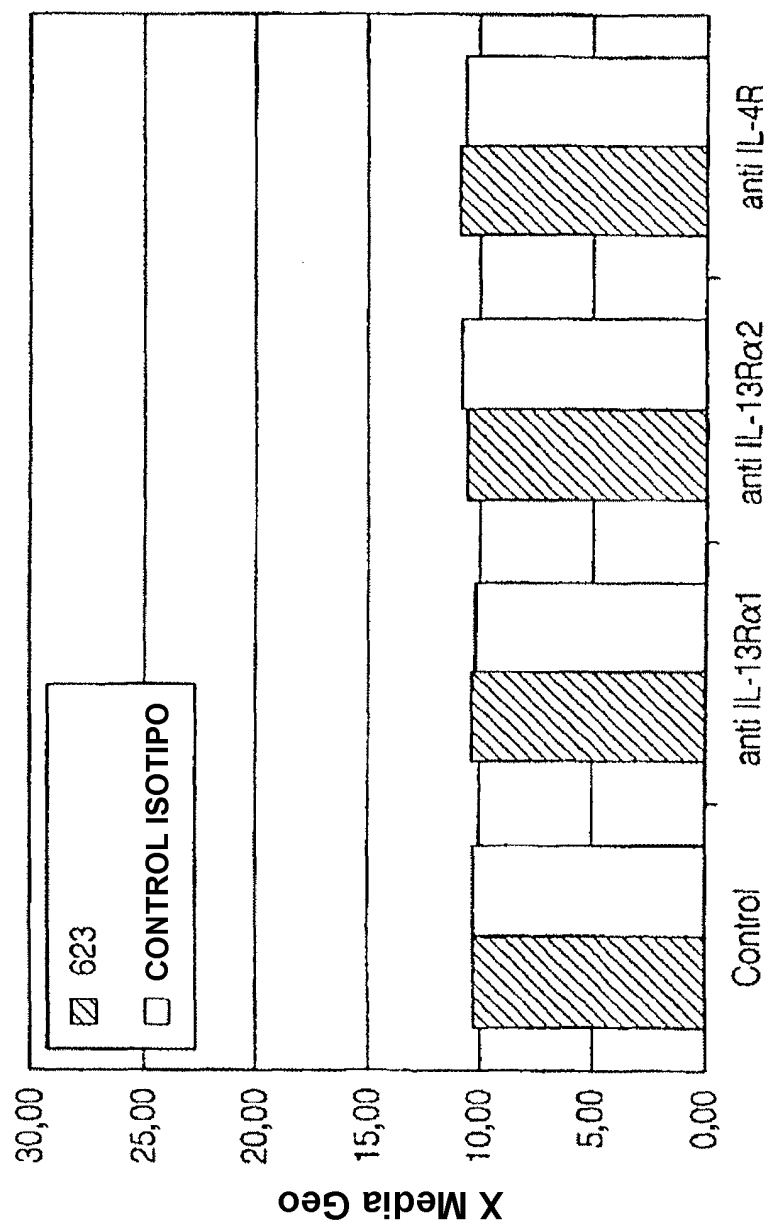
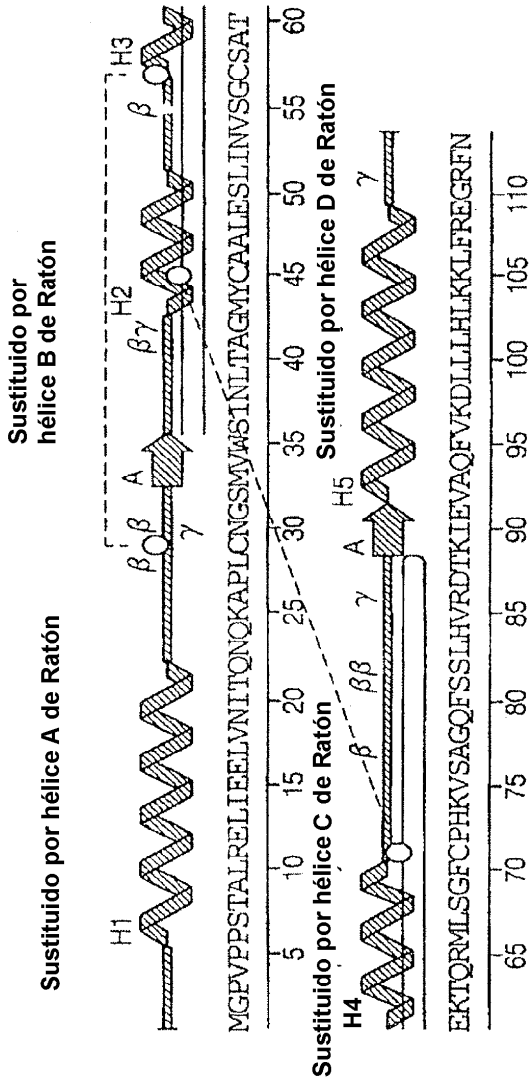


FIG. 5E

(82)	82	90	100	110	120	132	
fago 693	(1)			YKIGEPHKDITM			SEQ ID NO: 70
Hu IL-13	(82)	TQMLSGFCPHKVSAGQFSSLHV	RDTKIEVAQFVKDILLHLKLF	REGFRN			SEQ ID NO: 71
Consenso	(82)			IA KD L			

FIG. 6A



SEQ ID NO: 72

FIG. 6B

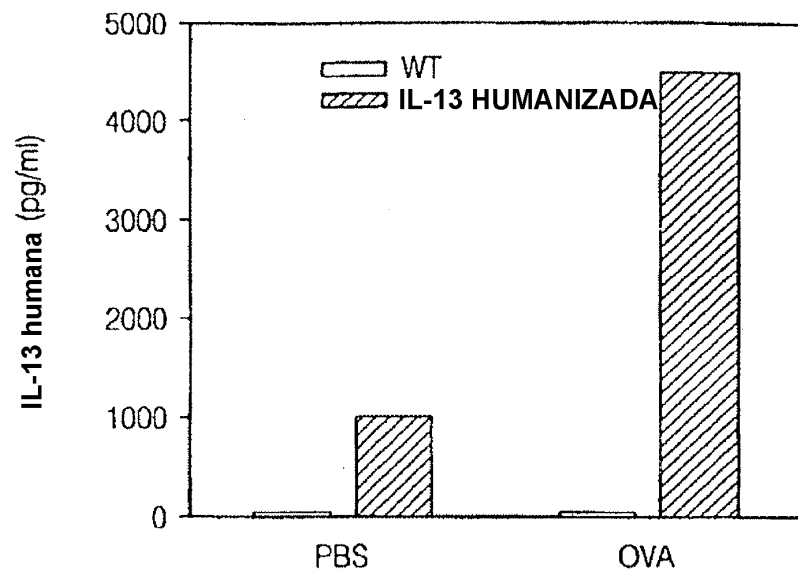


FIG. 7A

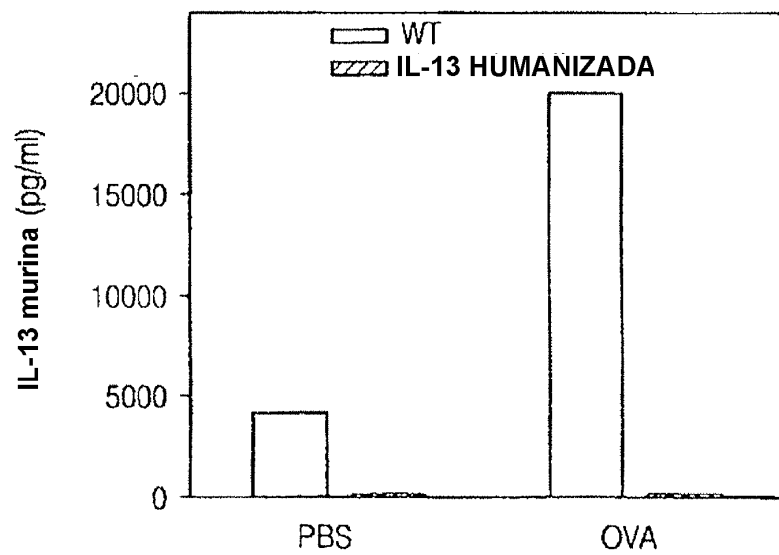


FIG. 7B

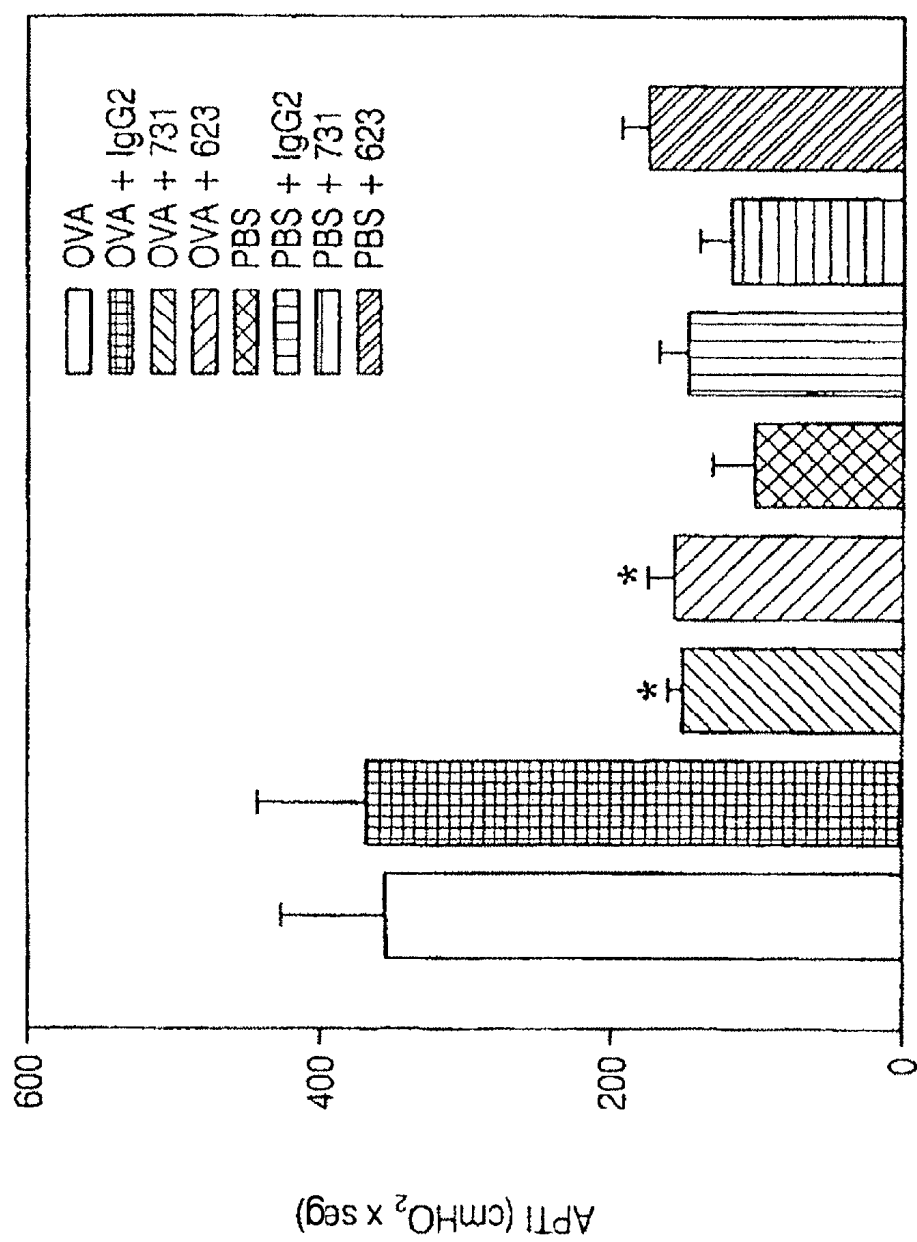


FIG. 8

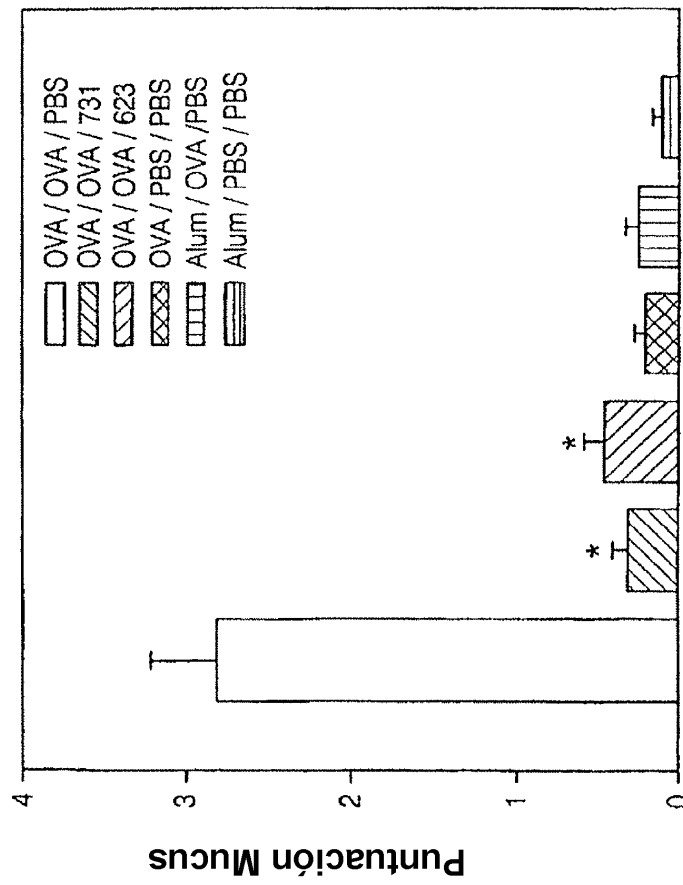


FIG. 9

GPVPPSTALRELIEELVNI**TQNO****KAPLC**NGSMVWSINLTAGMYCAALESLINVSGCSAIEKTQRM¹LSGFCPHKVSAG
 QFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLLLHLKKLFREG²RN (SEQ ID NO: 96)

FIG. 10

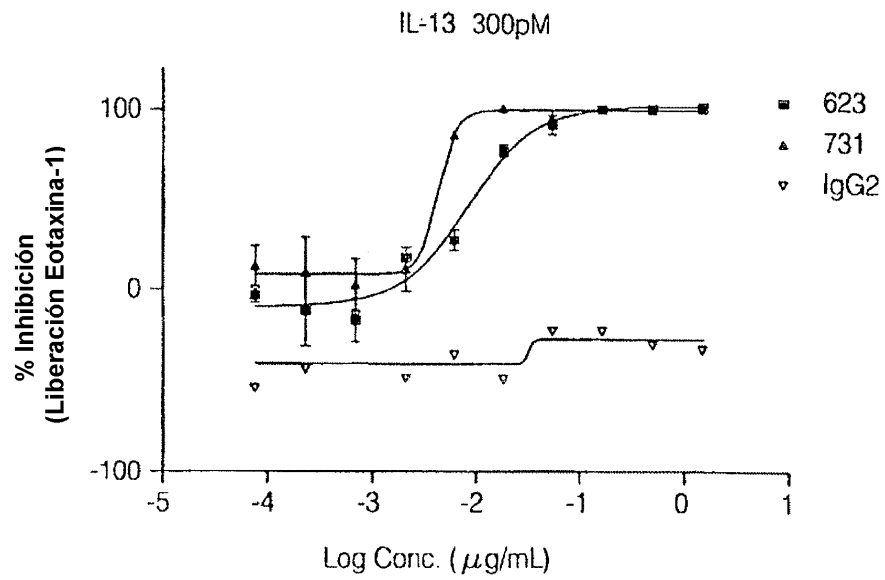


FIG. 11A

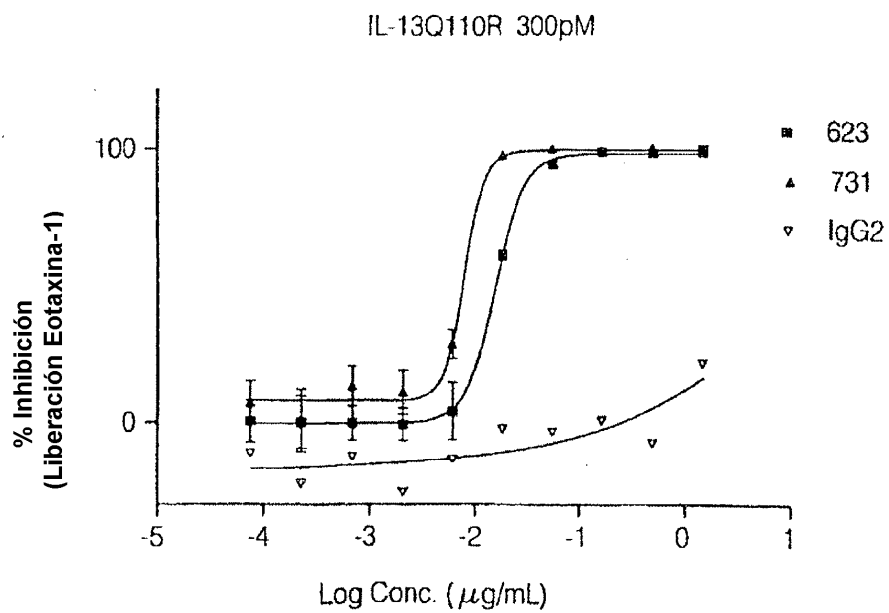


FIG. 11B

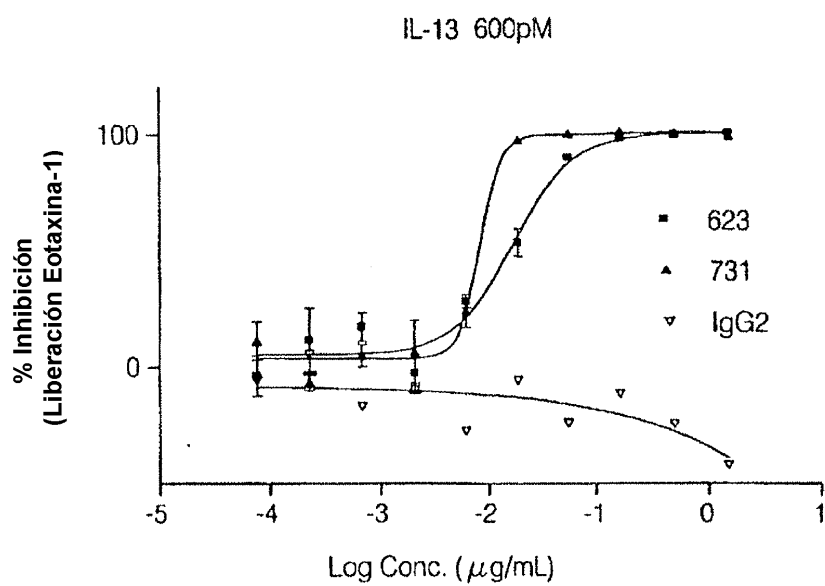


FIG. 11C

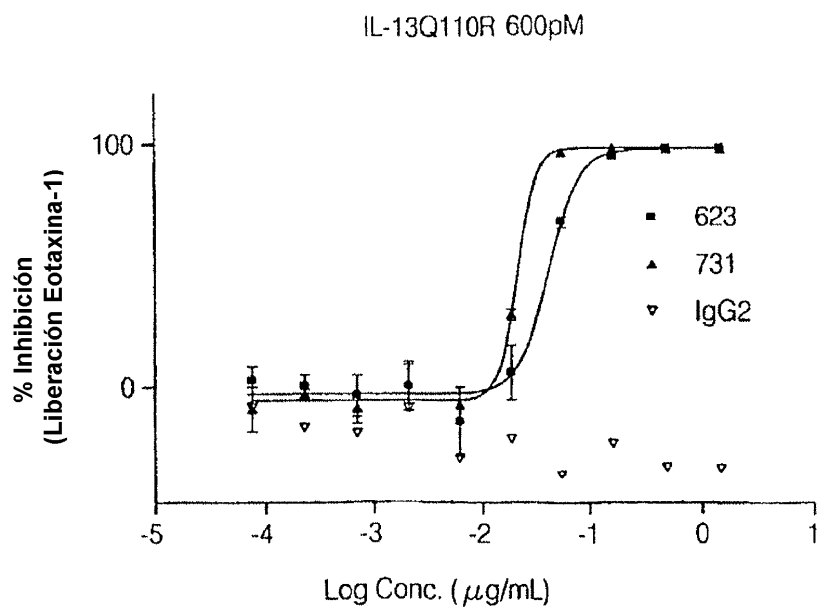


FIG. 11D

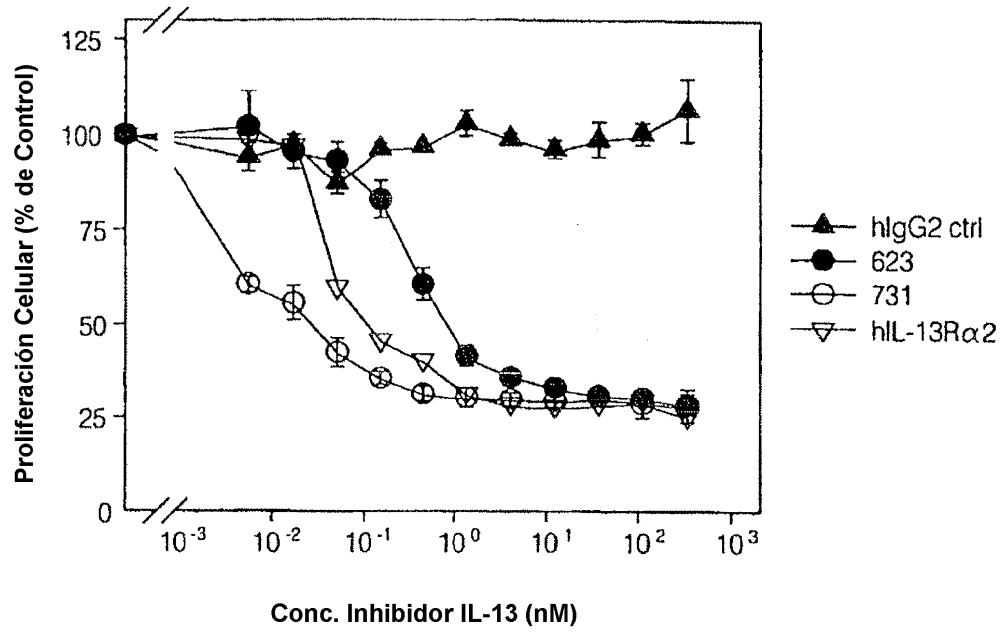


FIG. 12A

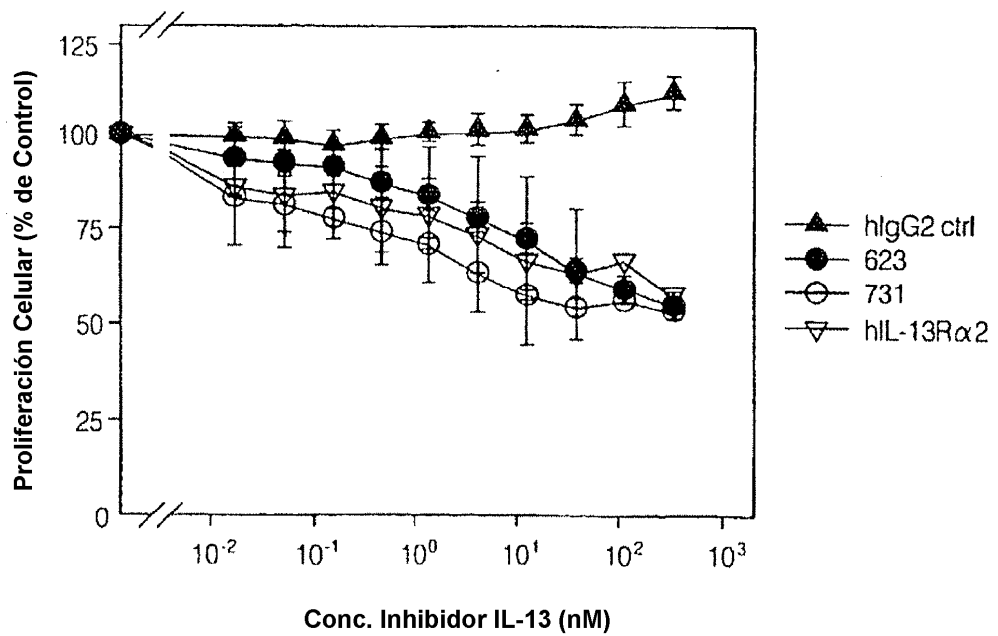


FIG. 12B

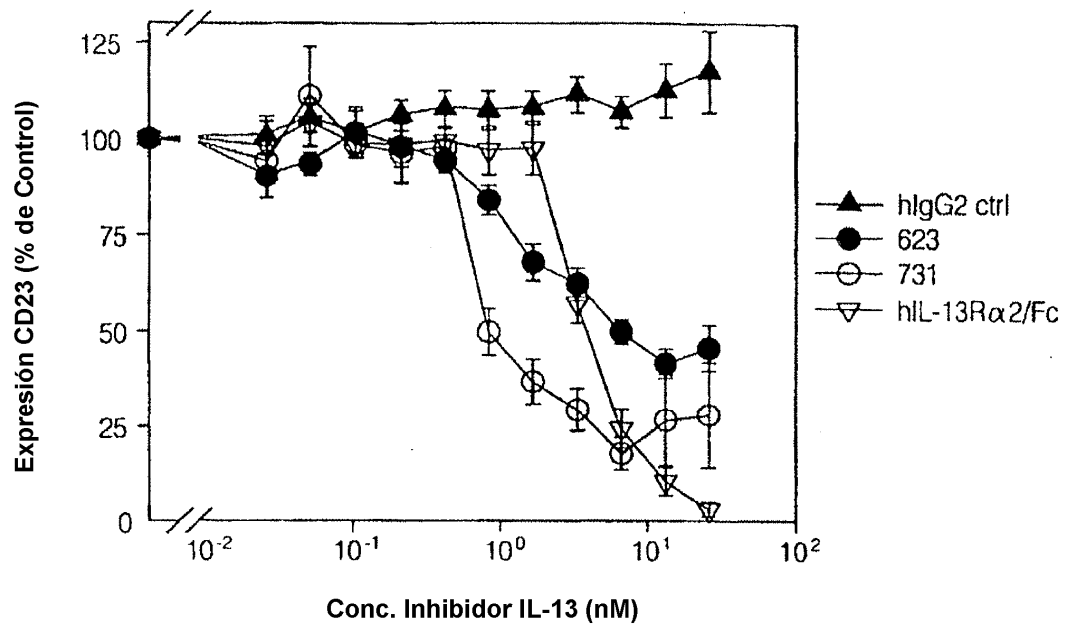


FIG. 13

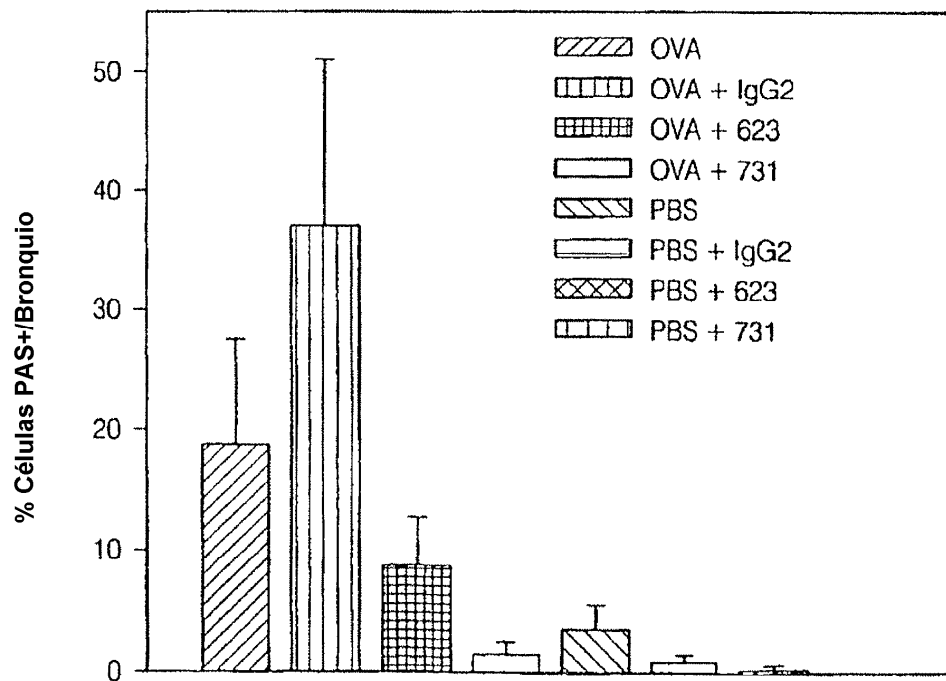


FIG. 14

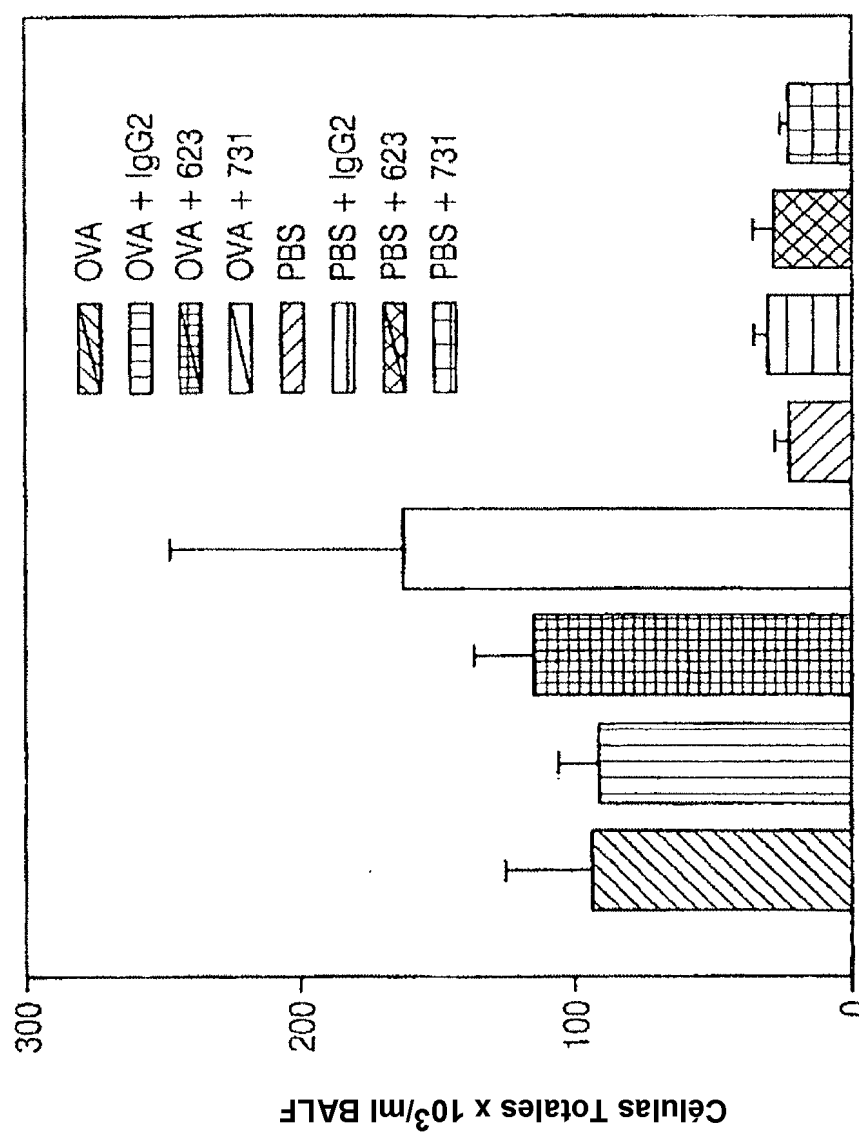


FIG. 15

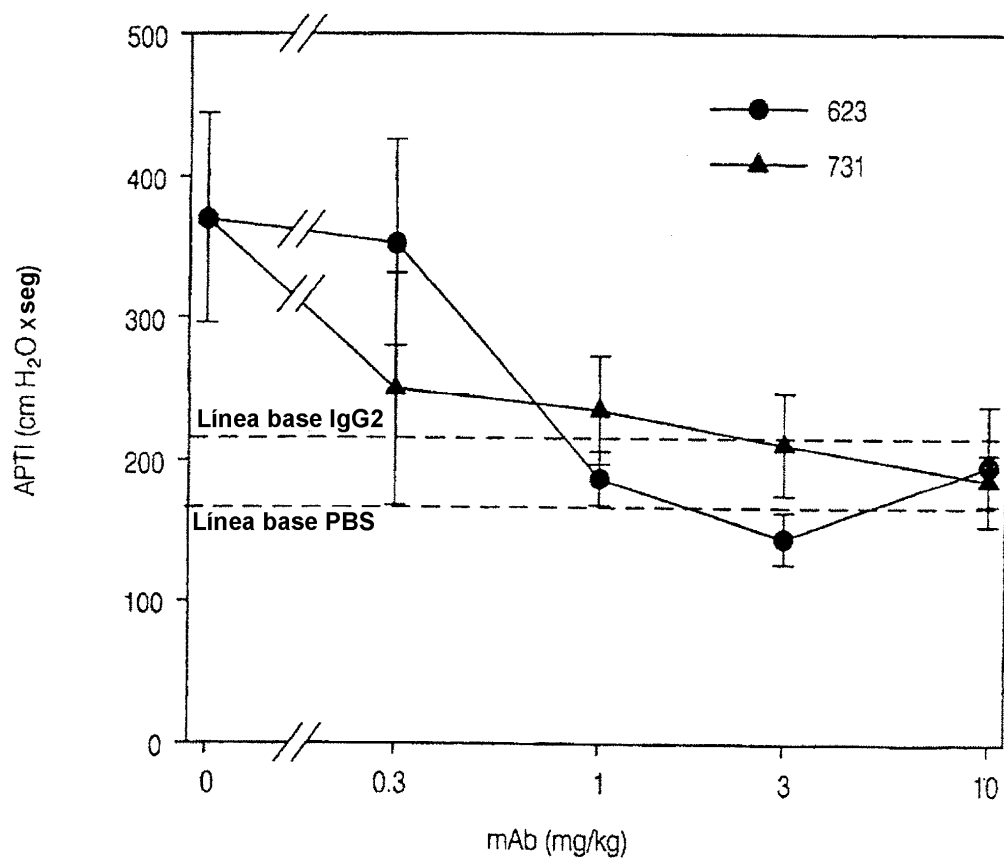


FIG. 16

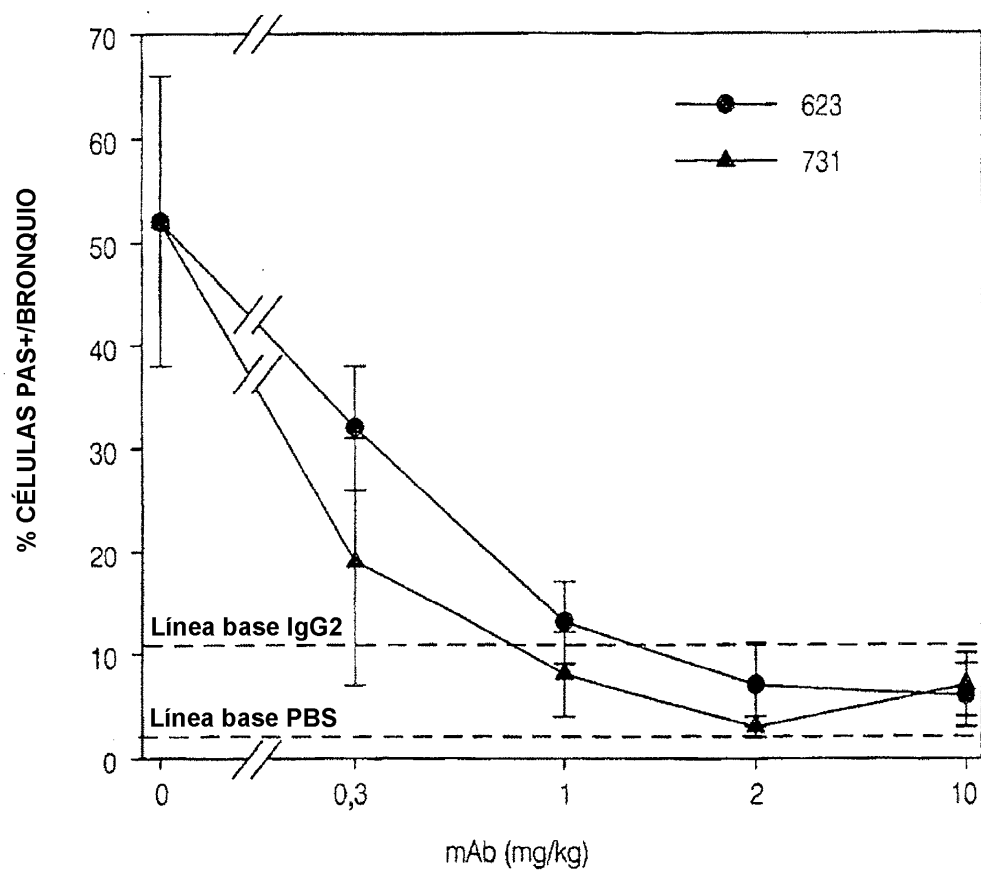


FIG. 17

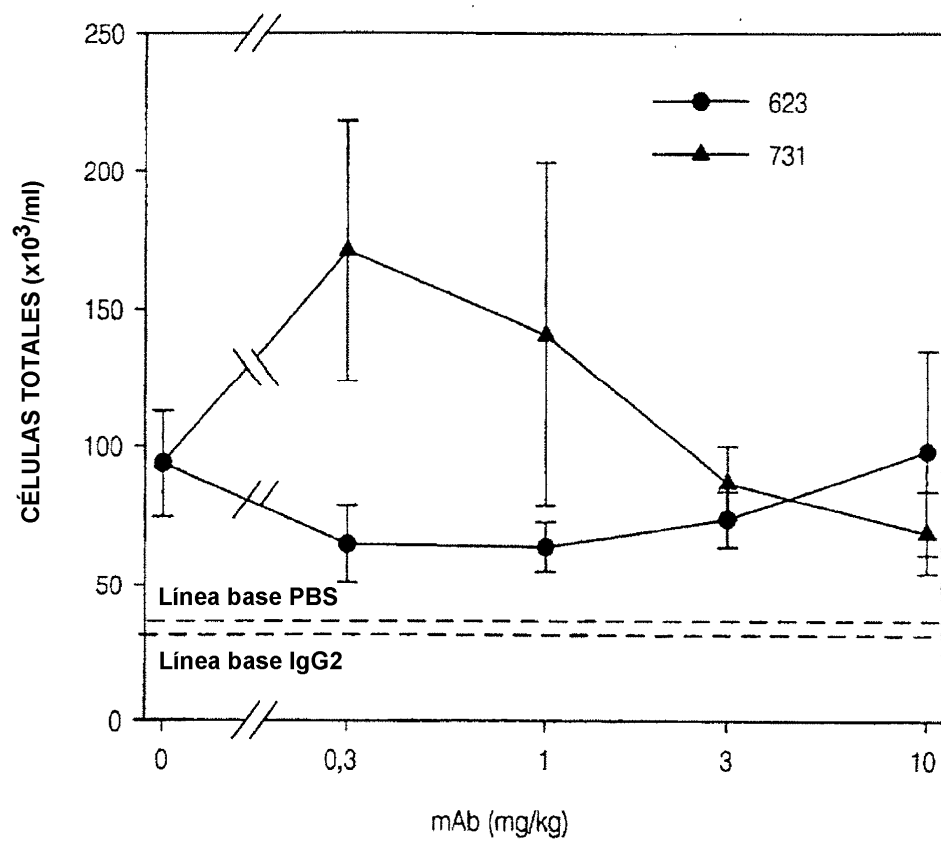


FIG. 18

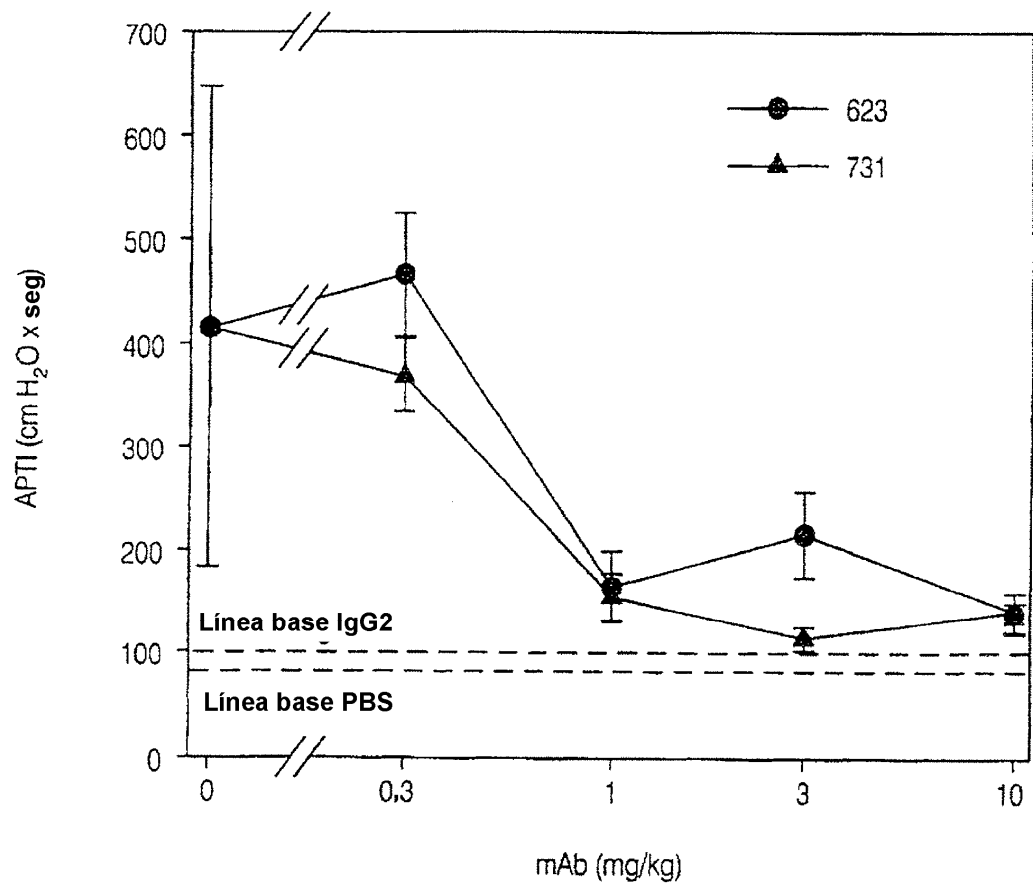


FIG. 19

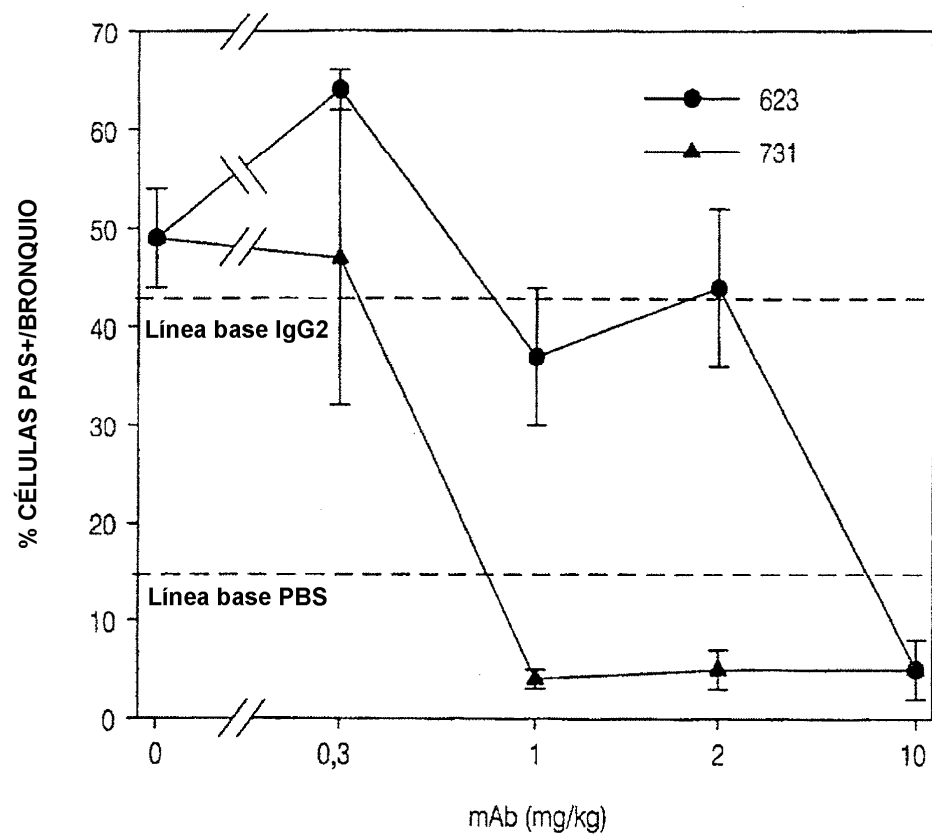


FIG. 20

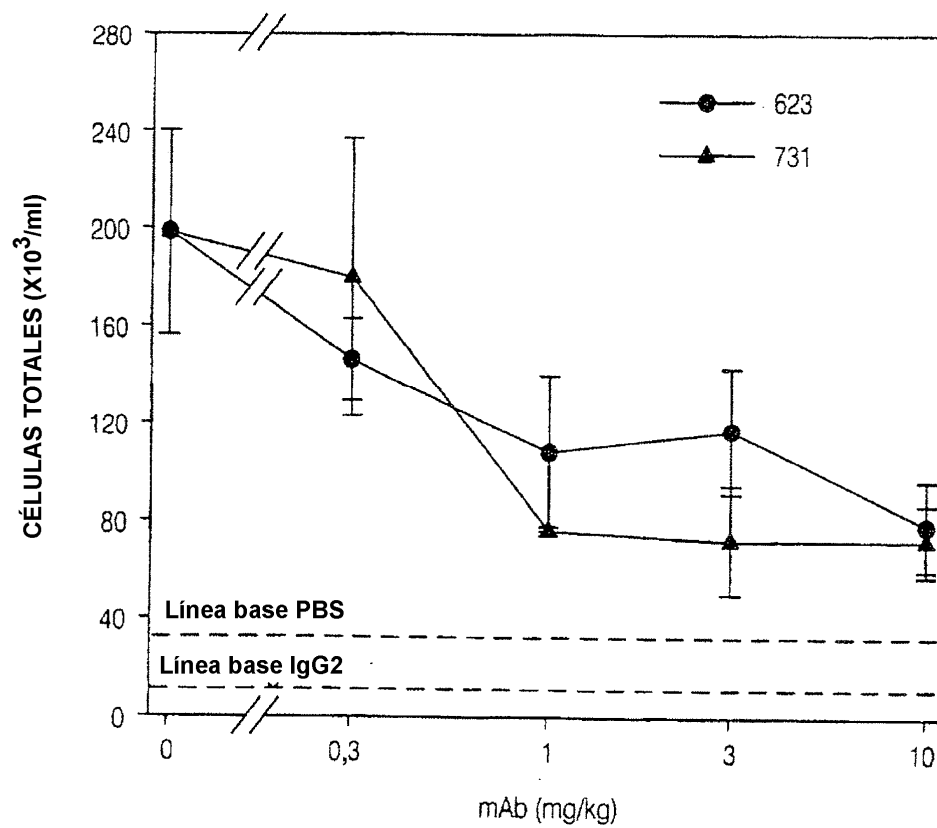


FIG. 21

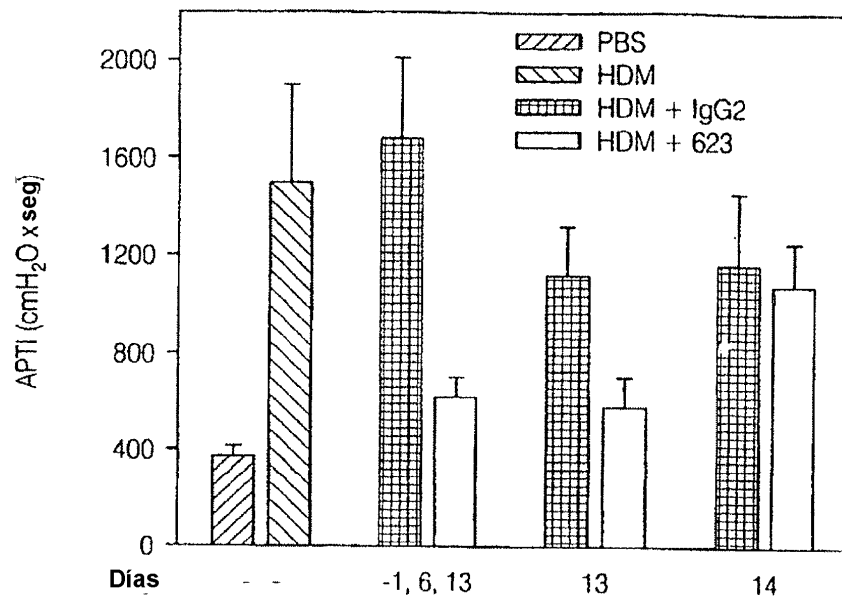


FIG. 22A

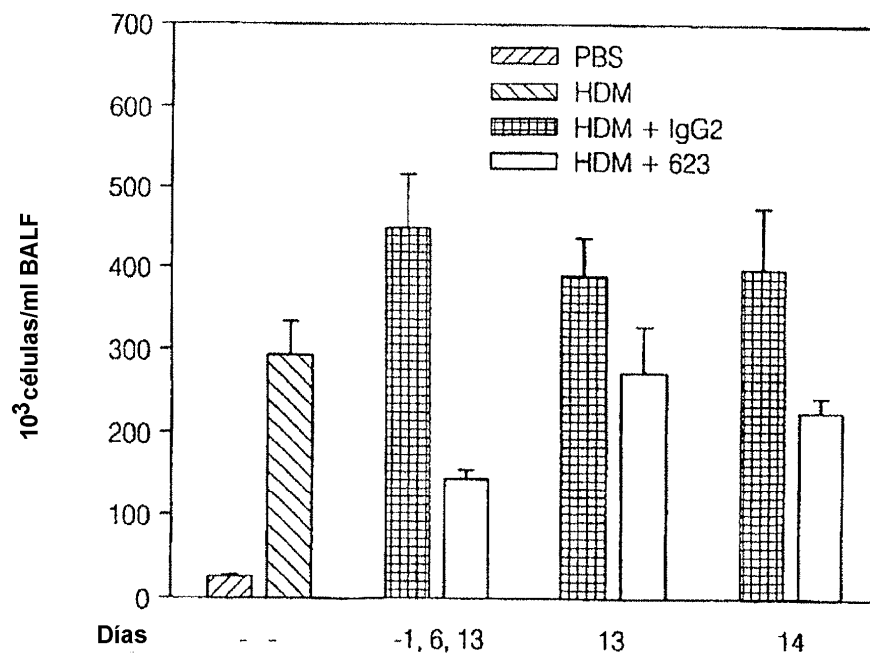


FIG. 22B

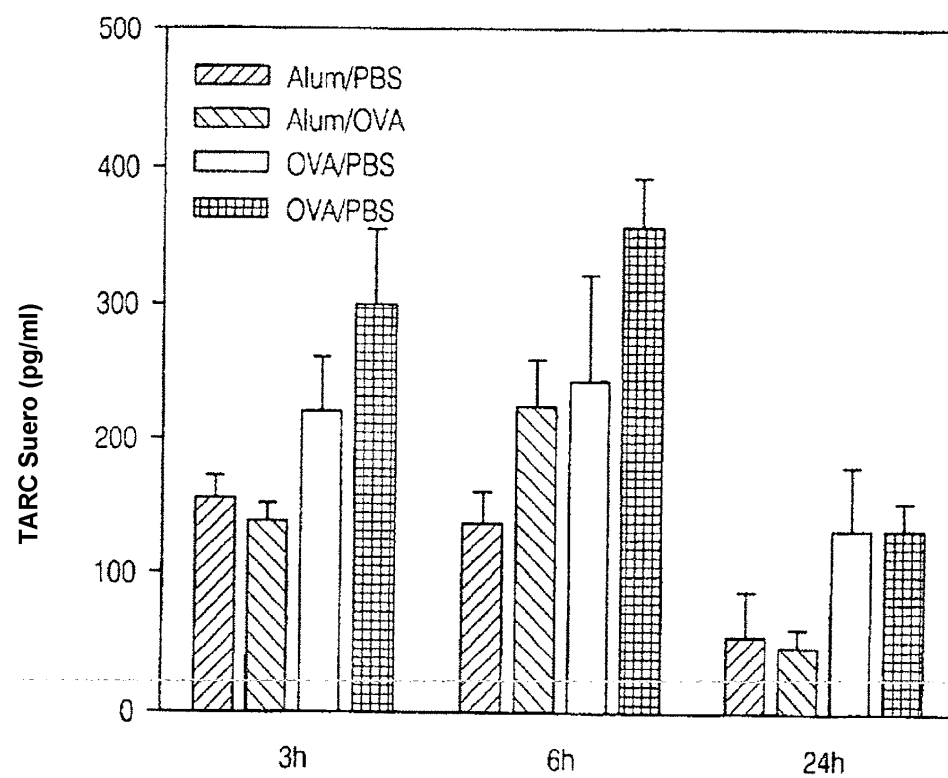


FIG. 23

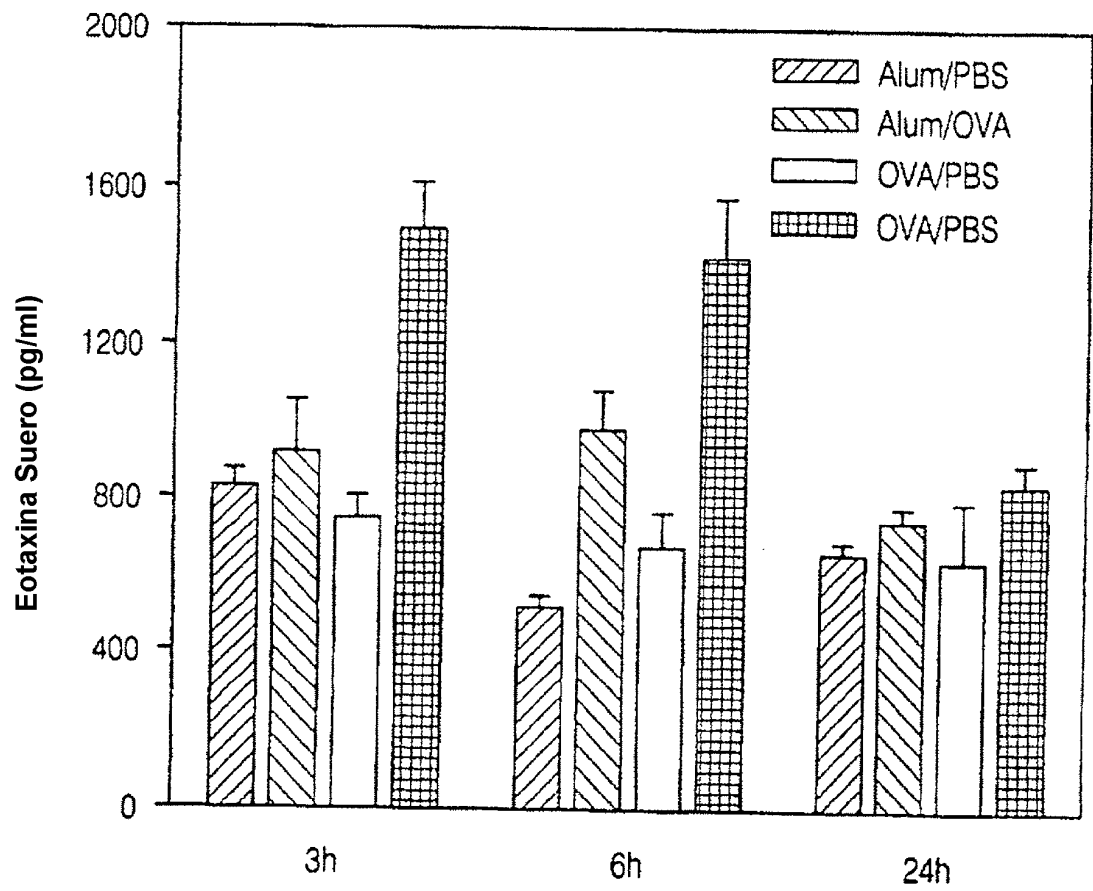


FIG. 24

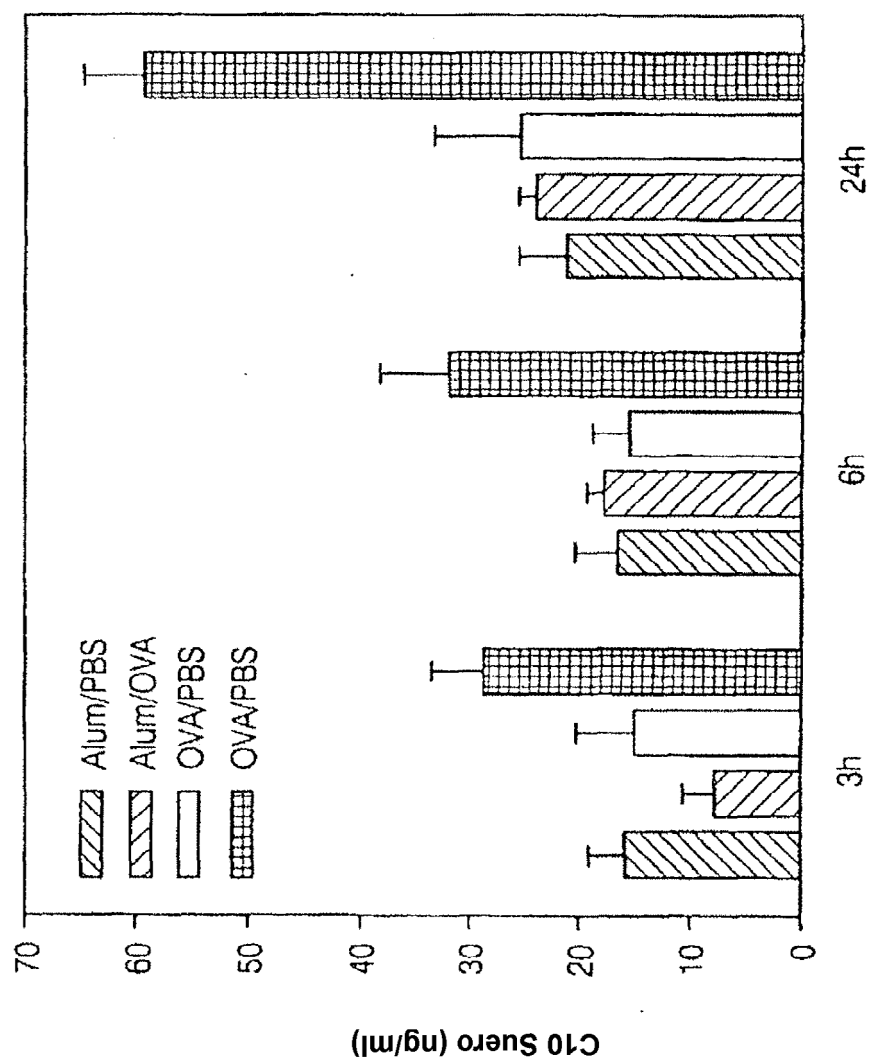


FIG. 25

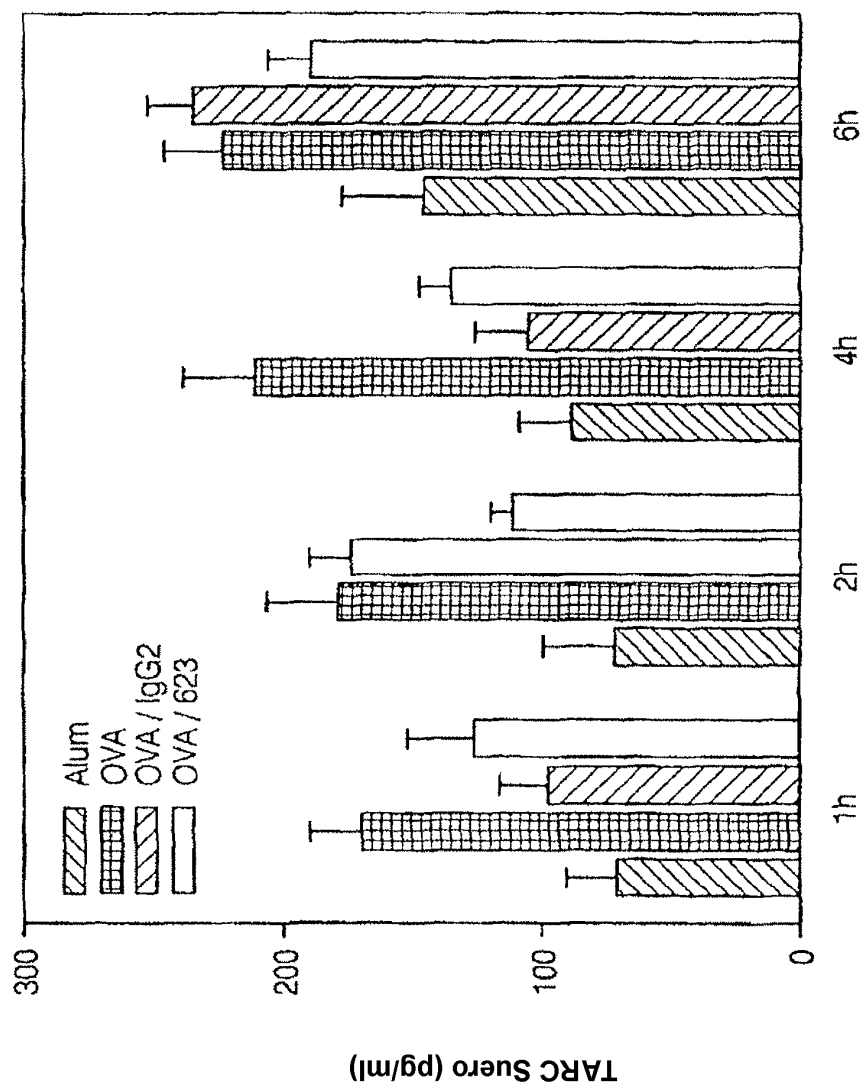


FIG. 26

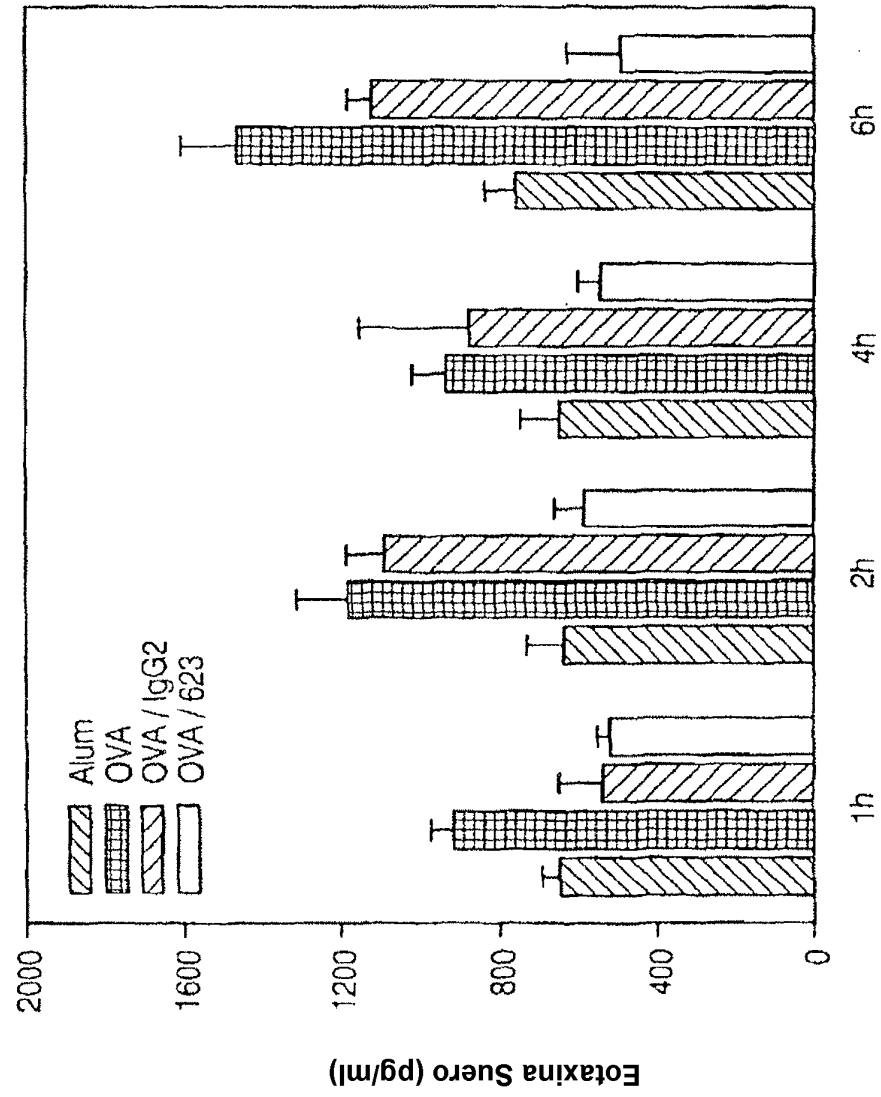


FIG. 27

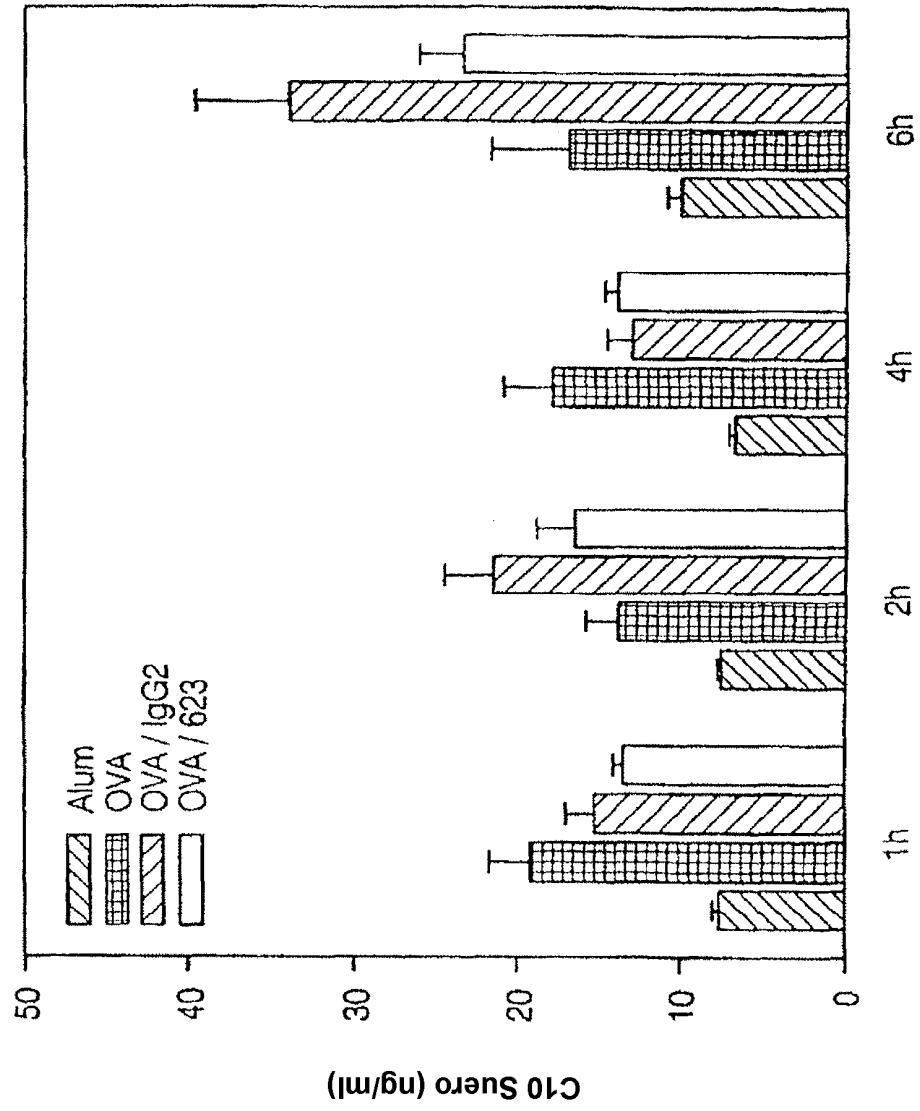


FIG. 28