



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 079**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04743400 .6**

96 Fecha de presentación : **15.07.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1646656**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.04.2006**

54 Título: **Moléculas de anticuerpo humanas para IL-13.**

30 Prioridad: **15.07.2003 US 487512 P**
31.03.2004 US 558216 P
31.03.2004 GB 0407315
24.05.2004 US 573791 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.06.2011

73 Titular/es: **MEDIMMUNE LIMITED**
Milstein Building Granta Park
Cambridge CB21 6GH, GB

72 Inventor/es: **Monk, Phillip, David;**
Jermutus, Lutz;
Minter, Ralph, Raymond y
Shorrock, Celia, Patricia

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 361 079 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Moléculas de anticuerpo humanas para IL-13

La presente invención se refiere a miembros de unión específicos, en particular a moléculas de anticuerpo anti-IL-13 humana y especialmente aquellas que neutralizan la actividad de IL-13. Se refiere además a moléculas de anticuerpo anti-IL-13 para usarse en el diagnóstico o tratamiento de trastornos relacionados con IL-13, incluyendo asma, dermatitis atópica, rinitis alérgica, fibrosis, enfermedad inflamatoria del intestino y linfoma de Hodgkin.

Las realizaciones preferidas de la presente invención emplean el dominio VH y/o VL del anticuerpo de la molécula de anticuerpo denominada en la presente memoria BAK502G9. Las realizaciones preferidas adicionales emplean las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de BAK502G9, especialmente VH CDR3 en otras regiones marco del anticuerpo. Los aspectos adicionales de la presente invención proporcionan composiciones que contienen miembros de unión específicos de la invención.

La presente invención proporciona moléculas de anticuerpo con un valor particular en la unión y neutralización de IL-13 y, por lo tanto, en el uso en cualquiera de numerosos tratamientos terapéuticos, como se indica por la experimentación contenida en la presente memoria y además por la bibliografía técnica de soporte.

La interleuquina (IL-)-13 es una citoquina de 114 aminoácidos con una masa molecular no modificada de aproximadamente 12 kDa [1,2]. IL-13 está muy relacionada con IL-4 con la que comparte un 30% de similitud de secuencia a nivel de aminoácidos. El gen de IL-13 humano está localizado en el cromosoma 5q31 adyacente al gen de IL-4 [1][2]. Esta región del cromosoma 5q contiene secuencias génicas para otras citoquinas derivadas de linfocitos Th2 incluyendo GM-CSF e IL-5, cuyos niveles junto con los de IL-4 se ha mostrado que se correlacionan con la gravedad de la enfermedad en asmáticos y modelos de roedores de inflamación alérgica [3] [4] [5] [6] [7] [8].

Los ácidos nucleicos que codifican las proteínas IL-13 humana e IL-13 purificada se describen en WO 94/04680.

Aunque inicialmente se identificó como una citoquina derivada de linfocitos Th2 CD4+, IL-13 también se produce por las células T Th1 CD4+, linfocitos T CD8+ células NK y poblaciones de células no T tales como mastocitos, basófilos, eosinófilos, macrófagos, monocitos y células del músculo liso de las vías aéreas.

Se ha indicado que IL-13 media sus efectos a través de un sistema de receptor que incluye la cadena α del receptor de IL-4 (IL-4R α); que en sí mismo puede unirse a IL-4 pero no a IL-13 y al menos dos proteínas más de la superficie celular, IL-13R α 1 e IL-13R α 2 [9] [10]. IL-13R α 1 puede unirse a IL-13 con baja afinidad, reclutando posteriormente IL-4R α para formar un receptor funcional con alta afinidad que señala [11] [12]. La base de datos Genbank lista la secuencia de aminoácidos y la secuencia de ácido nucleico de IL-13R α 1 como NP_001551 e Y10659 respectivamente. Los estudios en ratones deficientes en STAT6 (transductor de señales y activador de la transcripción 6) han revelado que IL-13, de manera similar a IL-4, señala utilizando la ruta JAK-STAT6 [13][14]. IL-13R α 2 comparte un 37% de identidad de secuencia con IL-13R α 1 a nivel de aminoácidos y se une a IL-13 con alta afinidad [15][16]. Sin embargo, IL-13R α 2 tiene una cola citoplásmica más corta que carece de restos de señalización conocidos. Las células que expresan IL-13R α 2 no responden a IL-13 incluso en presencia de IL-4R α [17]. Se postula, por lo tanto, que IL-13R α 2 actúa como un receptor señuelo que regula la función de IL-13 pero no de IL-4. Esto se ve apoyado por estudios en ratones deficientes en IL-13R α 2 cuyo fenotipo era consistente con una respuesta incrementada a IL-13 [18] [19]. La base de datos Genbank lista la secuencia de aminoácidos y la secuencia de ácido nucleico de IL-13R α 2 como NP_000631 e Y08768 respectivamente.

La señalización del complejo de receptor IL-13R α 1/IL-4R α se expresa en células B humanas, mastocitos, monocitos/macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, basófilos, fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales de las vías aéreas y células del músculo liso de las vías aéreas.

El asma bronquial es una enfermedad inflamatoria persistente común del pulmón caracterizada por la hiperrespuesta de las vías aéreas, sobreproducción de moco, fibrosis y niveles de IgE elevados en suero. La hiperrespuesta de las vías aéreas (AHR) es la constricción exagerada de las vías aéreas a estímulos no específicos tal como aire frío. Se piensa que tanto AHR como la sobreproducción de moco son responsables de la obstrucción variable de las vías aéreas que da lugar a la dificultad respiratoria característica de los ataques de asma (exacerbaciones) y que es responsable de la mortalidad asociada con esta enfermedad (alrededor de 2.000 muertes/año en el Reino Unido).

La incidencia del asma, junto con otras enfermedades alérgicas, se ha incrementado significativamente en los últimos años [20] [21]. Por ejemplo, actualmente, alrededor de un 10% de la población del Reino Unido (UK) ha sido diagnosticado como asmático.

Las directrices actuales de la British Thoracic Society (BTS) y de Global Initiative for Asthma (GINA) sugieren un método en etapas para el tratamiento del asma [22, 23]. El asma de suave a moderado puede controlarse habitualmente mediante el uso de corticosteroides inhalados, en combinación con agonistas beta o inhibidores de leucotrieno. Sin embargo, debido a los efectos secundarios documentados de los corticosteroides, los pacientes tienden a no seguir el régimen de tratamiento lo que reduce la eficacia del tratamiento [24-26].

Existe una necesidad clara de nuevos tratamientos para los sujetos con la enfermedad más grave, que frecuentemente obtienen un beneficio muy limitado de dosis más altas de corticosteroides inhalados u orales recomendadas por las directrices del asma. El tratamiento a largo plazo con corticosteroides orales está asociado con efectos secundarios tales como osteoporosis, velocidades de crecimiento ralentizadas en niños, diabetes y candidiasis oral [88]. Como tanto los efectos beneficiosos como adversos de los corticosteroides están mediados por el mismo receptor, el tratamiento es un equilibrio entre la seguridad y la eficacia. La hospitalización de estos pacientes, que representa alrededor del 6% de la población con asma de UK, como resultado de exacerbaciones graves representa la mayoría de la carga económica significativa del asma sobre las autoridades sanitarias [89].

Se cree que la patología del asma está causada por la inflamación en curso mediada por los linfocitos Th2 que resulta de respuestas inapropiadas del sistema inmune frente a antígenos no dañinos. Se ha recogido evidencia que implica a IL-13, en lugar de la citoquina IL-4 clásica derivada de Th2, como el mediador clave en la patogénesis de la enfermedad de las vías aéreas establecida.

La administración de IL-13 recombinante a las vías aéreas de roedores sin estimular no sensibilizados causó muchos aspectos del fenotipo de asma incluyendo inflamación de las vías aéreas, producción de moco y AHR [27] [28] [29] [30]. Se observó un fenotipo similar en un ratón transgénico en el que IL-13 se sobreexpresó específicamente en el pulmón. En este modelo, una exposición más crónica a IL-13 también resultó en fibrosis [31].

Además, en modelos de roedores de enfermedad alérgica muchos aspectos del fenotipo del asma se han asociado con IL-13. Se ha mostrado que IL-13R α 2 soluble murina, un neutralizador de IL-13 potente, inhibe AHR, hipersecreción de moco y el influjo de las células inflamatorias que son características de este modelo de roedor [27] [28] [30]. En estudios complementarios, ratones en los que el gen IL-13 se había delecionado, no desarrollaron AHR inducida por alérgenos. AHR pudo restaurarse en estos ratones deficientes en IL-13 por la administración de IL-13 recombinante. Por el contrario, los ratones deficientes en IL-4 desarrollaron enfermedad de las vías aéreas en este modelo [32] [33].

Usando un modelo de inflamación pulmonar inducida por alérgeno a largo plazo, Taube *et al.* demostraron la eficacia de IL-13R α 2 soluble murina frente a enfermedad de las vías aéreas establecida [34]. IL-13R α 2 soluble murina inhibió AHR, la sobreproducción de moco y en menor medida la inflamación de las vías aéreas. Por el contrario, IL-4R α soluble, que se une y antagoniza IL-4, tuvo un efecto pequeño en AHR o inflamación de las vías aéreas en este sistema [35]. Estos descubrimientos fueron apoyados por Blease *et al.* que desarrollaron un modelo fúngico crónico de asma en el que anticuerpos policlonales frente a IL-13 pero no a IL-4 fueron capaces de reducir la sobreproducción de moco, AHR y fibrosis subepitelial [36].

Varios polimorfismos genéticos en el gen de IL-13 también se han asociado con la enfermedad alérgica. En particular, una variante del gen de IL-13 en la que el resto de arginina en el aminoácido 130 está sustituido por glutamina (R130Q) se ha asociado con asma bronquial, dermatitis atópica y niveles de IgE elevados en suero [37] [38] [39] [40]. Esta variante de IL-13 particular, también se refiere como variante R110Q (el resto de arginina en el aminoácido 110 está sustituido por glutamina) por algunos grupos para excluir la secuencia señal de 20 aminoácidos del recuento de aminoácidos. Arima *et al.*, [41] indican que esta variante está asociada con niveles elevados de IL-13 en suero. La variante de IL-13 (R130Q) y los anticuerpos frente a esta variante se discuten en WO 01/62933. Un polimorfismo en el promotor de IL-13, que altera la producción de IL-13, también se ha asociado con el asma alérgico [42].

También se han medido niveles elevados de IL-13 en sujetos humanos con asma, rinitis atópica (fiebre del heno), dermatitis alérgica (eccema) y sinusitis crónica. Por ejemplo, se encontró que los niveles de IL-13 eran mayores en biopsias bronquiales, esputo y células de lavado bronco-alveolar (BAL) de asmáticos comparado con sujetos control [43] [44] [45] [46]. Además, los niveles de IL-13 en muestras de BAL se incrementaron en individuos asmáticos después de un pulso con alérgeno [47] [48]. Además, se ha mostrado que la capacidad de producción de IL-13 de células T CD4(+) es un marcador de riesgo útil para el desarrollo posterior de enfermedad alérgica en recién nacidos [49].

Li *et al.* [114] han indicado recientemente efectos de un anticuerpo neutralizante anti-IL-13 de ratón en un modelo de asma crónico en ratón. La respuesta semejante al asma crónico (tal como AHR, inflamación grave de las vías aéreas, hiper producciones de moco) se indujo en ratones sensibilizados con OVA. Li *et al.* indican que la administración de un anticuerpo IL-13 en el momento de cada pulso con OVA suprime AHR, infiltración de eosinófilos, niveles de IgE en suero, niveles de citoquina/quimoquina proinflamatorias y remodelación de las vías aéreas [14]. Kuperman *et al.*, Nature Medicine, vol. 8, no. 8, 2002, páginas 885-889 han mostrado que la interleuquina-13 tiene efectos directos en las células epiteliales para causar hiperactividad en las vías aéreas y sobreproducción de moco en el asma.

En resumen, estos datos proporcionan indicaciones de que IL-13 en lugar de IL-4 es una diana más atractiva para el tratamiento de enfermedades alérgicas humanas.

IL-13 puede jugar un papel en la patogénesis de la enfermedad inflamatoria del intestino. Heller et al. [116] indican que la neutralización de IL-13 por la administración de IL-13R α 2 soluble mejora la inflamación colónica en un modelo murino de colitis ulcerosa humana [116]. Consecuentemente, la expresión de IL-13 fue más alta en especímenes de biopsia rectal de pacientes con colitis ulcerosa cuando se compara con controles [117].

Aparte del asma, IL-13 se ha asociado con otras condiciones fibróticas. Se han medido niveles incrementados de IL-13, hasta 1.000 veces mayores que IL-4, en el suero de pacientes con esclerosis sistémica [50] y en muestras BAL de pacientes afectados con otras formas de fibrosis pulmonar [51]. Consecuentemente, la sobreexpresión de IL-13 pero no de IL-4 en el pulmón de ratón resultó en fibrosis pronunciada [52][53]. La contribución de IL-13 a la fibrosis en tejidos distintos del pulmonar se ha estudiado extensamente en un modelo de ratón de fibrosis hepática inducida por parásitos. La inhibición específica de IL-13 por la administración de IL-13R α 2 soluble o interrupción génica de IL-13, pero no la supresión de la producción de IL-4, impidió la fibrogénesis en el hígado [54][55][56].

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (COPD) incluye poblaciones de pacientes con varios grados de bronquitis crónica, enfermedad de las vías aéreas pequeñas y enfisema y se caracteriza por la disminución progresiva irreversible de la función pulmonar que responde de manera pobre a la terapia actual basada en asma [90].

La incidencia de COPD se ha elevado dramáticamente en los últimos años para convertirse en la cuarta causa de muerte en el mundo (Organización Mundial de la Salud). Por lo tanto, COPD representa una necesidad médica importante sin cubrir.

Las causas subyacentes de COPD todavía se conocen poco. La "hipótesis Holandesa" propone que existe una susceptibilidad común a COPD y asma y, por lo tanto, que mecanismos similares pueden contribuir a la patogénesis de ambos trastornos [57].

Zheng et al [58] han demostrado que la sobreexpresión de IL-13 en el pulmón de ratón causaba enfisema, producción elevada de moco e inflamación, lo que refleja aspectos de COPD humana. Además, AHR, una respuesta dependiente de IL-13 en modelos murinos de inflamación alérgica, se ha mostrado que es predictiva de la disminución de la función pulmonar en fumadores [59]. También se ha establecido un vínculo entre un polimorfismo del promotor de IL-13 y la susceptibilidad para desarrollar COPD [60].

Los signos son por lo tanto que IL-13 juega un papel importante en la patogénesis de COPD, particularmente en pacientes con características semejantes al asma, incluyendo AHR y eosinofilia. Se ha mostrado que los niveles de ARNm de IL-13 son mayores en muestras de tejido de autopsia de sujetos con una historia de COPD cuando se compara con muestras de pulmón de sujetos sin enfermedad pulmonar indicada (J. Elias, Comunicación oral en el American Thoracic Society Annual Meeting 2002). En otro estudio, se demostraron niveles elevados de IL-13 por inmunohistoquímica en secciones de pulmón periféricas de pacientes con COPD [91].

La enfermedad de Hodgkin es un tipo común de linfoma, que representa aproximadamente 7.500 casos por año en los Estados Unidos. La enfermedad de Hodgkin es poco habitual entre las malignidades ya que la célula Reed-Sternberg neoplásica, habitualmente derivada de células B, sólo representa una pequeña proporción de la masa detectable clínicamente. Las líneas celulares derivadas de la enfermedad de Hodgkin y las células primarias Reed-Sternberg expresan frecuentemente IL-13 y su receptor [61]. Como IL-13 estimula la supervivencia y la proliferación celular en células B normales, se propuso que IL-13 podría actuar como un factor de crecimiento para las células Reed-Sternberg. Skinnider et al. han demostrado que los anticuerpos neutralizantes frente a IL-13 pueden inhibir el crecimiento de líneas celulares derivadas de la enfermedad de Hodgkin *in vitro* [62]. Este descubrimiento sugirió que las células Reed-Sternberg podrían incrementar su propia supervivencia por un bucle autocrino y paracrino de citoquina IL-13. Consistente con esta hipótesis, se han detectado niveles elevados de IL-13 en el suero de algunos pacientes con enfermedad de Hodgkin cuando se compara con controles normales [63]. Los inhibidores de IL-13 pueden por lo tanto prevenir la progresión de la enfermedad mediante la inhibición de la proliferación de células Reed-Sternberg malignas.

Muchas células cancerosas humanas expresan antígenos inmunogénicos específicos de tumores. Sin embargo, aunque muchos tumores remiten espontáneamente, otros evaden el sistema inmune (inmunovigilancia) mediante la supresión de la inmunidad mediada por las células T. Terabe *et al.* [64] han demostrado un papel de IL-13 en la inmunosupresión en un modelo de ratón en el que los tumores remiten espontáneamente después del crecimiento inicial y entonces recuren. La inhibición específica de IL-13, con IL-13R α 2 soluble, protegió a estos ratones frente a la recurrencia del tumor. Terabe *et al.* [64] continuaron para mostrar que IL-13 suprime la diferenciación de los linfocitos citotóxicos CD8+ específicos del tumor que median respuestas inmunes anti-tumorales.

Los inhibidores de IL-13 pueden, por lo tanto, usarse terapéuticamente para prevenir la recurrencia tumoral o la metástasis. Se ha mostrado que la inhibición de IL-13 incrementa las vacunas anti-virales en modelos animales y pueden ser beneficiosos en el tratamiento de VIH y otras enfermedades infecciosas [65].

5 WO 03/035847 describe proteínas muteínas de IL-13 y anticuerpos y ácidos nucleicos aislados que codifican estas proteínas y anticuerpos y sus usos terapéuticos.

Debe observarse que generalmente en la presente memoria la referencia a interleuquina-13 o IL-13 es, excepto cuando el contexto dicte de otra manera, una referencia a IL-13 humana. Ésta también se refiere en algunos lugares como "el antígeno". La presente invención proporciona anticuerpos frente a IL-13 humana, especialmente anticuerpos humanos, que reaccionan de manera cruzada con IL-13 de primates no humana, incluyendo IL-13 de mono cynomolgus y rhesus. 10 Los anticuerpos de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención reconocen una variante de IL-13 en la que el resto de arginina en el aminoácido de la posición 130 está reemplazado por glutamina.

Descripción Breve de las Figuras

La Figura 1 muestra la potencia de neutralización (% de inhibición) de BAK167A11 (cuadrados cerrados) y su derivado BAK615E3 (cuadrados abiertos) como scFv frente a 25 ng/ml de IL-13 humana en el ensayo de proliferación de células TF-1. Los triángulos representan un scFv irrelevante. Los datos representan la media con barras de error estándar de determinaciones en triplicado en el mismo experimento. 15

La Figura 2 muestra la potencia de neutralización (% de inhibición) de BAK278D6 (cuadrados cerrados) y su derivado BAK502G9 (cuadrados abiertos) como scFv frente a 25 ng/ml de IL-13 humana en el ensayo de proliferación de células TF-1. Los triángulos representan un scFv irrelevante. Los datos representan la media con barras de error estándar de determinaciones en triplicado en el mismo experimento. 20

La Figura 3 muestra la potencia de neutralización (% de inhibición) de BAK209B11 (cuadrados cerrados) como un scFv frente a 25 ng/ml de IL-13 murina en el ensayo de proliferación de células TF-1. Los triángulos representan un scFv irrelevante. Los datos representan la media con barras de error estándar de determinaciones en triplicado en el mismo experimento.

25 La Figura 4 muestra la potencia de neutralización (% de inhibición) de BAK278D6 (cuadrados cerrados) como un scFv frente a IL-13 en el ensayo de proliferación de células TF-1. Los triángulos representan un scFv irrelevante. Los datos representan la media con barras de error estándar de determinaciones en triplicado en el mismo experimento.

La Figura 4A muestra la potencia frente a 25 ng/ml de IL-13 humana.

La Figura 4B muestra la potencia frente a 25 ng/ml de la variante de IL-13 humana.

30 La Figura 4C muestra la potencia frente a 50 ng/ml de IL-13 de primate no humano.

La Figura 5 muestra una comparación de la potencia de anticuerpos anti-IL-13 humana en el ensayo de proliferación TF-1. Los datos representan la potencia de neutralización media con barras de error estándar en 5-7 experimentos frente a 25 ng/ml de IL-13 humana. El comportamiento respecto al anticuerpo disponible comercialmente, B-B13, se evaluó estadísticamente realizando un ANOVA de una vía con ensayo de Dunnett. *P<0,05, **P<0,01 comparado con B-B13.

35 La Figura 6 muestra la potencia de neutralización (% de inhibición) de BAK502G9 (cuadrados cerrados), BAK1167F2 (triángulos cerrados) y BAK1183H4 (triángulos cerrados invertidos) como IgG4 humana frente a IL-13 etiquetada en el ensayo de proliferación de células TF-1. Los triángulos abiertos representan una IgG4 irrelevante. Los datos representan la media con barras de error estándar de tres experimentos independientes.

La Figura 6A muestra la potencia frente a 25 ng/ml de IL-13 humana.

40 La Figura 6B muestra la potencia frente a 25 ng/ml de la variante de IL-13 humana.

La Figura 6C muestra la potencia frente a 50 ng/ml de IL-13 de primate no humano.

La Figura 7 muestra la potencia de neutralización (% de inhibición) de BAK502G9 (cuadrados cerrados), BAK1167F2 (triángulos cerrados), BAK1183H4 (triángulos cerrados invertidos) como IgG4 humana y anticuerpos anti-IL-13 humana comerciales (B-B13-cuadrados abiertos; JES10-5A2-triángulos abiertos invertidos) en el ensayo de proliferación de células HDLM-2 dependiente de IL-13 nativa. Los triángulos abiertos representan una IgG4 irrelevante. Los datos representan la media con barras de error estándar de determinaciones en triplicado en el mismo experimento. 45

La Figura 8 muestra una comparación de la potencia de anticuerpos anti-IL-13 humana en el sistema NHLF. Los datos representan la potencia de neutralización media (CI₅₀ pM) con barras de error estándar en 4-5 experimentos frente a 10

ng/ml de IL-13 humana en el ensayo de liberación de eotaxina NHLF. El comportamiento respecto al anticuerpo disponible comercialmente, B-B13, se evaluó estadísticamente realizando un ANOVA de una vía con ensayo de Dunnett. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ comparado con B-B13.

- 5 La Figura 9 muestra la potencia de neutralización (% de inhibición) de BAK502G9 (cuadrados cerrados), BAK1167F2 (triángulos cerrados), BAK1183H4 (triángulos cerrados invertidos) como IgG4 humana frente a la regulación al alza de VCAM-1 en la superficie de HUVEC en respuesta a 10 ng/ml de IL-13 humana. Los triángulos abiertos representan una IgG4 irrelevante. Los datos representan la media con barras de error estándar de determinaciones en triplicado en el mismo experimento.
- 10 La Figura 10 muestra la potencia de neutralización (% de inhibición) de BAK502G9 (cuadrados cerrados), BAK1167F2 (triángulos cerrados), BAK1183H4 (triángulos cerrados invertidos) como IgG4 humana frente a la liberación de eotaxina de la regulación al alza de VCAM-1 en la superficie de HUVEC en respuesta a 1 ng/ml de IL-4 humana (Figura 10A) ó 0,5 ng/ml de IL-1 β humana (Figura 10B). Los triángulos abiertos representan una IgG4 irrelevante. Los datos representan la media con barras de error estándar de determinaciones en triplicado en el mismo experimento.
- 15 La Figura 11 muestra la potencia de neutralización (% de inhibición) de BAK209B11 (cuadrados) como una IgG4 humana frente a 1 ng/ml de IL-13 murina en el ensayo de proliferación de células B9 dependiente de factor. Los triángulos abiertos representan una IgG4 irrelevante. Los datos representan la media con barras de error estándar de determinaciones en triplicado en el mismo experimento.
- 20 La Figura 12 muestra el nivel relativo de IL-13 en homogenados de pulmón de ratones sensibilizados (s) (barra de la derecha) y no sensibilizados (ns) (barra de la izquierda) después del pulso en un modelo murino de inflamación alérgica pulmonar aguda. El efecto de la sensibilización se evaluó estadísticamente realizando un ensayo de t de Student usando cantidad de datos de IL-13. * $< 0,05$, ** $< 0,01$ comparado con animales control no sensibilizados (n=5-6 ratones). Los datos representan la media con barras de error estándar.
- 25 La Figura 13 ilustra los efectos de la administración i.v. de BAK209B11 como IgG4 humana en cantidades diferentes comparado con un anticuerpo control irrelevante IgG4 con isotipo equivalente en el reclutamiento de leucocitos inducido por ovoalbúmina en el pulmón en ratones sensibilizados con ovoalbúmina. Se muestra el número de leucocitos ($\times 10^4$). El efecto del tratamiento con el anticuerpo se evaluó estadísticamente realizando un ANOVA de una vía con ensayo de Dunnett usando datos de recuento celular diferenciales. * $< 0,05$. ** $< 0,01$ comparado con animales control PBS con pulso de ovoalbúmina (=0% de inhibición; n=5-8 ratones). Los datos representan la media con barras de error estándar.
- 30 La Figura 14 ilustra los efectos de la administración i.v. de BAK209B11 como IgG4 humana en cantidades diferentes comparado con un anticuerpo control irrelevante IgG4 con isotipo equivalente en el reclutamiento de eosinófilos inducido por ovoalbúmina en el pulmón en ratones sensibilizados con ovoalbúmina. Se muestra el número de eosinófilos ($\times 10^4$). El efecto del tratamiento con el anticuerpo se evaluó estadísticamente realizando un ANOVA de una vía con ensayo de Dunnett usando datos de recuento celular diferenciales. * $< 0,05$. ** $< 0,01$ comparado con animales control PBS con pulso de ovoalbúmina (=0% de inhibición; n=5-8 ratones). Los datos representan la media con barras de error estándar.
- 35 La Figura 15 ilustra los efectos de la administración i.v. de BAK209B11 como IgG4 humana en cantidades diferentes comparado con un anticuerpo control irrelevante IgG4 con isotipo equivalente en el reclutamiento de neutrófilos inducido por ovoalbúmina en el pulmón en ratones sensibilizados con ovoalbúmina. Se muestra el número de neutrófilos ($\times 10^4$). El efecto del tratamiento con el anticuerpo se evaluó estadísticamente realizando un ANOVA de una vía con ensayo de Dunnett usando datos de recuento celular diferenciales. * $< 0,05$. ** $< 0,01$ comparado con animales control PBS con pulso de ovoalbúmina (=0% de inhibición; n=5-8 ratones). Los datos representan la media con barras de error estándar.
- 40 La Figura 16 ilustra los efectos de la administración i.v. de BAK209B11 como IgG4 humana en cantidades diferentes comparado con un anticuerpo control irrelevante IgG4 con isotipo equivalente en el reclutamiento de linfocitos inducido por ovoalbúmina en el pulmón en ratones sensibilizados con ovoalbúmina. La inducción de los linfocitos fue inhibida de manera dependiente de la dosis por BAK209B11 con una inhibición máxima a 3 μ g/ml de BAK209B11. El efecto del tratamiento con el anticuerpo se evaluó estadísticamente realizando un ANOVA de una vía con ensayo de Dunnett usando datos de recuento celular diferenciales. * $< 0,05$. ** $< 0,01$ comparado con animales control PBS con pulso de ovoalbúmina (=0% de inhibición; n=5-8 ratones). Los datos representan la media con barras de error estándar.
- 45 La Figura 17 ilustra los efectos de la administración i.v. de BAK209B11 como IgG4 humana en cantidades diferentes comparado con un anticuerpo control irrelevante IgG4 con isotipo equivalente en el reclutamiento de monocitos/macrófagos inducido por ovoalbúmina en el pulmón en ratones sensibilizados con ovoalbúmina. No hubo un incremento significativo en los niveles de monocitos/macrófagos en animales sensibilizados cuando se comparó con animales control. Sin embargo, dichos niveles basales de estas células disminuyeron con ≥ 36 μ g/ml de BAK209B11 en animales sensibilizados. El efecto del tratamiento con el anticuerpo se evaluó estadísticamente realizando un ANOVA de una vía con ensayo de Dunnett usando datos de recuento celular diferenciales. * $< 0,05$. ** $< 0,01$ comparado con animales
- 50

control PBS con pulso de ovoalbúmina (=0% de inhibición; n=5-8 ratones). Los datos representan la media con barras de error estándar.

La Figura 18 muestra los efectos de un anticuerpo neutralizante anti-IL-13 comercial, JES10-5A2 en el influjo de células (se muestra el número de leucocitos ($\times 10^4$) en la bolsa de aire murino incitado por la administración de IL-13 recombinante humana obtenida de bacterias. El efecto del tratamiento con el anticuerpo se evaluó estadísticamente realizando un ANOVA de una vía con ensayo de Dunnett usando datos de recuento celular diferenciales. * $<0,05$. ** $<0,01$ comparado con animales control CMC (=0% de inhibición; n=11-13 ratones). Los datos representan la media con barras de error estándar.

La Figura 19 muestra un alineamiento de secuencia de las secuencias de aminoácidos de IL-13 de cynomolgus frente a IL-13 humana. Los siete restos de aminoácidos que son diferentes entre IL-13 humana y de cynomolgus están sombreados. IL-13 de rhesus y cynomolgus tienen una secuencia de aminoácidos idéntica.

La Figura 20 ilustra los efectos de una única dosis en bolo i.v. de 10 mg/kg de BAK502G9 como IgG4 humana en los niveles de IgE en suero en 4 primates cynomolgus alérgicos pero no sometidos a pulso (2 machos/2 hembras) durante 29 días. La concentración de IgE en suero se reduce significativamente desde 100% (predosis) hasta $66 \pm 10\%$ de los valores control ($p<0,05$) en los días 4 y 5 después de la dosificación. Esta disminución de la concentración de IgE en suero se recupera hasta $88 \pm 8\%$ de los niveles control en el día 22. * $p<0,05$ comparado con los niveles de IgE predosis, medidas repetidas ANOVA seguidas de ensayo de Dunnett de comparaciones múltiples (n=4 animales).

La Figura 20B muestra los niveles relativos de IgE en suero de primates cynomolgus machos y hembras frente al tiempo después de una única dosis intravenosa de 10 mg/kg de BAK502G9. Los datos relativos de IgE en suero se expresan como porcentaje de media aritmética $\pm$ SEM del valor basal.

La Figura 21 ilustra los efectos de la administración intraperitoneal de BAK209B11 en cantidades diferentes (H=237 μ g/día, M=23,7 μ g/día y L=2,37 μ g/día) comparado con un anticuerpo control irrelevante IgG1 con isotipo equivalente en la función pulmonar de ratones sensibilizados con ovoalbúmina y sometidos a pulso. En la Figura 21A la función pulmonar se representa por log CP₅₀s (log concentración de metacolina requerida para incrementar PenH basal un 50%) antes de ningún tratamiento (día 0) y después de la sensibilización, pulso y tratamiento con el fármaco (día 25). La Figura 21A muestra los datos brutos usados para calcular el punto final del estudio, mostrado en la Figura 21B (Delta log CPR50). Los datos representan la media con barras de error estándar de n=8.

En la Figura 21B se muestra el cambio en la función pulmonar por un cambio en el log CP₅₀ (delta log CP₅₀) de un ratón individual. Delta log CP₅₀ se define como el cambio en la log CP₅₀ de un individuo en el día 25 frente al día 0. Los datos representan la delta log CP₅₀ media del grupo (los cambios individuales promediados en los grupos de tratamiento) con barras de error estándar. El efecto del tratamiento con el anticuerpo se evaluó estadísticamente realizando un ANOVA de una vía con ensayo de Dunnett usando datos de delta log CP₅₀. ** $p<0,01$ comparado con animales control sensibilizados y con pulso de ovoalbúmina (n=8 ratones).

La Figura 22 ilustra los efectos de la administración local (i.p.) y sistémica (i.v.) de BAK502G9 como IgG4 humana en cantidades diferentes comparado con un anticuerpo control irrelevante IgG4 con isotipo equivalente en el reclutamiento total de leucocitos (Figura 22A) y reclutamiento de eosinófilos (Figura 22B) en la bolsa de aire de ratones BALB/C. Los datos representan la media con barras de error estándar de n=10. El efecto del tratamiento con el anticuerpo se evaluó estadísticamente realizando un ANOVA de una vía con ensayo de Dunnett usando datos transformados logarítmicamente. * $p<0,05$. ** $p<0,01$ comparado con ratones con pulso de hIL-13 (n=10).

La Figura 23 ilustra los efectos de la administración i.p. de BAK502G9 como IgG4 humana comparado con un anticuerpo control irrelevante IgG4 con isotipo equivalente en el desarrollo de AHR después de la administración intratraqueal de IL-13 humana en las vías aéreas de ratones. El efecto del tratamiento con el anticuerpo se evaluó estadísticamente realizando un ANOVA de una vía con ensayo de Dunnett usando datos de CP₂₀₀ de Metacolina. * $<0,05$. ** $<0,01$ comparado con el grupo control positivo de IL-13 humana (n=6-8 ratones). Los datos representan la media con barras de error estándar.

La Figura 24 muestra la potencia de neutralización (% de respuesta máxima) de BAK502G9 (cuadrados cerrados) como IgG4 frente a 30 ng/ml de IL-13 en un ensayo de producción de IgE de células B humana. Los cuadrados abiertos representan una IgG4 irrelevante. Los datos representan la media con barras de error estándar de seis donantes de experimentos independientes.

La Figura 25 muestra los efectos de BAK502G9 en la potenciación inducida por IL-13 de la señalización de Ca²⁺ inducida por agonista en las células de músculo liso bronquial. El área bajo la curva (AUC) de la respuesta de señalización de Ca²⁺ a histamina se determinó para cada anticuerpo +/- condición pretratamiento IL-13. Los datos combinados de tres experimentos independientes se muestran para el anticuerpo irrelevante CAT-001 (a) y BAK502G9 (b) como la diferencia

en porcentaje frente a células no tratadas de $AUC \pm SD$ (ns=no significativo ($p > 0,05$), $*p < 0,05$, $**p < 0,01$). Los resultados se evaluaron estadísticamente utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con un post ensayo de Bonferroni de comparaciones múltiples.

La Figura 26 muestra los efectos de BAK502G9 administrado en fase II.

- 5 La Figura 26A muestra el efecto en AHR medido por el cambio en el área bajo la curva de dosis respuesta de histamina ($n=14$).

La Figura 26B muestra el efecto en AHR medido por el cambio en CP_{30} ($n=18$).

La Figura 26C muestra el efecto en el cebado con antígeno ($n=20$).

La Figura 26D muestra el efecto en la inflamación BAL ($n=21$).

- 10 La Figura 27 muestra el efecto de BAK502G9 en la expresión de CD23 inducida por IL-13. Los datos se presentan como un porcentaje de la respuesta a IL-13 solo (100%) y se expresan como media $\pm$ SEM % control de 6 experimentos independientes de 6 donantes individuales (realizados en triplicado).

- La Figura 28 muestra el efecto de BAK502G9 y una IgG4 irrelevante en la expresión de CD23 en PBMC inducida por IL-13 y/o IL-4. Los datos se presentan como un porcentaje de la respuesta a IL-4 solo (100%) y se expresan como media $\pm$ SEM % control de 4 experimentos independientes de 4 donantes individuales (realizados en triplicado).
- 15

La Figura 29A muestra el efecto de BAK502G9 en la producción de eotaxina-1 en NHLF inducida por un cultivo de 48h con un medio que contiene IL-13/TNF- α /TNF- β 1. Los datos se muestran como una media aritmética $\pm$ SEM de determinaciones en triplicado de los medios usados en este estudio para inducir el cambio en la forma de los leucocitos.

- La Figura 29B muestra el efecto de BAK502G9 en el cambio de forma de eosinófilos humanos inducido por una dilución 1:16 de medio condicionado. Los puntos de datos representados son media $\pm$ SEM % del cambio de forma en medio blanco de experimentos independientes de cuatro donantes individuales.
- 20

- La Figura 30 muestra el alineamiento de IL-13 humana frente a IL-13 murina resaltando las mutaciones que se introdujeron en la IL-13 humana para producir el primer panel de quimeras de IL-13. Las cuatro hélices alfa están resaltadas en cajas y el bucle 1 y el bucle 3 están marcados. Se produjeron cinco proteínas quiméricas en las que las hélices B, C y D y los bucles 1 y bucle 3 se reemplazaron por la secuencia murina. Se produjeron cuatro proteínas quiméricas adicionales y se numeraron de acuerdo con los aminoácidos en la preproteína humana (no con la numeración del alineamiento múltiple anterior) en la que la arginina en el resto 30 (posición 34 anterior) se mutó, los restos 33 y 34 (posición 37 y 38 anterior) se mutaron, los restos 37 y 38 (VH) se mutaron (posición 41 y 42 anterior) y los restos 40 y 41 (TQ) se mutaron (posición 44 y 45 anterior).
- 25

- La Figura 31 muestra el alineamiento de IL-13 humana frente a IL-13 murina resaltando las mutaciones que se introdujeron en la IL-13 humana para producir el segundo panel de quimeras de IL-13. Se produjeron seis quimeras en las que el o los restos humanos se sustituyeron por el o los restos murinos (resaltados con cajas). Se produjeron cuatro proteínas quiméricas adicionales (se numeraron de acuerdo con la posición de los aminoácidos en la preproteína humana) en las que la leucina en el resto 58 (62 en la figura anterior) se mutó, la leucina en el resto 119 (resto 123 anterior) se mutó, la lisina en la posición 123 (resto 127 anterior) se mutó y la arginina en el resto 127 (resto 132 anterior) se mutó.
- 30
- 35

La Figura 32 muestra las mutaciones hechas en la IL-13 humana. Las mutaciones en gris oscuro reducían la unión a BAK502G9, las mutaciones en gris claro no alteraban a unión. Secuencia lineal de pre-IL-13 humana con los restos mutados indicados.

- 40 En varios aspectos y realizaciones de la invención se proporciona el contenido de las reivindicaciones incluidas a continuación.

- La presente invención se refiere a miembros de unión específicos para IL-13, en particular IL-13 humana, de primates y variante de IL-13 (R130Q). Las realizaciones preferidas de la presente invención son moléculas de anticuerpo, ya sean anticuerpo completo (p. ej. IgG, tal como IgG4) o fragmentos de anticuerpo (p. ej. scFv, Fab, dAb). Se proporcionan las regiones de unión al antígeno de los anticuerpos como son los dominios de anticuerpo VH y VL. En los dominios VH y VL se proporcionan las regiones determinantes de la complementariedad, CDR, que pueden proporcionarse en diferentes regiones marco, FR, para formar los dominios VH o VL como puede ser el caso. Un sitio de unión al antígeno puede consistir en un dominio VH y/o un dominio VL del anticuerpo.
- 45

Un sitio de unión al antígeno puede proporcionarse mediante la organización de CDR en andamios de proteínas que no son anticuerpos tales como fibronectina o citocromo B etc. [115, 116]. Los andamios para preparar por ingeniería nuevos sitios de unión en proteínas se han revisado con detalle por Nygren et al. [116]. Los andamios de proteínas para miméticos de anticuerpos se describen en WO/0034784 en la que los inventores describen proteínas (miméticos de anticuerpos) que incluyen un dominio tipo III de fibronectina que tiene al menos un bucle aleatorizado. Un andamio adecuado en el que se puede injertar una o más CDR, p. ej. un conjunto de HCDR, puede proporcionarse por cualquier miembro del dominio de la superfamilia de genes de inmunoglobulinas.

Las realizaciones preferidas de la presente invención están incluidas en lo que se denomina en la presente memoria "linaje BAK278D6". Esto se define con referencia a un conjunto de seis secuencias de CDR de BAK278D6 como sigue: HCDR1 (SEQ ID NO: 1), HCDR2 (SEQ ID NO: 2), HCDR3 (SEQ ID NO: 3), LCDR1 (SEQ ID NO: 4), LCDR2 (SEQ ID NO: 5) y LCDR3 (SEQ ID NO: 6). En un aspecto, la presente invención proporciona un miembro de unión específico para IL-13 humana, que comprende un sitio de unión al antígeno de un anticuerpo que está compuesto por un dominio VH de anticuerpo humano y un dominio VL de anticuerpo humano y que comprende un conjunto de CDR, en el que el dominio VH comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y el dominio VL comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en el que HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

El conjunto de CDR en el que HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, se refiere en la presente memoria como el "conjunto de CDR de BAK278D6", HCDR1, HCDR2 y HCDR3 en el conjunto de CDR de BAK278D6 se refieren como el "conjunto de HCDR de BAK278D6" y LCDR1, LCDR2 y LCDR3 en el conjunto de CDR de BAK278D6 se refieren como el "conjunto de LCDR de BAK278D6". Un conjunto de CDR en el conjunto de CDR de BAK278D6, conjunto de HCDR de BAK278D6 o LCDR de BAK278D6 o una o dos sustituciones de éstos, se dice que es del linaje de BAK278D6.

Como se ha indicado, en un aspecto la invención proporciona un miembro de unión específico para IL-13 humana que comprende un sitio de unión al antígeno de un anticuerpo que está compuesto por un dominio VH de un anticuerpo humano y un dominio VL de un anticuerpo humano y que comprende un conjunto de CDR, en el que el conjunto de CDR es el conjunto de CDR de BAK278D6.

Las realizaciones preferidas tienen el conjunto de CDR de BAK278D6 con una sustitución de S por N en el resto 99 en HCDR3 e I por N en el resto 27 en LCDR1. El conjunto de CDR así definido es como sigue: HCDR1-SEQ ID NO: 7; HCDR2-SEQ ID NO: 8; HCDR3-SEQ ID NO: 9; LCDR1-SEQ ID NO: 10; LCDR2-SEQ ID NO: 11; LCDR3-SEQ ID NO: 12. Este conjunto de CDR se refiere en la presente memoria como el "conjunto de CDR de BAK502G9".

Los presentes inventores han identificado que el linaje BAK278D6 proporciona dominios de unión al antígeno de anticuerpo humano frente a IL-13 que tienen un valor particular. En el linaje, se ha identificado que BAK502G9 tiene un valor especial. Los conjuntos de CDR de BAK278D6 y BAK502G9 ya se han identificado anteriormente.

Siguiendo el ejemplo de la química computacional aplicando técnicas de análisis de datos multivariante a las relaciones estructura/propiedad-actividad [94], pueden obtenerse relaciones cuantitativas actividad-propiedad de anticuerpos usando técnicas matemáticas muy conocidas tales como regresión estadística, reconocimiento y clasificación de patrones [95-100]. Las propiedades de los anticuerpos pueden obtenerse de modelos empíricos y teóricos (por ejemplo, análisis de restos probables de contacto o propiedad físico-química calculada) de la secuencia del anticuerpo, estructuras funcionales y tridimensionales y estas propiedades pueden considerarse por separado o en combinación.

Un sitio de unión al antígeno de un anticuerpo compuesto por un dominio VH y un dominio VL está formado por seis bucles de polipéptido: tres del dominio variable de la cadena ligera (VL) y tres del dominio variable de la cadena pesada (VH). El análisis de anticuerpos con estructura atómica conocida ha revelado relaciones entre la secuencia y la estructura tridimensional de sitios de combinación de anticuerpos [101, 102]. Estas relaciones implican que, excepto la tercera región (bucle) en los dominios VH, los bucles del sitio de unión tienen una de un pequeño número de conformaciones de cadena principal: estructuras canónicas. Se ha mostrado que la estructura canónica formada en un bucle particular está determinada por su tamaño y la presencia de determinados restos en sitios clave tanto en el bucle como en las regiones marco [101, 102].

Este estudio de relaciones secuencia-estructura puede usarse para predecir aquellos restos en un anticuerpo de secuencia conocida, pero con una estructura tridimensional desconocida, que son importantes para mantener la estructura tridimensional de sus bucles de CDR y por lo tanto mantener la especificidad de unión. Estas predicciones pueden apoyarse por comparación de las predicciones con el resultado de experimentos de optimización principales.

En un método estructural, puede crearse un modelo de la molécula de anticuerpo [103] usando un paquete disponible libremente o comercial tal como WAM [104]. Puede usarse entonces un paquete informático de visualización y análisis de proteínas tal como Insight II [105] o Deep View [106] para evaluar las sustituciones posibles en cada posición en la CDR. Esta información puede usarse para hacer sustituciones que probablemente tengan un efecto mínimo o beneficioso en la actividad.

Los presentes inventores analizaron datos de secuencia del panel de clones para los que se muestran los conjuntos de CDR en la Tabla 1.

El análisis ensayó la hipótesis de que cualquier combinación binaria de las variaciones de aminoácidos listadas en las CDR del conjunto de variantes de scFv presentado da lugar a una variante de scFv con al menos la potencia de partida del scFv de BAK278D6 parental.

Todas las variantes de scFv en el panel mostrado en la Tabla 1 se han seleccionado para una afinidad mejorada y se ha confirmado que presentan una mayor potencia.

Las variaciones de aminoácidos observadas pueden ser favorables, no favorables o neutras en su efecto sobre la potencia de partida del scFv de BAK278D6 en el ensayo TF-1 de 44 nM.

No se observó vínculo entre ninguna pareja de variaciones de aminoácidos lo que confirma que no había sinergia, "positiva" ni "negativa" entre ninguna pareja seleccionada de variaciones de aminoácidos.

Existen cuatro escenarios en los que dicha combinación binaria cumplirá con la hipótesis y tres escenarios en los que la hipótesis no será válida. Las variantes de aminoácidos sinérgicas no se consideran ya que no se observó vínculo.

La hipótesis es válida cuando:

A1: la mutación 1 es favorable y la mutación 2 es favorable

A2: la mutación 1 es favorable y la mutación 2 es neutra

A3: la mutación 1 es neutra y la mutación 2 es neutra

A4: la mutación 1 es favorable y la mutación 2 no es favorable (con el efecto de 1 superando el efecto de 2).

La hipótesis no es válida cuando:

B1: la mutación 1 no es favorable y la mutación 2 es neutra

B2: la mutación 1 no es favorable y la mutación 2 no es favorable

B3: la mutación 1 es favorable y la mutación 2 no es favorable (con el efecto de 2 superando el efecto de 1).

Para que A4 sea posible, se necesita que la mutación 1 sea muy favorable para contrarrestar el efecto negativo de la mutación 2 en potencia. Como dicha mutación altamente favorable estará presente en la biblioteca de variantes usada para la selección, se seleccionará y por lo tanto aparecerá frecuentemente en el panel de variantes. Como puede excluirse la sinergia, dicha mutación será beneficiosa en cualquier tipo de contexto de secuencia y reaparecerá por lo tanto en diferentes variantes de scFv. Un ejemplo de dicho cambio frecuente de aminoácidos es el cambio Asn271Ile en la CDR1 de la cadena ligera. Sin embargo, esta mutación por sí misma (en el clon BAK531.E2) tiene sólo un efecto modesto de 2 veces en la potencia (CI50 final de 23,2 nM). Por sí misma, esta mutación no permitirá el escenario mostrado en A4, ya que no es una mutación altamente favorable. Esto sugiere que cada clon en el conjunto presentado de clones de unión de IL-13 (Tabla 1) que tiene un cambio Asn271Ile en la CDR1 de la cadena ligera junto con una o más mutaciones adicionales es al menos tan potente como la variante que tiene la única mutación Asn271Ile en la CDR1 de la cadena ligera. Las demás mutaciones son bien neutras o positivas pero no tienen un efecto negativo o perjudicial.

Un ejemplo adicional es Asn99Ser de CDR3 de la cadena pesada (véase la Tabla 1). Como no se observa un clon que porta esta única variación de aminoácidos particular, se ha estimado que la potencia de dicho clon es aproximadamente 12,0 nM por el razonamiento siguiente:

La potencia de BAK278D6 es 44 nM. Las alteraciones de N271 de CDR1 de VL + N99S de CDR3 de VH dan lugar a BAK502G9 con potencia 8 nM, es decir, una mejora de 5,5 veces.

La potencia de BAK278D6 es 44 nM. La alteración de N271 de CDR1 de VL da lugar a BAK531E2 con potencia 23 nM, es decir, una mejora de 1,9 veces.

La potencia de BAK278D6 es 44 nM. La alteración de N99S de CDR3 de VH para proporcionar un posible clon con potencia 12,2 nM, es decir, una mejora de 2,9 veces ($5,5/1,9=2,9$).

La combinación binaria de Asn99Ser de CDR3 de la cadena pesada con Asn271Ile de CDR1 de la cadena ligera proporciona un scFv BAK0502G9 con una potencia de 8 nM. Como se excluye la sinergia, la contribución del cambio Asn99Ser en CDR3 de la cadena pesada en BAK502G9 es por lo tanto aditivo.

Por lo tanto, cada clon en el conjunto de clones de unión de IL-13 presentado (Tabla 1) que tiene un cambio AsnH99Ser en CDR3 de la cadena pesada junto con una o más mutaciones adicionales tendrá una potencia de al menos 12 nM o mayor, con una ventana de ensayo permisiva de 2,5 veces para $n=1-2$.

Así, los inventores observan que no se observa una variación de aminoácidos altamente favorable que se seleccionaría preferentemente. Como se ha discutido anteriormente, dos variaciones que se representaron de manera prominente en la Tabla 1 de variantes de scFv se analizaron más de cerca. Cualquier variante de scFv de la Tabla 1 con cualquiera de estas mutaciones junto con una o más mutaciones adicionales presentaba una potencia que estaba mejorada al menos como un clon que contiene una cualquiera de estas dos variantes de aminoácidos únicas en BAK278D6 parental. Por lo tanto, no hay evidencia de que esté presente en el panel una variación de aminoácidos altamente favorable que permitiría el escenario A4.

Esta observación condujo a los inventores a concluir que no había mutaciones no favorables presentes en este conjunto de variantes de scFv. Esto significa que los escenarios A4 y B1 a B3 no son relevantes y que la hipótesis es válida.

De acuerdo con esto, como ya se ha indicado, la presente invención proporciona miembros de unión específicos que comprenden el conjunto de CDR de BAK278D6 o el conjunto de CDR de BAK502G9.

El conjunto de CDR relevante se proporciona en regiones marco de anticuerpo u otro andamio de proteínas, p. ej. fibronectina o citocromo B [115, 116]. Preferiblemente, se emplean regiones marco de anticuerpo y cuando se emplean son preferiblemente de la línea germinal, más preferiblemente la región marco de anticuerpo para la cadena pesada puede ser DP14 de la familia VH1. La región marco preferida para la cadena ligera puede ser λ 3-3H. Para el conjunto de CDR de BAK502G9 se prefiere que las regiones marco de anticuerpo sean para VH FR1, SEQ ID NO: 27, para VH FR2, SEQ ID NO: 28, para VH FR3, SEQ ID NO: 29, para FR1 de la cadena ligera, SEQ ID NO: 30, para FR2 de la cadena ligera, SEQ ID NO: 31, para FR3 de la cadena ligera, SEQ ID NO: 32. En una realización altamente preferida, se proporciona un dominio VH con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, denominándose "dominio VH de BAK502G9". En una realización altamente preferida adicional, se proporciona un dominio VL con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, denominándose "dominio VL de BAK502G9". Un sitio de unión al antígeno de anticuerpo altamente preferido proporcionado según la presente invención está compuesto por el dominio VH de BAK502G9, SEQ ID NO: 15 y el dominio VL de BAK502G9, SEQ ID NO: 16. Este sitio de unión al antígeno de anticuerpo puede proporcionarse en cualquier formato de molécula de anticuerpo deseado, p. ej. scFv, Fab, IgG, IgG4, dAb etc., como se discute adicionalmente en otros lugares de la presente memoria.

En una realización altamente preferida adicional, la presente invención proporciona una molécula de anticuerpo IgG4 que comprende el dominio VH de BAK502G9, SEQ ID NO: 15 y el dominio VL de BAK502G9, SEQ ID NO: 16. Esto se denomina en la presente memoria "IgG4 BAK502G9".

Otras IgG4 u otras moléculas de anticuerpo que comprenden el dominio VH de BAK502G9, SEQ ID NO: 15 y el dominio VL de BAK502G9, SEQ ID NO: 16 se proporcionan por la presente invención, así como otras molécula de anticuerpo que comprenden el conjunto de HCDR de BAK502G9 (SEQ ID NO: 7, 8 y 9) en un dominio VH de anticuerpo y el conjunto de LCDR de BAK502G9 (SEQ ID NO: 10, 11 y 12) en un dominio VL de anticuerpo.

Es conveniente indicar aquí que "y/o" cuando se usa en la presente memoria debe tomarse como la descripción específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por ejemplo, "A y/o B" debe tomarse como la descripción específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, como si cada uno se mostrara individualmente en la presente memoria.

Como se ha indicado, la presente invención proporciona un miembro de unión específico que se une a IL-13 humana y que comprende el dominio VH de BAK502G9 (SEQ ID NO: 15) y el dominio VL de BAK502G9 (SEQ ID NO: 16).

Generalmente, un dominio VH se empareja con un dominio VL para proporcionar un sitio de unión al antígeno de anticuerpo, aunque como se discute adicionalmente a continuación un dominio VH solo puede usarse para unir el antígeno. En una realización preferida, el dominio VH de BAK502G9 (SEQ ID NO: 15) se empareja con el dominio VL de BAK502G9 (SEQ ID NO: 16), de manera que se forma un sitio de unión al antígeno de anticuerpo que comprende tanto el dominio VH como VL de BAK502G9.

Pueden tomarse una o más CDR del dominio VH o VL de BAK502G9 e incorporarse en un marco adecuado. Esto se discute adicionalmente en la presente memoria. Las HCDR 1, 2 y 3 de BAK502G9 se muestran en SEQ ID NO: 7, 8 y 9, respectivamente. Las LCDR 1, 2 y 3 de BAK502G9 se muestran en SEQ ID NO: 10, 11 y 12, respectivamente.

5 Las variantes de los dominios VH y VL y las CDR de la presente invención, incluyendo aquellas para las que se muestran en la presente memoria las secuencias de aminoácidos y que pueden emplearse en miembros de unión específicos para IL-13 pueden obtenerse mediante métodos de alteración o mutación de secuencia y cribado. Dichos métodos también se proporcionan por la presente invención.

10 Las variantes de la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cualquiera de los dominios VH y VL cuyas secuencias se describen específicamente en la presente memoria pueden emplearse según la presente invención, como se discute. Las variantes particulares pueden incluir una o más alteraciones de la secuencia de aminoácidos (adición, delección, sustitución y/o inserción de un resto de aminoácido), puede ser menor de aproximadamente 20 alteraciones, menor de aproximadamente 15 alteraciones, menor de aproximadamente 10 alteraciones o menor de aproximadamente 5 alteraciones, 4, 3, 2 ó 1. Las alteraciones pueden hacerse en una o más regiones marco y/o una o más CDR.

15 También se describe en la presente memoria un miembro de unión específico que compite por la unión al antígeno con cualquier miembro de unión específico en el que ambos se unen al antígeno y comprende un miembro de unión específico, dominio VH y/o VL descrito en la presente memoria, o HCDR3 descrito en la presente memoria, o variante de cualquiera de éstos. La competición entre los miembros de unión puede ensayarse fácilmente *in vitro*, por ejemplo usando ELISA y/o etiquetando una molécula informadora específica en un miembro de unión que puede detectarse en presencia de otro u otros miembros de unión no etiquetados, para permitir la identificación de miembros de unión
20 específicos que se unen al mismo epítipo o un epítipo superpuesto.

Además se describe un miembro de unión específico que comprende un sitio de unión al antígeno de un anticuerpo humano que compite con una molécula de anticuerpo BAK502G9, en particular scFv y/o IgG4 de BAK502G9 para unirse a IL-13. También se describe un miembro de unión específico que comprende un sitio de unión al antígeno de un anticuerpo humano que compite con un sitio de unión al antígeno de un anticuerpo para unirse a IL-13, en el que el sitio
25 de unión al antígeno del anticuerpo está compuesto por un dominio VH y un dominio VL, y en el que los dominios VH y VL comprenden un conjunto de CDR del linaje BAK278D6.

En la técnica están disponibles varios métodos para obtener anticuerpos frente a IL-13 y que pueden competir con una molécula de anticuerpo BAK502G9, una molécula de anticuerpo con un conjunto de CDR de BAK502G9 o una molécula de anticuerpo con un conjunto de CDR del linaje BAK278D6, para unirse a IL-13.

30 Además se describe un método para obtener uno o más miembros de unión específicos capaces de unirse al antígeno, incluyendo el método poner en contacto una biblioteca de miembros de unión específicos según la invención y dicho antígeno, y seleccionar uno o más miembros de unión específicos de la biblioteca capaces de unirse a dicho antígeno.

La biblioteca puede exponerse en la superficie de partículas de bacteriófago, conteniendo cada partícula ácido nucleico que codifica el dominio variable VH del anticuerpo expuesto en su superficie y opcionalmente también un dominio VL
35 expuesto si está presente.

Después de la selección de miembros de unión específicos capaces de unirse al antígeno y expuestos en partículas de bacteriófagos, el ácido nucleico puede tomarse de una partícula de bacteriófago que presenta dicho miembro de unión específico seleccionado. Dicho ácido nucleico puede usarse en la producción posterior de un miembro de unión específico o un dominio variable VH de anticuerpo (opcionalmente un dominio variable VL de anticuerpo) por expresión a
40 partir del ácido nucleico con la secuencia de ácido nucleico tomado de una partícula de bacteriófago que presenta dicho miembro de unión específico seleccionado.

Un dominio variable VH de anticuerpo con la secuencia de aminoácidos de un dominio variable VH de anticuerpo de dicho miembro de unión específico seleccionado puede proporcionarse en forma aislada, como puede un miembro de unión específico que comprende dicho dominio VH.

45 La capacidad de unirse a IL-13 puede ensayarse adicionalmente, también la capacidad de competir con BAK502G9 (p. ej. en formato scFv y/o formato IgG, p. ej. IgG4) para unirse a IL-13. Puede ensayarse la capacidad de neutralizar IL-13, como se discute adicionalmente a continuación.

La afinidad de la unión y la potencia de la neutralización de diferentes miembros de unión específicos puede compararse bajo condiciones apropiadas.

50 Los anticuerpos de la presente invención tienen varias ventajas sobre los anticuerpos anti-IL-13 comerciales existentes, en particular tres anticuerpos anti-IL-13 humana de roedor comerciales, concretamente, JES10-5A2 (BioSource), B-B13 (Euroclone) y clon 321166 (R&D Systems). La potencia de los anticuerpos de la presente invención se comparó con los

anticuerpos comerciales JES10-A2 y B-B13. El clon 321166 no se evaluó porque experimentos previos revelaron que este clon era considerablemente menos potente que los demás anticuerpos comerciales conocidos.

La eficacia y uso de los anticuerpos IL-13 de roedor comerciales en el ser humano probablemente estén limitados, debido a su potencial incrementado de inducir respuestas inmunogénicas y, por lo tanto, un aclaramiento más rápido del cuerpo. Los análisis cinéticos de los anticuerpos de la presente invención en primates no humanos sugieren que estos anticuerpos tienen una velocidad de aclaramiento que es similar a la de otros anticuerpos humanos o humanizados conocidos.

Los anticuerpos proporcionados por la presente invención reconocen IL-13 de primates no humanos, incluyendo IL-13 de rhesus y cynomolgus. La determinación de los perfiles de eficacia y seguridad de un anticuerpo en primates no humanos es extremadamente valiosa ya que proporciona un medio para predecir la seguridad del anticuerpo, el perfil farmacocinético y farmacodinámico en los seres humanos.

Además, los anticuerpos de la presente invención reconocen además la variante de IL-13 humana, R130Q, que está asociada con el asma. La reactividad cruzada con la variante IL-13 permite usar los anticuerpos de la presente invención y las composiciones que comprenden anticuerpos de la presente invención para el tratamiento de pacientes con IL-13 de tipo salvaje y la variante.

Los inventores han demostrado que BAK502G9, 1167F2 y 1183H4 son significativamente más potentes frente a IL-13 natural que los anticuerpos comerciales conocidos (Figura 7).

Además de las secuencias de anticuerpo, un miembro de unión específico según la presente invención puede comprender otros aminoácidos, p. ej. que forman un péptido o polipéptido, tal como un dominio plegado, o que confieren a la molécula otra característica funcional además de la capacidad de unirse al antígeno. Los miembros de unión específicos de la invención pueden contener un marcaje detectable o pueden estar conjugados con una toxina o un resto de direccionamiento o enzima (p. ej. mediante un enlace peptídico o conector).

En aspectos adicionales, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un miembro de unión específico, dominio VH y/o dominios VL según la presente invención, y métodos para preparar un miembro de unión específico, un dominio VH y/o un dominio VL de la invención, que comprende expresar dicho ácido nucleico bajo condiciones que permitan la producción de dicho miembro de unión específico, dominio VH y/o dominio VL y recuperarlo.

Los miembros de unión específicos según la invención pueden usarse en un método de tratamiento o diagnóstico del cuerpo humano o animal, tal como un método de tratamiento (que puede incluir tratamiento profiláctico) de una enfermedad o trastorno en un paciente humano que comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de un miembro de unión específico de la invención. Las condiciones tratables según la presente invención incluyen cualquiera en la que IL-13 juega un papel, especialmente asma, dermatitis atópica, rinitis alérgica, fibrosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, escleroderma, enfermedad inflamatoria del intestino y linfoma de Hodgkin. Además, los anticuerpos de la presente invención también pueden usarse para tratar tumores e infecciones virales ya que estos anticuerpos inhibirán la inmunosupresión mediada por IL-13 [64, 65].

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona ácido nucleico, generalmente aislado, que codifica un dominio variable VH de anticuerpo y/o dominio variable VL según la presente invención.

También se describe en la presente memoria un ácido nucleico, generalmente aislado que codifica una secuencia CDR de VH o CDR de VL descrita en la presente memoria, especialmente una CDR de VH seleccionada de SEQ ID NO: 7, 8 y 9 o una CDR de VL seleccionada de SEQ ID NO: 10, 11 y 12, lo más preferiblemente CDR3 de VH de BAK502G9 (SEQ ID NO: 9). También se describen el ácido nucleico que codifica el conjunto de CDR de BAK502G9, el ácido nucleico que codifica el conjunto de HCDR de BAK502G9 y el ácido nucleico que codifica el conjunto de LCDR de BAK502G9, así como los ácidos nucleicos que codifican las CDR, HCDR, LCDR individuales y los conjuntos de CDR, HCDR, LCDR del linaje BAK278D6.

Un aspecto adicional proporciona una célula anfitriona transformada con ácido nucleico de la invención.

Un aspecto adicional más, proporciona un método para producir un dominio variable VH de anticuerpo, incluyendo el método causar la expresión a partir del ácido nucleico codificador. Dicho método puede comprender cultivar células anfitrionas bajo condiciones para la producción de dicho dominio variable VH de anticuerpo.

Métodos análogos para la producción de dominios variables VL y miembros de unión específicos que comprenden un dominio VH y/o VL se proporcionan como aspectos adicionales de la presente invención.

Un método de producción puede comprender una etapa de aislamiento y/o purificación del producto.

Un método de producción puede comprender formular el producto en una composición que incluye al menos un componente adicional, tal como un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Éstos y otros aspectos de la invención se describen con más detalle a continuación.

TERMINOLOGÍA

5 *Miembro de unión específico*

Esto describe un miembro de una pareja de moléculas que tienen especificidad de unión entre sí. Los miembros de una pareja de unión específica pueden obtenerse naturalmente o producirse sintéticamente completamente o parcialmente. Un miembro de la pareja de moléculas tiene un área en su superficie, o una cavidad, que se une específicamente a y, por lo tanto, es complementaria con una organización espacial o polar particular del otro miembro de la pareja de moléculas. Así, los miembros de la pareja tienen la propiedad de unirse específicamente entre sí. Los ejemplos de tipos de parejas de unión específica son antígeno-anticuerpo, biotina-avidina, hormona-receptor de hormona, receptor-ligando, enzima-sustrato. La presente invención se refiere a las reacciones de tipo antígeno-anticuerpo.

Molécula de anticuerpo

15 Esto describe una inmunoglobulina ya sea natural o producida sintéticamente parcialmente o completamente. El término también engloba cualquier polipéptido o proteína que comprende un dominio de unión de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo que comprenden un dominio de unión al antígeno son moléculas tales como Fab, scFv, Fv, dAb, Fd; y fragmentos bivalentes.

Es posible tomar anticuerpos monoclonales y otros anticuerpos y usar técnicas de tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que retienen la especificidad del anticuerpo original. Dichas técnicas pueden implicar introducir ADN que codifica la región variable de la inmunoglobulina, o las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), de un anticuerpo en las regiones constantes, o regiones constantes más regiones marco, de una inmunoglobulina diferente. Véase, por ejemplo, EP-A-184187, GB 2188638A o EP-A-239400, y un gran conjunto de bibliografía posterior. Un hibridoma u otra célula que produce un anticuerpo puede someterse a mutación genética u otros cambios, que pueden o no pueden alterar la especificidad de unión de los anticuerpos producidos.

25 Como los anticuerpos pueden modificarse de varias maneras, el término "molécula de anticuerpo" debe considerarse que engloba cualquier miembro de unión específico o sustancia que tiene un dominio de unión al antígeno de anticuerpo con la especificidad requerida. Así, este término engloba fragmentos de anticuerpo y derivados, incluyendo cualquier polipéptido que comprende un dominio de unión de inmunoglobulina, ya sea natural o completamente o parcialmente sintético. Las moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión de inmunoglobulina, o equivalente, fusionado con otro polipéptido están, por lo tanto, incluidas. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos están descritas en EP-A-0120694 y EP-A-0125023 y un gran conjunto de bibliografía posterior.

Las técnicas adicionales disponibles en la técnica de la ingeniería de anticuerpos han hecho posible aislar anticuerpos humanos y humanizados. Por ejemplo, pueden hacerse hibridomas humanos como describen Kontermann et al [107]. La exposición en fagos, otra técnica establecida para generar miembros de unión específicos, se ha descrito en detalle en muchas publicaciones tales como Kontermann et al [107] y WO92/01047 (discutido adicionalmente a continuación). Los ratones transgénicos en los que los genes de anticuerpo de ratón están inactivados y reemplazados funcionalmente con genes de anticuerpo humano a la vez que se dejan intactos otros componentes del sistema inmune del ratón, pueden usarse para aislar anticuerpos humanos frente a antígenos humanos [108].

30 Pueden crearse moléculas de anticuerpo sintéticas por expresión a partir de genes generados mediante oligonucleótidos sintetizados y ensamblados en vectores de expresión adecuados, por ejemplo como describen Knappik et al., J. Mol. Biol. (2000) 296, 57-86 o Krebs et al. Journal of Immunological Methods 254 2001 67-84.

Se ha mostrado que los fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de unir antígenos. Los ejemplos de fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab que consiste en dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward, E.S. et al., Nature 341, 544-546 (1989), McCafferty et al (1990) Nature, 348, 552-554) que consiste en un dominio VH; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos; (vii) moléculas Fv de cadena única (scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL están unidos por un conector peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión al antígeno (Bird et al. Science, 242, 423-426, 1988; Huston et al. PNAS USA, 85, 5879-5883, 1988); (viii) dímeros Fv de cadena única biespecíficos (PCT/US92/09965) y (ix) "fragmentos bivalentes", fragmentos multivalentes o multispecíficos construidos por fusión génica (WO94/13804; P. Holliger et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448, 1993). Fv, scFv o las moléculas de fragmentos bivalentes pueden estabilizarse por la incorporación de puentes disulfuro

que unen los dominios VH y VL (Y. Reiter et al. Nature Biotech, 14, 1239-1245, 1996). También pueden hacerse fragmentos bivalentes pequeños que comprenden un scFv unido a un dominio CH3 (S. Hu et al. Cancer Res., 56, 3055-3061, 1996).

5 Cuando se van a usar anticuerpos biespecíficos, éstos pueden ser anticuerpos biespecíficos convencionales, que pueden prepararse de varias maneras (Holliger, P. y Winter G. Current Opinion Biotechnol. 4, 446-449 (1993)), p. ej. preparados químicamente o a partir de hibridomas híbridos o pueden ser cualquiera de los fragmentos de anticuerpo biespecíficos mencionados anteriormente. Los ejemplos de anticuerpos biespecíficos incluyen aquellos de la tecnología BiTE™ en los que los dominios de unión de dos anticuerpos con diferente especificidad pueden usarse y unirse directamente mediante péptidos flexibles cortos. Esto combina dos anticuerpos en una única cadena polipeptídica corta.

10 Los fragmentos bivalentes y scFv pueden construirse sin una región Fc, usando sólo dominios variables, reduciendo potencialmente los efectos de la reacción anti-idiotípica.

Los fragmentos bivalentes biespecíficos, a diferencia de los anticuerpos biespecíficos completos, pueden ser particularmente útiles porque pueden construirse y expresarse fácilmente en E. coli. Los fragmentos bivalentes (y muchos otros polipéptidos tales como fragmentos de anticuerpo) con especificidades de unión apropiadas pueden

15 seleccionarse fácilmente usando exposición en fagos (WO94/13804) de bibliotecas. Si se quiere mantener constante un brazo del fragmento bivalente, por ejemplo, con una especificidad dirigida frente a IL-13, puede hacerse una biblioteca en la que el otro brazo se varía y se selecciona un anticuerpo con la especificidad apropiada. Los anticuerpos biespecíficos completos pueden hacerse por ingeniería knobs-into-holes (J. B. B. Ridgeway et al, Protein Eng., 9, 616-621, 1996).

20 *Dominio de unión al antígeno*

Esto describe la parte de una molécula de anticuerpo que comprende el área que se une específicamente a y es complementaria a parte de o todo un antígeno. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo puede unirse sólo a una parte particular del antígeno, parte que se denomina un epítipo. Un dominio de unión al antígeno puede proporcionarse por uno o más dominios variables de anticuerpo (p. ej. un denominado fragmento de anticuerpo Fd, que consiste en un

25 dominio VH). Preferiblemente, un dominio de unión al antígeno comprende una región variable de cadena ligera de anticuerpo (VL) y una región variable de cadena pesada de anticuerpo (VH).

Específico

Esto puede usarse para referirse a la situación en la que un miembro de una pareja de unión específica no mostrará ninguna unión significativa a moléculas distintas de su o sus parejas de unión específicas. El término también es

30 aplicable cuando, p. ej. un dominio de unión al antígeno es específico para un epítipo particular que aparece en varios antígenos, en cuyo caso el miembro de unión específico que porta el dominio de unión al antígeno será capaz de unirse a los distintos antígenos que presentan el epítipo.

Comprender

Esto se usa generalmente en el sentido de incluir, es decir que permite la presencia de una o más características o

35 componentes.

Aislado

Esto se refiere al estado en el que los miembros de unión específicos de la invención, o ácido nucleico que codifica dichos miembros de unión, serán generalmente según la presente invención. Los miembros aislados y ácido nucleico

40 aislado carecerán o carecerán sustancialmente de material con el que están asociados naturalmente tales como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los que se encuentran en su entorno natural o el entorno en el que se preparan (p. ej. cultivo celular) cuando dicha preparación es por tecnología de ADN recombinante practicada *in vitro* o *in vivo*. Los miembros y ácido nucleico pueden formularse con diluyentes o adyuvantes y aún así aislarse para propósitos prácticos—por ejemplo, los miembros se mezclarán normalmente con gelatina u otros vehículos si se usan para recubrir placas de microtitulación para usarse en inmunoensayos o se mezclarán con vehículos o diluyentes aceptables farmacéuticamente

45 cuando se usan en diagnóstico o terapia. Los miembros de unión específicos pueden estar glicosilados, bien naturalmente o por sistemas de células eucariotas heterólogos (p. ej. células CHO o NS0 (ECACC 85110503) o pueden no estar glicosilados (por ejemplo, si se producen por expresión en una célula procariota).

IL-13 natural

Esto se refiere generalmente a un estado en el que la proteína IL-13 o los fragmentos de ésta pueden ocurrir. IL-13

50 natural significa proteína IL-13 que se produce naturalmente por una célula, sin la introducción previa del ácido nucleico codificador usando tecnología recombinante. Así, IL-13 natural puede ser como se produce naturalmente por ejemplo por

las células T CD4+ y/o como se aísla de un mamífero, p. ej. ser humano, primate no humano, roedor tal como rata o ratón.

IL-13 recombinante

5 Esto se refiere a un estado en el que la proteína IL-13 o fragmentos de ésta pueden ocurrir. IL-13 recombinante significa proteína IL-13 o fragmentos de ésta producidos por ADN recombinante en un anfitrión heterólogo. IL-13 recombinante puede diferenciarse de la IL-13 natural por glicosilación.

10 Las proteínas recombinantes expresadas en sistemas de expresión procariotas bacterianos no están glicosiladas mientras que las expresadas en sistemas eucariotas tales como células de mamífero o de insecto están glicosiladas. Las proteínas expresadas en células de insectos se diferencian, sin embargo, en la glicosilación de las proteínas expresadas en células de mamíferos.

Por "sustancialmente como se muestra" se quiere decir que la CDR o dominio VH o VL relevante será bien idéntico o altamente similar a las regiones especificadas de las que se muestra la secuencia en la presente memoria. Por "altamente similar" se contempla que pueden hacerse de 1 a 5, preferiblemente de 1 a 4 tal como 1 a 3 ó 1 ó 2, ó 3 ó 4, sustituciones de aminoácidos en la CDR y/o dominio VH o VL.

15 La estructura para contener una CDR o un conjunto de CDR de la invención será generalmente una secuencia de cadena pesada o ligera de un anticuerpo o una parte sustancial de ésta en la que la CDR o conjunto de CDR está localizado en una localización correspondiente a la CDR o conjunto de CDR de los dominios variables de anticuerpo VH y VL naturales codificados por genes de inmunoglobulina reorganizados. Las estructuras y localizaciones de los dominios variables de inmunoglobulinas pueden determinarse por referencia a (Kabat, E. A. et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest. 4a Edición. US Department of Health and Human Services. 1987 y actualizaciones de éste, disponibles actualmente en Internet (<http://immuno.bme.nwu.edu> o encontrar "Kabat" usando cualquier motor de búsqueda).

Las CDR también pueden estar contenidas en otros andamios tales como fibronectina o citocromo B [115, 116].

25 Preferiblemente, una secuencia de aminoácidos de CDR está contenida como una CDR en un dominio variable humano o una parte sustancial de éste.

Los dominios variables empleados en la invención pueden obtenerse de cualquier línea germinal o dominio variable humano reorganizado o puede ser un dominio variable sintético basado en secuencias consenso de dominios variables humanos conocidos. Una secuencia de CDR de la invención (p. ej. CDR3) puede introducirse en un repertorio de dominios variables que carecen de CDR (p. ej. CDR3) usando tecnología de ADN recombinante.

30 Por ejemplo, Marks et al (Bio/Technology, 1992, 10:779-783) describen métodos para producir repertorios de dominios variables de anticuerpo en los que se usan cebadores consenso dirigidos a o adyacentes al extremo 5' del área del dominio variable conjuntamente con cebadores consenso a la tercera región marco de genes VH humanos para proporcionar un repertorio de dominios variables VH que carecen de una CDR3. Marks et al describen además cómo este repertorio puede combinarse con una CDR3 de un anticuerpo particular. Usando técnicas análogas, las secuencias derivadas de CDR3 de la presente invención pueden transponerse con repertorios de dominios VH o VL que carecen de CDR3 y los dominios VH o VL transpuestos completos combinarse con un dominio VH o VL parecido para proporcionar miembros de unión específicos de la invención. El repertorio puede exponerse en un sistema de anfitrión adecuado tal como el sistema de exposición en fago de WO92/01047 o cualquiera de un gran conjunto de bibliografía, incluyendo Kay, B. K., Winter, J., y McCafferty, J. (1996) Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual, San Diego: Academic Press, de manera que pueden seleccionarse los miembros de unión específicos adecuados. Un repertorio puede consistir en de ninguno a 10^4 miembros individuales o más, por ejemplo de 10^6 a 10^8 ó 10^{10} miembros. Otros sistemas de anfitrión adecuados incluyen exposición en levaduras, exposición en bacterias, exposición en T7, exposición en ribosomas etc. Para una revisión de la exposición en ribosomas véase Lowe D y Jermutus L. 2009, Curr. Pharm, Biotech, 517-27, también WO92/01047.

45 Las técnicas análogas de transposición o combinatoriales también se describen en Stemmer (Nature, 1994, 370:389-391), que describe la técnica en relación con un gen de β -lactamasa pero observa que el método puede usarse para la generación de anticuerpos.

50 Una alternativa adicional es generar nuevas regiones VH o VL que contienen secuencias derivadas de CDR usando mutagénesis aleatoria de uno o más genes VH y/o VL seleccionados para generar mutaciones en el dominio variable completo. Dicha técnica se describe por Gram et al. (1992, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3576-3580), que usaron PCR tendente a error. En realizaciones preferidas, se hacen una o dos sustituciones de aminoácidos en un conjunto de HCDR y/o LCDR.

Otro método que puede usarse es dirigir la mutagénesis a regiones CDR de genes VH o VL. Dichas técnicas se describen por Barbas et al, (1994, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91:3809-3813) y Schier et al (1996, J. Mol. Biol. 263:551-567).

5 Todas las técnicas descritas anteriormente se conocen como tales en la técnica y por sí mismas no forman parte de la presente invención. El experto en la técnica será capaz de usar dichas técnicas para proporcionar miembros de unión específicos de la invención usando metodología rutinaria en la técnica.

10 La invención también se refiere a un método para obtener un dominio de unión al antígeno de anticuerpo específico para el antígeno IL-13, comprendiendo el método el proporcionar mediante adición, delección, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un dominio VH mostrado en la presente memoria un dominio VH que es una variante de la secuencia de aminoácidos del dominio VH, opcionalmente combinando el dominio VH así proporcionado con uno o más dominios VL y ensayando el dominio VH o la combinación o combinaciones VH/VL para identificar un miembro de unión específico o un dominio de unión al antígeno de anticuerpo específico para el antígeno IL-13 y opcionalmente con una o más propiedades preferidas, preferiblemente la capacidad de neutralizar la actividad de IL-13. Dicho dominio VL puede tener una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente como se muestra en la presente memoria.

Un método análogo puede emplearse en el que una o más variantes de secuencia de un dominio VL descrito en la presente memoria se combinan con uno o más dominios VH.

En una realización preferida, el dominio VH de BAK502G9 (SEQ ID NO: 15) puede someterse a mutación para proporcionar una o más variantes de secuencia de aminoácidos del dominio VH y/o VL de BAK502G9 (SEQ ID NO: 16).

20 La invención se refiere además a un método para preparar un miembro de unión específico para el antígeno IL-13, método que comprende:

(a) proporcionar un repertorio de partida de ácidos nucleicos que codifican un dominio VH que incluye bien una CDR3 que va a reemplazarse o que carece de una región codificadora de CDR3;

25 (b) combinar dicho repertorio con un ácido nucleico donante que codifica una secuencia de aminoácidos sustancialmente como se muestra en la presente memoria para una CDR3 de VH de manera que dicho ácido nucleico donante se inserta en la región CDR3 del repertorio, para proporcionar un repertorio de producto de ácidos nucleicos que codifican un dominio VH;

(c) expresar los ácidos nucleicos de dicho repertorio de producto;

(d) seleccionar un miembro de unión específico para una IL-13; y

30 (e) recuperar dicho miembro de unión específico o ácido nucleico que lo codifica.

De nuevo, puede emplearse un método análogo en el que una CDR3 de VL de la invención se combina con un repertorio de ácidos nucleicos que codifican un dominio VL que bien incluye una CDR3 que va a reemplazarse o que carece de una región codificadora de CDR3.

35 De manera similar, una o más, o las tres CDR pueden injertarse en un repertorio de dominios VH o VL que se criban para un miembro de unión específico o miembros de unión específicos para IL-13.

En una realización preferida, una o más de HCDR1 (SEQ ID NO: 7), HCDR2 (SEQ ID NO: 8) y HCDR3 (SEQ ID NO: 9) de BAK502G9 o el conjunto de HCDR de BAK502G9, puede emplearse y/o una o más de LCDR1 (SEQ ID NO: 10), LCDR2 (SEQ ID NO: 11) de BAK502G9 o el conjunto de LCDR de BAK502G9.

40 Una parte sustancial de un dominio variable de inmunoglobulina comprenderá al menos las tres regiones CDR, junto con sus regiones marco implicadas. Preferiblemente, la parte también incluirá al menos aproximadamente 50% de una o ambas de la primera y cuarta regiones marco, siendo el 50% el 50% C terminal de la primera región marco y el 50% N terminal de la cuarta región marco. Los restos adicionales en el extremo N terminal o C terminal de la parte sustancial del dominio variable pueden ser aquellos que no están asociados normalmente con regiones del dominio variable naturales. Por ejemplo, la construcción de miembros de unión específicos de la presente invención hecha por técnicas de ADN recombinante puede resultar en la introducción de restos N o C terminales codificados por conectores introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación. Otras etapas de manipulación incluyen la introducción de conectores para unir dominios variables de la invención a secuencias proteicas adicionales que incluyen cadenas pesadas de inmunoglobulinas, otros dominios variables (por ejemplo en la producción de fragmentos bivalentes) o etiquetas de proteína como se discute con más detalle en otro lugar de la presente memoria.

Aunque en un aspecto preferido de la invención se prefieren los miembros de unión específicos que comprenden una pareja de dominios VH y VL, los dominios de unión únicos basados en secuencias de los dominios VH o VL forman aspectos adicionales de la invención. Se sabe que los dominios únicos de inmunoglobulinas, especialmente los dominios VH, son capaces de unirse a antígenos diana de manera específica.

- 5 En el caso de cualquiera de los dominios de unión específicos únicos, estos dominios pueden usarse para cribar dominios complementarios capaces de formar un miembro de unión específico de dos dominios capaz de unirse a IL-13.

10 Esto puede conseguirse por métodos de cribado de exposición en fago usando el denominado método combinatorio dual jerárquico como se describe en WO92/01047, en el que una colonia individual que contiene bien un clon de cadena H o L se usa para infectar una biblioteca completa de clones que codifica la otra cadena (L o H) y el miembro de unión específico de dos cadenas resultante se selecciona según técnicas de exposición en fago tales como las descritas en esa referencia. Esta técnica también se describe en Marks *et al*, *ibid*.

15 Los miembros de unión específicos de la presente invención pueden comprender además regiones constantes de anticuerpo o partes de éstas. Por ejemplo, un dominio VL puede unirse en su extremo C terminal a dominios constantes de cadena ligera de anticuerpo incluyendo cadenas C κ o C λ humanas, preferiblemente cadenas C λ . De manera similar, un miembro de unión específico basado en un dominio VH puede unirse en su extremo C terminal a todo o parte (p. ej. un dominio CH1) de una cadena pesada de inmunoglobulina derivada de cualquier isotipo de anticuerpo, p. ej., IgG, IgA, IgE e IgM y cualquiera de las subclases de isotipos, particularmente IgG1 e IgG4. Se prefiere IgG4 porque no se une al complemento y no crea funciones de efector. Cualquier variante sintética u otra región constante que tiene estas propiedades y estabiliza las regiones variables también se prefiere para usarse en las realizaciones de la presente invención.

20 Los miembros de unión específicos de la invención pueden marcarse con un marcaje detectable o funcional. Los marcajes detectables incluyen radiomarcajes tales como ^{131}I o ^{99}Tc , que pueden unirse a anticuerpos de la invención usando química convencional conocida en la técnica de la formación de imágenes de anticuerpos. Los marcajes también pueden incluir marcajes enzimáticos tales como peroxidasa de rábano. Los marcajes incluyen además restos químicos tales como biotina que pueden detectarse mediante la unión a un resto detectable parecido específico, p. ej. avidina marcada.

25 Los miembros de unión específicos de la presente invención se diseñan para usarse en métodos de diagnóstico o tratamiento en sujetos humanos o animales, preferiblemente humanos.

30 De acuerdo con esto, los aspectos adicionales de la invención proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden dicho miembro de unión específico y el uso de dicho miembro de unión específico en la fabricación de un medicamento para la administración, por ejemplo, en un método de hacer un medicamento o composición farmacéutica que comprende formular el miembro de unión específico con un excipiente aceptable farmacéuticamente.

35 Las indicaciones clínicas en las que puede usarse un anticuerpo anti-IL-13 para proporcionar beneficio terapéutico incluyen asma, dermatitis atópica, rinitis alérgica, fibrosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad inflamatoria del intestino, escleroderma y linfoma de Hodgkin. Como ya se ha explicado, el tratamiento anti-IL-13 es eficaz para todas estas enfermedades.

40 El tratamiento anti-IL-13 puede proporcionarse oralmente, por inyección (por ejemplo, por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal o intramuscular), por inhalación o tópicamente (por ejemplo, intraocular, intranasal, rectal, en heridas, en la piel). La vía de administración puede determinarse por las características físico-químicas del tratamiento, con consideraciones especiales para la enfermedad o por el requerimiento de optimizar la eficacia o para minimizar los efectos secundarios.

Se considera que el tratamiento anti-IL-13 no estará restringido al uso en clínica. Por lo tanto, también se prefiere la inyección subcutánea usando un dispositivo sin aguja.

45 Los tratamientos de combinación pueden usarse para proporcionar efectos sinérgicos significativos, particularmente la combinación de un miembro de unión específico anti-IL-13 con uno más fármacos diferentes. Un miembro de unión específico según la presente invención puede proporcionarse en combinación o adición con agonistas beta de acción corta o larga, corticosteroides, cromoglicato, antagonistas de leucotrieno (receptor), metil xantinas y sus derivados, inhibidores de IL-4, antagonistas del receptor muscarínico, inhibidores de IgE, inhibidores histamínicos, inhibidores de IL-5, inhibidores de eotaxina/CCR3, inhibidores de PDE4, antagonistas TGF-beta, interferón gamma, perfenidona, agentes quimioterapéuticos y agentes inmunoterapéuticos.

50 El tratamiento de combinación con uno o más agonistas beta de acción corta o larga, corticosteroides, cromoglicato, antagonistas de leucotrieno (receptor), xantinas, inhibidores de IgE, inhibidores de IL-4, inhibidores de IL-5, inhibidores

de eotaxina/CCR3, inhibidores de PDE4 puede emplearse para el tratamiento del asma. Los anticuerpos de la presente invención también pueden usarse en combinación con corticosteroides, anti-metabolitos, antagonistas de TGF-beta y su vía de señalización posterior, para el tratamiento de la fibrosis. La terapia de combinación de estos anticuerpos con inhibidores de PDE4, xantinas y sus derivados, antagonistas del receptor muscarínico, antagonistas beta de acción corta y larga puede ser útil para tratar la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Una consideración similar de combinaciones se aplica al uso del tratamiento anti-IL-13 para dermatitis atópica, rinitis alérgica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad inflamatoria del intestino, escleroderma y linfoma de Hodgkin.

Las composiciones descritas en la presente memoria pueden administrarse a individuos. La administración es preferiblemente en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo ésta suficiente para mostrar beneficio a un paciente. Dicho beneficio puede ser al menos la mejora de al menos un síntoma. La cantidad real administrada, y la velocidad y curso de tiempo de la administración, dependerá de la naturaleza y gravedad de lo que se está tratando. La prescripción del tratamiento, p. ej. decisiones sobre la dosificación etc, es responsabilidad de los médicos generales y otros doctores médicos. Las dosis apropiadas de anticuerpo son muy conocidas en la técnica; véase Ledermann J. A. et al. (1991) *Int. J. Cancer* 47:659-664; Bagshawe K. D. et al. (1991) *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals* 4:915-922.

La dosis precisa dependerá de varios factores, incluyendo si el anticuerpo es para diagnóstico o para tratamiento, el tamaño y localización del área que se va a tratar, la naturaleza precisa del anticuerpo (p. ej. anticuerpo completo, fragmento o fragmento bivalente) y la naturaleza de cualquier marcaje detectable u otra molécula unida al anticuerpo. Una dosis de anticuerpo típica estará en el intervalo 100 µg a 1 gm para aplicaciones sistémicas y 1 µg a 1 mg para aplicaciones tópicas. Típicamente, el anticuerpo será un anticuerpo completo, preferiblemente el isotipo IgG4. Ésta es una dosis para un tratamiento único de un paciente adulto, que se ajustará proporcionalmente para niños y bebés y también se ajustará para otros formatos de anticuerpo en proporción al peso molecular. Los tratamientos pueden repetirse a intervalos diarios, dos veces a la semana, semanalmente o mensualmente, a la discreción del médico. En realizaciones preferidas de la presente invención, el tratamiento es periódico y el periodo entre administraciones es aproximadamente dos semanas o más, preferiblemente aproximadamente tres semanas o más, más preferiblemente aproximadamente cuatro semanas o más o aproximadamente una vez al mes.

Los miembros de unión específicos descritos en la presente memoria se administrarán habitualmente en la forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además del miembro de unión específico.

Así, las composiciones farmacéuticas según la presente invención, y para usarse según la presente invención, pueden comprender, además del ingrediente activo, un excipiente, vehículo, tampón, estabilizante u otros materiales farmacéuticamente aceptables conocidos para los expertos en la técnica. Dichos materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser oral, o por inyección, p. ej. intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden estar en forma de comprimido, cápsula, polvo o líquido. Un comprimido puede comprender un vehículo sólido tal como gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas comprenden generalmente un vehículo líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Pueden incluirse disolución salina fisiológica, dextrosa u otra disolución de sacáridos o glicoles tal como etilen glicol, propilen glicol o polietilen glicol.

Para inyección intravenosa, o inyección en el sitio de la afección, el ingrediente activo estará en la forma de una disolución acuosa parenteralmente aceptable que carece de pirógenos y tiene un pH, isotonicidad y estabilidad adecuadas. Aquellos con experiencia relevante en la técnica son capaces de preparar disoluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como Inyección con Cloruro de Sodio, Inyección con Ringer, Inyección con Ringer con Lactato. Según se requiera pueden incluirse conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/o otros aditivos.

Una composición puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, bien simultáneamente o secuencialmente dependiendo de la condición que se va a tratar.

Los miembros de unión específicos de la presente invención pueden formularse en formas líquidas o sólidas dependiendo de las propiedades físico-químicas de la molécula y la vía de administración. Las formulaciones pueden incluir excipientes, o combinaciones de excipientes, por ejemplo: azúcares, aminoácidos y tensioactivos. Las formulaciones líquidas pueden incluir un amplio rango de concentraciones de anticuerpo y pH. Las formulaciones sólidas pueden producirse por liofilización, secado por pulverización, o secado por tecnología de fluidos supercríticos, por ejemplo. Las formulaciones de anti-IL-13 dependerán de la vía pretendida de administración: por ejemplo, las formulaciones para administración pulmonar pueden consistir en partículas con propiedades físicas que aseguren la penetración en el pulmón profundo después de la inhalación; las formulaciones tópicas pueden incluir agentes que modifican la viscosidad, que prolongan el tiempo que el fármaco permanece en el sitio de acción.

La presente invención proporciona un método que comprende causar o permitir la unión de un miembro de unión específico como se proporciona en la presente memoria a IL-13 *in vitro*, por ejemplo en ELISA, transferencia Western, inmunocitoquímica, inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad o ensayos basados en células tal como un ensayo TF-1.

- 5 La cantidad de unión del miembro de unión específico a IL-13 puede determinarse. La cuantificación puede relacionarse con la cantidad del antígeno en una muestra de ensayo, que puede tener interés diagnóstico.

También se describe un kit que comprende un miembro de unión específico o molécula de anticuerpo según cualquier aspecto o realización de la presente invención. En un kit, el miembro de unión específico o molécula de anticuerpo puede estar marcado para permitir su reactividad en una muestra que se quiere determinar, p. ej. como se describe
10 adicionalmente a continuación. Los componentes de un kit son generalmente estériles y en viales u otros contenedores sellados. Los kits pueden emplearse en análisis diagnóstico u otros métodos para los que son útiles las moléculas de anticuerpo. Un kit puede contener instrucciones para usar los componentes en un método, p. ej. un método según la presente invención. En un kit pueden incluirse materiales auxiliares para ayudar en o para permitir la realización de dicho método.

15 Las reactividades de los anticuerpos en una muestra pueden determinarse mediante cualquier medio apropiado. El radioinmunoensayo (RIA) es una posibilidad. El antígeno marcado radiactivamente se mezcla con antígeno no marcado (la muestra de ensayo) y se permite que se una al anticuerpo. El antígeno unido se separa físicamente del antígeno no unido y se determina la cantidad de antígeno radiactivo unido al anticuerpo. Cuanto más antígeno hay en la muestra de ensayo menos antígeno radiactivo se unirá al anticuerpo. También puede usarse un ensayo de unión competitiva con
20 antígeno no radiactivo, usando antígeno o un análogo unido a una molécula informadora. La molécula informadora puede ser un fluorocromo, marcador fosfor o láser con características de absorción o emisión aisladas espectralmente. Los fluorocromos adecuados incluyen fluoresceína, rodamina, ficoeritrina y Rojo Texas. Los marcadores cromogénicos adecuados incluyen diaminobencidina.

Otros informadores incluyen partículas coloidales macromoleculares o material particulado tal como lechos de látex que son agentes coloreados, magnéticos o paramagnéticos y biológicamente o químicamente activos que pueden causar
25 directamente o indirectamente señales detectables para ser observadas visualmente, detectadas electrónicamente o registradas de otra manera. Estas moléculas pueden ser enzimas que catalizan reacciones que desarrollan o cambian colores o causan cambios en las propiedades eléctricas, por ejemplo. Pueden ser excitables molecularmente, de manera que las transiciones electrónicas entre estados de energía resultan en absorciones o emisiones espectrales características. Pueden incluir entidades químicas usadas conjuntamente con biosensores. Pueden emplearse los
30 sistemas de detección biotina/avidina o biotina/estreptavidina y fosfatasa alcalina.

Las señales generadas por conjugados individuales anticuerpo-informador pueden usarse para obtener datos absolutos o relativos cuantificables de la unión del anticuerpo relevante en las muestras (normal y ensayo).

35 La presente invención también proporciona el uso de un miembro de unión específico como anteriormente para medir los niveles de antígeno en un ensayo de competición, es decir un método para medir el nivel de antígeno en una muestra empleando un miembro de unión específico como se proporciona por la presente invención en un ensayo de competición. Esto puede ser cuando no se requiera la separación física del antígeno unido del no unido. Una posibilidad es unir una molécula informadora al miembro de unión específico de manera que ocurra un cambio físico u óptico con la unión. La molécula informadora puede generar directamente o indirectamente señales detectables y preferiblemente
40 mensurables. La unión de la molécula informadora puede ser directamente o indirectamente, covalentemente, p. ej. mediante un enlace peptídico o no covalentemente. La unión mediante un enlace peptídico puede ser resultado de la expresión recombinante de una fusión génica que codifica anticuerpo y molécula informadora.

La presente invención también proporciona la medición de los niveles del antígeno directamente, empleando un miembro de unión específico según la invención por ejemplo en un sistema de biosensor.

45 El modo para determinar la unión no es una característica de la presente invención y los expertos en la técnica son capaces de elegir un modo adecuado según su preferencia y conocimiento general.

También se describe en la presente memoria un miembro de unión específico que compite para la unión a IL-13 con cualquier miembro de unión específico definido en la presente memoria, p. ej. BAK502G9 IgG4. La competición entre los miembros de unión puede ensayarse fácilmente *in vitro*, por ejemplo etiquetando una molécula informadora específica a
50 un miembro de unión que puede detectarse en presencia de otro u otros miembros de unión no etiquetados, para permitir la identificación de miembros de unión específicos que se unen al mismo epítipo o un epítipo superpuesto.

La competición puede determinarse por ejemplo usando ELISA en el que IL-13 se inmoviliza en una placa y un primer miembro de unión etiquetado junto con uno o más miembros de unión distintos no etiquetados se añaden a la placa. La

presencia de un miembro de unión no etiquetado que compite con el miembro de unión etiquetado se observa por una disminución de la señal emitida por el miembro de unión etiquetado.

En el ensayo de competición puede emplearse un fragmento peptídico del antígeno, especialmente un péptido que incluye un epítipo de interés. Puede usarse un péptido que tiene la secuencia del epítipo más uno o más aminoácidos en cualquier extremo. Dicho péptido puede decirse que "consiste esencialmente" en la secuencia especificada. Los miembros de unión específicos según la presente invención pueden ser tales que su unión al antígeno se inhibe por un péptido con o que incluye la secuencia dada. Ensayando esto, puede usarse un péptido con cualquier secuencia más uno o más aminoácidos.

Los miembros de unión específicos que se unen a un péptido específico pueden aislarse por ejemplo de una biblioteca de exposición en fagos por reconocimiento y selección con el o los péptidos.

La presente invención proporciona además un ácido nucleico aislado que codifica un miembro de unión específico de la presente invención. El ácido nucleico puede incluir ADN y/o ARN. En un aspecto preferido, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica un dominio VH o dominio VL o molécula de anticuerpo, p. ej. scFv o IgG4 de la invención como se ha definido anteriormente.

La presente invención también proporciona construcciones en la forma de plásmidos, vectores, casetes de transcripción o expresión que comprenden al menos un polinucleótido como anteriormente.

La presente invención también proporciona una célula anfitriona recombinante que comprende una o más construcciones como anteriormente. Un ácido nucleico que codifica cualquier dominio VH o dominio VL o molécula de anticuerpo, p. ej. scFv o IgG4 como se proporciona, forma en sí misma un aspecto de la presente invención así como un método de producción del producto codificado, método que comprende la expresión a partir del ácido nucleico codificador. La expresión puede conseguirse convenientemente mediante el cultivo bajo condiciones apropiadas de células anfitrionas recombinantes que contienen el ácido nucleico. Después de la producción por expresión un dominio VH o VL o miembro de unión específico puede aislarse y/o purificarse usando cualquier técnica adecuada y usarse entonces según sea apropiado.

Los miembros de unión específicos, dominios VH y/o VL y moléculas de ácido nucleico codificadoras y vectores según la presente invención pueden proporcionarse aislados y/o purificados, p. ej. de su entorno natural, en forma sustancialmente pura u homogénea o, en el caso de ácido nucleico, sin o sustancialmente sin ácido nucleico o genes con un origen distinto de la secuencia que codifica un polipéptido con la función requerida. El ácido nucleico según la presente invención puede comprender ADN o ARN y puede ser completamente o parcialmente sintético. La referencia a una secuencia de nucleótidos como se muestra en la presente memoria engloba una molécula de ADN con la secuencia especificada y engloba una molécula de ARN con la secuencia especificada en la que U está sustituida por T, a no ser que el contexto requiera otra cosa.

Los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en varias células anfitrionas diferentes son muy conocidos. Las células anfitrionas adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, células de plantas, levaduras y sistemas de baculovirus y plantas y animales transgénicos. Las líneas celulares de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster, células de melanoma de ratón NS0, células de mieloma de rata YB2/0, células de riñón embrionario humano, células de la retina embrionaria humana, y muchas otras. Un anfitrión bacteriano común, preferido es *E. coli*.

La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo en células procariotas tales como *E. coli* está muy establecida en la técnica. Para una revisión, véase por ejemplo Plückthun, A. *Bio/Technology* 9: 545-551 (1991). La expresión en células eucariotas en cultivo también está disponible para los expertos en la técnica como una opción para la producción de un miembro de unión específico por ejemplo Chadd HE y Chamow SM (2001) 110 *Current Opinion in Biotechnology* 12: 188-194, Andersen DC y Krummen L (2002) *Current Opinion in Biotechnology* 13: 117, Larrick JW y Thomas DW (2001) *Current Opinion in Biotechnology* 12: 411-418.

Los vectores adecuados pueden elegirse o construirse, y contienen secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, secuencias de terminación, secuencias de poliadenilación, secuencias amplificadoras, genes marcadores y otras secuencias según sea apropiado. Los vectores pueden ser plásmidos, virales p. ej. fago o fagémido según sea apropiado. Para más detalles véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 3a Edición, Sambrook y Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo, en la preparación de construcciones de ácidos nucleicos, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas, se describen con detalles en *Current Protocols in Molecular Biology*, Segunda Edición, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1988, *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 4a edición, 1999.

Así, un aspecto adicional de la presente invención proporciona una célula anfitriona que contiene ácido nucleico de la invención. Dicha célula anfitriona puede estar *in vitro* y puede estar en cultivo. Dicha célula anfitriona puede estar *in vivo*. La presencia *in vivo* de la célula anfitriona puede permitir la expresión intracelular de los miembros de unión específicos de la presente invención como "intrabodies" o anticuerpos intracelulares. Los intrabodies pueden usarse para terapia génica [112].

También se describe un método que comprende introducir dicho ácido nucleico en una célula anfitriona. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. Para células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir transfección con fosfato de calcio, DEAE-Dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción usando retrovirus u otro virus, p. eg. vaccinia o, para células de insectos, baculovirus. La introducción del ácido nucleico en la célula anfitriona, en particular una célula eucariota puede usar un sistema basado en virus o un plásmido. El sistema de plásmido puede mantenerse episomalmente o puede incorporarse en la célula anfitriona o en un cromosoma artificial [110, 111]. La incorporación puede ser por integración aleatoria o dirigida de una o más copias en un único o múltiples loci. Para las células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir transformación con cloruro de calcio, electroporación y transfección usando bacteriófagos.

La introducción puede seguirse causando o permitiendo la expresión a partir del ácido nucleico, p. ej. cultivando las células anfitrionas bajo condiciones para la expresión del gen.

En una realización, el ácido nucleico de la invención se integra en el genoma (p. ej. cromosoma) de la célula anfitriona. La integración puede estimularse por la inclusión de secuencias que estimulan la recombinación con el genoma, según técnicas estándar.

La presente invención también proporciona un método que comprende usar una construcción como se ha indicado anteriormente en un sistema de expresión con el fin de expresar un miembro de unión específico o polipéptido como anteriormente.

Los aspectos y realizaciones de la presente invención se ilustrarán ahora como ejemplo con referencia a la experimentación siguiente.

EJEMPLO 1

Aislamiento de scFv anti-IL-13

Repertorio de anticuerpos scFv

Una biblioteca grande de anticuerpo de cadena única Fv (scFv) humana obtenida de linfocitos del bazo de 20 donantes y clonada en un vector fagémido se usó para las selecciones [66].

Selección de scFv

ScFv que reconocen IL-13 se aislaron de bibliotecas de exposición en fago en una serie de ciclos de selección reiterados en IL-13 humana o murina recombinante obtenida de bacterias (Peptotech) esencialmente como se describe en [67]. Brevemente, después de la incubación con la biblioteca, el antígeno inmovilizado, que se había pre-acoplado a lechos paramagnéticos, y el fago unido se recuperaron por separación magnética mientras que el fago no unido se eliminó por lavado. El fago unido se rescató como describen Vaughan et al [67] y se repitió el proceso de selección. Se usaron diferentes superficie sólidas y métodos de captura en diferentes rondas de selección para reducir la unión no específica. El antígeno se acopló covalentemente a los lechos (Dynabeads M-270 ácido carboxílico) o se modificó por biotinylation antes de una captura secundaria con lechos recubiertos con estreptavidina (Dynabeads M-280) según los protocolos del fabricante (Dyna). Una proporción representativa de clones resultante de las rondas de selección se sometieron a secuenciación de ADN como se describe en Vaughan et al [67] y Osbourn et al [70]. Se evaluaron clones únicos para su capacidad de neutralizar IL-13 como preparaciones de scFv purificadas en ensayos de proliferación celular dependiente de IL-13.

Se crearon bibliotecas de exposición en ribosomas y se cribaron para scFv que reconocen específicamente IL-13 humana o murina recombinante obtenida de bacterias (Peptotech), esencialmente como se describe en Hanes et al [113]. Inicialmente, el clon principal BAK278D6 de las selecciones iniciales se convirtió en formato de exposición en ribosomas y este molde se usó posteriormente para la creación de la biblioteca. A nivel de ADN, se añadió un promotor T7 en el extremo 5' para la transcripción eficaz a ARNm. A nivel de ARNm, la construcción contenía un sitio de unión a ribosoma procariota (secuencia Shine-Dalgarno). En el extremo 3' de la cadena única, se eliminó el codon de parada y se añadió una parte de gIII (gen III) para actuar como espaciador [113].

Las bibliotecas de exposición en ribosomas obtenidas de BAK278D6 se crearon por mutagénesis de regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de anticuerpo en las que se realizaron reacciones de PCR con

polimerasa Taq sin corrección de errores. Se realizaron selecciones basadas en afinidad, seguido de incubación con la biblioteca, la IL-13 humana biotinilada se capturó con lechos paramagnéticos recubiertos con estreptavidina (DynaM280) y se recuperaron complejos terciarios unidos (ARNm-ribosoma-scFv-IL-13) por separación magnética mientras que los complejos no unidos se eliminaron por lavado. El ARNm que codifica los scFv unidos se recuperó por RT-PCR como se describe en Hanes et al [113] y el proceso de selección se repitió con concentraciones decrecientes (100 nM-100 pM en 5 rondas) de IL-13 humana biotinilada presente durante la selección.

También se usó PCR tendente a error para incrementar más el tamaño de la biblioteca. Se emplearon tres intensidades de error (2,0, 3,5 y 7,2 mutaciones por 1.000 pb después de una reacción PCR estándar, como se describe en el protocolo del fabricante (Clontech)) durante el régimen de selección. Las reacciones iniciales de PCR tendente a error tuvieron lugar antes de comenzar la ronda uno de selecciones a 100 nM. Se realizó una ronda posterior de PCR tendente a error antes de las selecciones de la ronda tres a 10 nM IL-13 humana biotinilada. Como anteriormente, una proporción representativa de clones resultante de las rondas de selección se sometieron a secuenciación de ADN como se describe en Vaughan et al [67] y Osbourn et al [70]. Se evaluaron clones únicos para su capacidad de neutralizar IL-13 como preparaciones de scFv purificadas en ensayos de proliferación celular dependiente de IL-13.

EJEMPLO 2

Potencia de neutralización de scFv anti-IL-13 en el ensayo de proliferación de células TF-1 dependiente de IL-13

La potencia de neutralización de preparaciones de scFv purificado frente a la bioactividad de IL-13 humana y murina se evaluó usando el ensayo de proliferación celular TF-1. Las preparaciones de scFv purificado se prepararon como se describe en el Ejemplo 3 de WO01/66754. Las concentraciones de proteína de las preparaciones de scFv purificado se determinaron usando el método BCA (Pierce). TF-1 es una línea celular premeleioide humana establecida a partir de un paciente con eritroleucemia [68]. La línea celular TF-1 es dependiente de factor para sobrevivir y proliferar. A este respecto, las células TF-1 respondieron tanto a IL-13 humana como murina [69] y se mantuvieron en medio que contiene GM-CSF humano (4 ng/ml, R&D Systems). La inhibición de la proliferación dependiente de IL-13 se determinó midiendo la reducción en la incorporación de timidina tritiada en el ADN recién sintetizado de las células en división.

Protocolo del ensayo en células TF-1

Las células TF-1 se obtuvieron de R&D Systems y se mantuvieron según los protocolos suministrados. Los medios de ensayo comprendían RPMI-1640 con GLUTAMAX (Invitrogen) que contenía 5% de suero fetal bovino (JRH) y 1% piruvato sódico (Sigma). Antes de cada ensayo, las células TF-1 se sedimentaron por centrifugación a 300 x g durante 5 min, el medio se eliminó por aspiración y las células se resuspendieron en medio de ensayo. Este proceso se repitió dos veces con las células resuspendidas a una concentración final de 10^5 células/ml en el medio de ensayo. Las diluciones de ensayo del anticuerpo (en triplicado) se diluyeron hasta la concentración deseada en medio de ensayo. Se usó un anticuerpo irrelevante no dirigido a IL-13 como control negativo. La IL-13 humana o murina recombinante obtenida de bacterias (Peprotech) se añadió a una concentración final de 50 ng/ml cuando se mezcló con el anticuerpo de ensayo apropiado en un volumen total de 100 µl/pocillo en una placa de ensayo de 96 pocillos. La concentración de IL-13 usada en el ensayo se seleccionó como la dosis que a la concentración final del ensayo proporcionó aproximadamente 80% de la respuesta proliferativa máxima. Todas las muestras se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 100 µl de las células resuspendidas a cada punto de ensayo para proporcionar un volumen total de ensayo de 200 µl/pocillo. Las placas de ensayo se incubaron durante 72 horas a 37°C bajo 5% CO₂. Se añadieron 25 µl de timidina tritiada (10 µCi/ml, NEN) a cada punto de ensayo y las placas de ensayo se volvieron a poner en el incubador durante 4 horas más. Las células se recogieron en placas de filtro de fibra de vidrio (Perkin Elmer) usando un recolector celular. La incorporación de timidina se determinó usando un contador de centelleo líquido de microplacas TopCount de Packard. Los datos se analizaron usando el programa informático Graphpad Prism.

Resultados

A pesar de los ciclos de selección alternantes entre el antígeno humano y murino no se obtuvieron anticuerpos neutralizantes con reactividad cruzada. Se obtuvieron dos scFv neutralizantes distintos anti-IL-13 humana y uno anti-IL-13 murina de las selecciones. BAK278D6 (VH SEQ ID NO: 13; VL SEQ ID NO: 14) y BAK167A11 (VH SEQ ID NO: 23; VL SEQ ID NO: 24) reconocieron IL-13 humana mientras que BAK209B11 (VH SEQ ID NO: 25; VL SEQ ID NO: 26) reconocieron IL-13 murina. BAK278D6 (Figura 2) y BAK167A11 (Figura 1) como scFv neutralizaron 25 ng/ml IL-13 humana con una CI₅₀ de 44 nM y 111 nM respectivamente. BAK209B11 (Figura 3) como scFv neutralizó 25 ng/ml IL-13 murina con una CI₅₀ de 185 nM.

EJEMPLO 3

Potencia de neutralización de clones principales de la optimización dirigida de CDR3 de cadena pesada de clones parentales en el ensayo de proliferación de células TF-1 dependiente de IL-13

Osborn et al [70] han demostrado que la mutagénesis dirigida de restos en CDR3 de la cadena pesada puede mejorar significativamente la afinidad de los anticuerpos. Las selecciones se realizaron como se ha descrito en el Ejemplo 1, en repertorios de scFv en los que los restos de CDR3 de la cadena pesada de BAK278D6 (SEQ ID NO: 6), BAK167A11 (SEQ ID NO: 57) se habían aleatorizado por mutagénesis. Se identificaron clones únicos del resultado de la selección por secuenciación de ADN y su potencia de neutralización se evaluó como scFv en el ensayo de proliferación de células TF-1, como se ha descrito en el Ejemplo 2.

Resultados

Se consiguieron ganancias significativas en la potencia para ambos linajes. Los clones más potentes del linaje BAK167A11 fueron BAK615E3, BAK612B5 y BAK582F7 que como scFv tuvieron una CI_{50} de 3 nM (Figura 1), 6,6 nM, 6,5 nM respectivamente frente a 25 ng/ml de IL-13 humana en el ensayo de proliferación de células TF-1. Del linaje BAK278D6, el clon más potente fue BAK502G9, que como scFv tuvo una CI_{50} de 8 nM frente a 25 ng/ml de IL-13 humana en el ensayo de proliferación de células TF-1 (Figura 2).

EJEMPLO 4

Potencia de neutralización de los linajes BAK167A11 y BAK278D6 frente a IL-13 de primates no humanos y una variante de IL-13 asociada con asma en el ensayo de proliferación de células TF-1 dependiente de factor

Ninguno de los linajes BAK167A11 y BAK278D6 neutralizantes de IL-13 humana reaccionaron de manera cruzada con la murina. Los inventores decidieron, por lo tanto, sobre los criterios siguientes la selección del linaje para una mayor optimización y desarrollo clínico: preferiblemente debe reaccionar de manera cruzada con IL-13 de primates no humanos y debe reconocer una variante de IL-13, en la que la arginina en el aminoácido de la posición 130 está sustituida por glutamina (R130Q). Esta variante se ha asociado genéticamente con el asma y otras enfermedades alérgicas [37, 39, 41, 71]. La reactividad cruzada se determinó por la capacidad de preparaciones de scFv purificado de unir IL-13 de primates no humanos y variante de IL-13 por análisis de resonancia de plasmón superficial (BIAcore). La actividad funcional se determinó usando el ensayo de proliferación de células TF-1.

Producción de IL-13 de tipo salvaje, variante y de primates no humanos Un ADNc de IL-13 humana de tipo salvaje se obtuvo de InvivoGen y se modificó por mutagénesis dirigida a sitio (kit Stratagene Quikchange®) para rendir un ADNc que codifica la variante de IL-13. La secuencia codificadora tanto de IL-13 de mono rhesus como cynomolgus se obtuvo por PCR en molde de ADN genómico usando cebadores degenerados basados en la secuencia de IL-13 humana. Ambas secuencias de primates no humanos (rhesus y cynomolgus) eran idénticas entre sí pero se diferenciaban de la IL-13 humana en siete aminoácidos (Figura 19). La IL-13 recombinante de tipo salvaje, variante y de primates no humanos se expresó posteriormente usando el sistema de expresión de baculovirus (Invitrogen). Las construcciones de expresión añadieron una etiqueta de afinidad en el extremo carboxilo a la proteína expresada que permitió la purificación a partir del medio condicionado de células de insectos hasta casi la homogeneidad.

Ensayo de unión cuantitativo usando BIAcore

La afinidad de unión de preparaciones de scFv purificado frente a IL-13 de primates no humanos, variante y de tipo salvaje se determinó por medidas de resonancia de plasmón superficial usando un Biosensor 2000 BIAcore (BIAcore AB) como se describe en Karlsson et al [72]. Brevemente, IL-13 se acopló a chips sensores CM5 usando un kit de acoplamiento de amina (BIAcore) a una densidad superficial de aproximadamente 200Ru y se pasaron sobre la superficie del chip del sensor tres concentraciones de scFv de ensayo (aproximadamente 350 nM, 175 nM y 88 nM) en tampón HBS-EP. Los sensogramas resultantes se evaluaron usando el programa informático de evaluación BIA 3.1 para proporcionar datos de unión relativos.

Protocolo de ensayo en TF-1

El ensayo se realizó esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 2 con las modificaciones siguientes: IL-13 de primates no humanos, variante de IL-13 humana (R130Q) e IL-13 humana de tipo salvaje se usaron a concentraciones de 50 ng/ml, 25 ng/ml y 25 ng/ml, respectivamente.

Resultados

Los datos del ensayo de unión BIAcore sugirieron que el linaje BAK278D6 pero no BAK167A11 tenía el perfil de reactividad cruzada requerido para un desarrollo terapéutico adicional (Tabla 2). Este descubrimiento se vio apoyado por los datos del bioensayo que demuestran que BAK278D6 (Figura 4) y BAK502G9 (Figura 6) eran capaces de neutralizar IL-13 humana, la variante de IL-13 humana (R130Q) y la IL-13 de primates no humanos en el ensayo de proliferación de células TF-1 con una potencia prácticamente equivalente. Por el contrario, aunque BAK615E3 (VH SEQ ID NO: 33; VL SEQ ID NO: 34) tenía una potencia significativamente incrementada frente a IL-13 humana sobre su parental BAK167A11

(VH SEQ ID NO: 23; VL SEQ ID NO: 24) en el ensayo de proliferación de células TF-1 (Figura 1), ningún clon se unió a IL-13 de primates no humanos ni a la variante de IL-13 en el ensayo de unión BIAcore.

Regiones marco de la línea germinal de BAK278D6 y BAK502G9

La secuencia de aminoácidos obtenida de VH (SEQ ID NO: 13) y VL (SEQ ID NO: 14) de BAK278D6 se alinearon con las secuencias de la línea germinal humana conocidas en la base de datos VBASE [73] y la línea germinal más cercana se identificó por similitud de secuencia. La línea germinal más cercana para el dominio VH de BAK278D6 (SEQ ID NO: 14) y sus derivados, se identificó como DP14, un miembro de la familia VH1. El VH de BAK278D6 tiene 9 cambios respecto a la línea germinal DP14 en regiones marco. La línea germinal más cercana para el VL de BAK278D6 se identificó como V_h3 3h. El dominio VL de BAK278D6 (SEQ ID NO: 14) tiene sólo 5 cambios respecto a la línea germinal en regiones marco. Las regiones marco de BAK278D6 y sus derivados se volvieron a la línea germinal por mutagénesis dirigida a sitio (kit Stratagene Quikchange) para un emparejamiento idéntico con los anticuerpos humanos nativos.

EJEMPLO 5

Potencia de neutralización de clones principales de optimización dirigida de secuencias CDR1 de cadena pesada y CDR2 de cadena pesada de BAK502G9 en el ensayo de proliferación de células TF-1 dependiente de IL-13 humana

Se realizó una segunda fase de optimización usando la secuencia de BAK502G9, con las regiones marco de la línea germinal, como molde. Las selecciones se realizaron esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 1 en repertorios de scFv en los que los restos en CDR1 de la cadena pesada o CDR2 de la cadena pesada de BAK502G9 se habían aleatorizado por mutagénesis. Se identificaron clones únicos del resultado de la selección por secuenciación de ADN y su potencia de neutralización se evaluó como preparaciones de scFv purificado en el ensayo de proliferación de células TF-1 como se ha descrito en el Ejemplo 2. Se construyeron vectores para los clones scFv más potentes para permitir la reexpresión como anticuerpo IgG4 humano completo como describen Persic et al. (1997 Gene 187: 9-18) con unas pocas modificaciones. Se incluyó un fragmento oriP en los vectores para facilitar el uso con células HEK-EBNA 293 y para permitir la replicación episomal. El dominio variable VH se clonó en el policonector entre la secuencia líder de secreción y el dominio constante gamma 4 humano del vector de expresión pEU8.1(+). El dominio variable VL se clonó en el policonector entre la secuencia líder de secreción y el dominio constante lambda humano del vector de expresión pEU4.1(-).

El anticuerpo completo se purificó del medio condicionado de células EBNA-293 cotransfectadas con las construcciones que expresan las cadenas pesada y ligera por cromatografía de afinidad de proteína A (Amersham Pharmacia). Las preparaciones de anticuerpo purificado se esterilizaron por filtración y se almacenaron a 4°C en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) antes de la evaluación. La concentración de proteínas se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm usando el método BCA (Pierce). Los anticuerpos completos IgG4 humanos reformateados se compararon con anticuerpos anti-IL-13 humana disponibles comercialmente en el ensayo de proliferación TF-1 como se ha descrito en el Ejemplo 2.

Resultados

Como se demuestra en la Figura 5, se mostró que el anticuerpo comercial B-B13 (IgG1 de ratón-Euroclon 5) era significativamente más potente frente a IL-13 humana que el anticuerpo comercial JES10-5A2 (IgG1 de rata-Biosource) con CI_{50} de 1.021 pM y 471 pM respectivamente. Ocho clones, concretamente BAK1111D10, BAK1166G02, BAK1167F02, BAK1167F04, BAK1183H4, BAK1184C8, BAK1185E1, BAK1185F8, obtenidos de BAK502G9 (y por lo tanto "linaje BAK502G9"), en los que CDR1 o CDR2 de la cadena pesada se había tomado como diana, mostraron una potencia mejorada como scFv sobre los anticuerpos comerciales. Estas mejoras se mantuvieron en la conversión a anticuerpo IgG4 humano completo.

Los derivados de BAK502G9 como anticuerpos completos (IgG4) tuvieron una CI_{50} en el intervalo de 244 pM a 283 pM. BAK502G9 como anticuerpo completo IgG4 tuvo una CI_{50} de 384 pM. En resumen, pudieron obtenerse mejoras importantes en la potencia tomando como diana CDR1 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 7) o CDR2 (SEQ ID NO: 8) de BAK502G9. Las comparaciones estadísticas con B-B13 se hicieron usando una ANOVA seguido de un análisis post ensayo de Dunnett (programa informático InStat).

Caracterización adicional

Los anticuerpos anti-humanos seleccionados del linaje BAK278D6 se sometieron a caracterización adicional para determinar su especificidad. Estos incluyeron BAK502G9 (VH SEQ ID NO: 15; VL SEQ ID NO: 16) y sus derivados BAK1167F2 (VH SEQ ID NO: 35; VL SEQ ID NO: 36) y BAK1183H4 (VH SEQ ID NO: 37; VL SEQ ID NO: 38), que son ejemplos representativos de clones con modificaciones en CDR1 de la cadena pesada y CDR2 de la cadena pesada de BAK502G9 respectivamente.

EJEMPLO 6

Potencia de neutralización de clones principales de optimización dirigida de secuencias CDR1 de cadena pesada y CDR2 de cadena pesada de BAK502G9 frente a IL-13 de primates no humanos y una variante de IL-13 asociada con asma en el ensayo de proliferación de células TF-1 dependiente de factor

- 5 La reactividad cruzada de anticuerpos anti-IL-13 humana se determinó por su capacidad de inhibir la proliferación de células TF-1 mediada por IL-13 de primates no humanos y variante de IL-13 como se ha descrito en el Ejemplo 4.

Resultados

- 10 Los anticuerpos anti-IL-13 humana optimizados BAK1167F2 (VH SEQ ID NO: 35; VL SEQ ID NO: 36) y BAK1183H4 (VH SEQ ID NO: 37; VL SEQ ID NO: 38) mantuvieron la especificidad de su parental BAK502G9 (VH SEQ ID NO: 15; VL SEQ ID NO: 16) (Figura 16). La ganancia de potencia frente a IL-13 de tipo salvaje se reflejó en su capacidad de neutralizar IL-13 de primates no humanos y una variante de IL-13 con una potencia sustancialmente equivalente. Las CI_{50} para BAK502G9 frente a IL-13 humana, variante humana y de primates no humanos fueron 1,4 nM, 1,9 nM y 2,0 nM, respectivamente. Las CI_{50} para BAK1167F2 frente a IL-13 humana, variante humana y de primates no humanos fueron 1,0 nM, 1,1 nM y 1,3 nM, respectivamente. Las CI_{50} para BAK1183H4 frente a IL-13 humana, variante humana y de primates no humanos fueron 0,9 nM, 1,0 nM y 1,6 nM, respectivamente. Estos clones son adecuados para uso terapéutico.

EJEMPLO 7

Potencia de neutralización de anticuerpos principales anti-IL-13 humana frente a IL-13 humana nativa en el ensayo de proliferación de células HDLM-2

- 20 La secuencia de IL-13 humana tiene 4 sitios de N glicosilación potenciales. Los inventores han demostrado la capacidad de BAK278D6 y sus derivados para neutralizar IL-13 recombinante expresada en sistemas de expresión bacterianos o de baculovirus. Aunque existen evidencias de que muchos eventos de procesamiento conocidos en sistemas de mamíferos también ocurren en insectos hay diferencias clave en la glicosilación de proteínas, particularmente N-glicosilación [74].

- 25 Los inventores investigaron la capacidad de los derivados de BAK278D6 para neutralizar IL-13 nativa liberada de células humanas.

- Las células HDLM-2 fueron aisladas por Drexler et al [75] de un paciente con enfermedad de Hodgkin. Skinnider et al [76] demostraron que la proliferación de las células HDLM-2 era dependiente en parte de la liberación autocrina y paracrina de IL-13. Los anticuerpos principales anti-IL-13 humana se evaluaron para su capacidad de inhibir la proliferación de células HDLM-2 mediada por la liberación de IL-13 nativa (o natural).

Protocolo de ensayo en células HDLM-2

- 35 Las células HDLM-2 se obtuvieron de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) y se mantuvieron según los protocolos suministrados. Los medios de ensayo comprendían RPI-1640 con Glutamax I (Invitrogen) que contiene 20% de suero fetal bovino. Antes de cada ensayo, las células se sedimentaron por centrifugación a 300 x g durante 5 min, el medio se eliminó por aspiración y las células se resuspendieron en medio fresco. Este proceso se repitió tres veces y las células se resuspendieron finalmente a una concentración final de 2×10^5 células/ml en el medio de ensayo. Se añadieron 50 μ l de células resuspendidas a cada punto de ensayo en una placa de ensayo de 96 pocillos. Las diluciones de ensayo de los anticuerpos (en triplicado) se diluyeron hasta la concentración deseada en medio de ensayo. Se usó un anticuerpo irrelevante no dirigido a IL-13 como control negativo.
- 40 El anticuerpo de ensayo apropiado en un volumen total de 50 μ l/pocillo se añadió a las células, proporcionando en cada punto de ensayo un volumen total de ensayo de 100 μ l/pocillo. Las placas de ensayo se incubaron durante 72 horas a 37°C bajo 5% CO_2 . Se añadieron 25 μ l de timidina tritiada (10 μ Ci/ml, NEN) a cada punto de ensayo y las placas de ensayo se volvieron a poner en el incubador durante 4 horas más. Las células se recogieron en placas de filtro de fibra de vidrio (Perkin Elmer) usando un recolector celular. La incorporación de timidina se determinó usando un contador de centelleo líquido de microplacas TopCount de Packard. Los datos se analizaron usando el programa informático Graphpad Prism.

Resultados

- 50 Como se demuestra en la Figura 7, BAK502G9 (VH SEQ ID NO: 15; VL SEQ ID NO: 16) y sus derivados, BAK1183H4 (VH SEQ ID NO: 37; VL SEQ ID NO: 38) y BAK1167F2 (VH SEQ ID NO: 35; VL SEQ ID NO: 36) fueron capaces de causar una inhibición dependiente de la dosis de la proliferación celular con potencias relativas similares a las observadas en otros bioensayos. Las CI_{50} para BAK502G9, BAK1183H4, BAK1167F2 como IgG4 humana fueron 4,6

nM, 3,5 nM y 1,1 nM, respectivamente. Las CI_{50} para los anticuerpos comerciales JES10-5A2 y B-B13 fueron 10,7 nM y 16.7 nM, respectivamente.

EJEMPLO 8

Potencia de neutralización de anticuerpos principales anti-IL-13 humana frente a respuestas dependientes de IL-13 en células primarias de enfermedad relevante

Se realizaron bioensayos secundarios usando células primarias y lecturas muy relevantes para la enfermedad de las vías aéreas. Éstos incluyeron liberación de eotaxina de fibroblastos de pulmón humanos normales (NHLF) y regulación al alza de la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) en la superficie de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC). Ambas respuestas dependientes de IL-13 pueden contribuir al reclutamiento de eosinófilos, una característica del fenotipo asmático [92].

Protocolo del ensayo NHLF

Se ha mostrado que IL-13 causa la liberación de eotaxina de los fibroblastos pulmonares [77] [78] [79]. La liberación de eotaxina de NHLF dependiente de factor se determinó por ELISA.

NHLF se obtuvieron de Biowhittaker y se mantuvieron según los protocolos suministrados. El medio de ensayo fue FGM-2 (Biowhittaker). Las disoluciones de ensayo del anticuerpo (en triplicado) se diluyeron hasta la concentración deseada en medio de ensayo. Se usó un anticuerpo irrelevante no dirigido a IL-13 como control negativo. La IL-13 humana recombinante obtenida de bacterias (Peprotech) se añadió posteriormente a una concentración final de 10 ng/ml cuando se mezcló con el anticuerpo de ensayo apropiado en un volumen total de 200 μ l. La concentración de IL-13 usada en el ensayo se seleccionó como la dosis que proporcionó aproximadamente 80% de la respuesta máxima. Todas las muestras se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras de ensayo se añadieron a NHLF que se habían presembrado a una densidad de 1×10^4 células por pocillo en placas de ensayo de 96 pocillos. Las placas de ensayo se incubaron a 37°C durante 16-24 horas bajo 5% CO_2 . Las placas de ensayo se centrifugaron a 300 x g durante 5 minutos para sedimentar las células despegadas. Los niveles de eotaxina en el sobrenadante se determinaron por ELISA usando reactivos y métodos descritos por el fabricante (R&D Systems). Los datos se analizaron usando el programa informático Graphpad Prism.

Resultados

Los clones del linaje BAK278D6 fueron capaces de inhibir la liberación de eotaxina dependiente de IL-13 humana de NHLF. La potencia relativa fue similar a la observada en el ensayo de proliferación de células TF-1 (Figura 8). BAK502G9 (VH SEQ ID NO: 15; VL SEQ ID NO: 16), BAK1183H4 (VH SEQ ID NO: 37; VL SEQ ID NO: 38) y BAK1167F2 (VH SEQ ID NO: 35; VL SEQ ID NO: 36) tuvieron CI_{50} de 207 pM, 118 pM y 69 pM, respectivamente frente a 10 ng/ml de IL-13 humana. Los anticuerpos comerciales JES10-5A2 y B-B13 tuvieron CI_{50} de 623 pM y 219 pM, respectivamente.

Protocolo del ensayo HUVEC

Se ha mostrado que IL-13 regula al alza la expresión de VCAM-1 en la superficie celular de HUVEC [80, 81]. La expresión de VCAM-1 dependiente de factor se determinó por la detección de la regulación al alza de la expresión celular del receptor VCAM-1 usando una lectura de fluorescencia de tiempo resuelto.

HUVEC se obtuvieron de Biowhittaker y se mantuvieron según los protocolos suministrados. El medio de ensayo fue EGM-2 (Biowhittaker). Las disoluciones de ensayo del anticuerpo (en triplicado) se diluyeron hasta la concentración deseada en medio de ensayo. Se usó un anticuerpo irrelevante no dirigido a IL-13 como control negativo. La IL-13 humana recombinante obtenida de bacterias (Peprotech) se añadió a una concentración final de 10 ng/ml cuando se mezcló con el anticuerpo de ensayo apropiado en un volumen total de 200 μ l. La concentración de IL-13 usada en el ensayo se seleccionó como la dosis que proporcionó aproximadamente 80% de la respuesta máxima. Todas las muestras se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras de ensayo se añadieron a HUVEC que se habían presembrado a una densidad de 4×10^4 células por pocillo en placas de ensayo de 96 pocillos. Las placas de ensayo se incubaron a 37°C durante 16-20 horas bajo 5% CO_2 . El medio de ensayo se eliminó por aspiración y se reemplazó por disolución de bloqueo (PBS que contiene 4% polvo de leche seco Marvel®). Las placas de ensayo se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Los pocillos se lavaron tres veces con PBST Tween antes de que se añadieran 100 μ l (dilución 1:500 en PBST/1% Marvel®) de anticuerpo anti-VCAM-1 biotinilado (Serotec) a cada pocillo. Las placas de ensayo se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Los pocillos se lavaron tres veces con tampón de lavado Delfia (Perkin Elmer) antes de que se añadieran 100 μ l de Estreptavidina marcada con Europio o IgG1 anti-murina (dilución 1:1.000 en tampón de ensayo Delfia, Perkin Elmer) a cada pocillo. Las placas de ensayo se incubaron a RT durante 1 hora. Los pocillos se lavaron 7 veces con tampón de lavado Delfia (Perkin Elmer). Finalmente,

se añadieron 100 µl de disolución amplificadora (Perkin Elmer) a cada pocillo y la intensidad de fluorescencia se determinó usando el lector de placas Wallac 1420 VICTOR2 (protocolo de Europio Estándar). Los datos se analizaron usando el programa informático Graphpad Prism.

Resultados

- 5 Los datos típicos para BAK502G9 (VH SEQ ID NO: 15; VL SEQ ID NO: 16), BAK1183H4 (VH SEQ ID NO: 37; VL SEQ ID NO: 38) y BAK1167F2 (VH SEQ ID NO: 35; VL SEQ ID NO: 36) como anticuerpo IgG4 humano completo se muestran en la Figura 9. La potencia relativa fue similar a la observada en el ensayo de proliferación de células TF-1. Las CI_{50} para BAK502G9, BAK1183H4 y BAK1167F2 fueron 235 pM, 58 pM y 55 pM respectivamente frente a 10 ng/ml de IL-13 humana.

10 *EJEMPLO 9*

Potencia de neutralización de anticuerpos anti-IL-13 frente la regulación al alza de VCAM-1 dependiente de IL-1β e IL-4

La especificidad de los clones del linaje BAK278D6 se evaluó en una modificación del bioensayo HUVEC. Junto con IL-13, tanto IL-4 como IL-1β, han mostrado que regulan al alza la expresión de VCAM-1 en la superficie celular de HUVEC [80, 81].

15 *Protocolo del ensayo HUVEC*

El ensayo se realizó esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 5 con las modificaciones siguientes. Se usaron IL-1β e IL-4 humanas recombinantes (R&D Systems) en lugar de IL-13 humana a 0,5 ng/ml y 1 ng/ml, respectivamente y representaban la dosis que proporcionó aproximadamente 80% de la respuesta máxima.

Resultados

- 20 Ninguno de los clones evaluados del linaje BAK278D6 neutralizó la regulación al alza de VCAM-1 en respuesta a IL-1β e IL-4 humana y se demostró así su especificidad para IL-13 (Figura 10). IL-4 está más relacionada con IL-13, compartiendo el 30% de identidad de secuencia a nivel de aminoácidos [82].

EJEMPLO 10 comparativo

25 *Potencia de neutralización de BAK209B11 como una IgG4 humana en un ensayo de proliferación de células B9 murinas dependiente de IL-13 murina*

- BAK209B11, identificada como un clon neutralizante de anti-IL-13 murina como un scFv como se ha descrito en el Ejemplo 1, se reformateó como un anticuerpo IgG4 humano completo como se ha descrito en el Ejemplo 5 y se evaluó su potencia en el ensayo de proliferación de células B9 dependiente de IL-13 murina. B9 es una línea celular de hibridoma de células B murino [83]. B9 es dependiente de factor para sobrevivir y proliferar. A este respecto, las células B responden a IL-13 murina y se mantienen en medio que contiene IL-6 humana (50 pg/ml, R&D Systems). La inhibición de la proliferación dependiente de IL-13 murina se determinó midiendo la reducción de la incorporación de timidina tritiada en el ADN recién sintetizado de células en división.

Protocolo de ensayo de células B9

- 35 Las células B9 se obtuvieron de la European Collection of Animal Cell Culture ECACC y se mantuvieron según los protocolos suministrados. El ensayo se realizó esencialmente como se ha descrito para el ensayo TF-1 en el Ejemplo 2 pero con las modificaciones siguientes. El medio de ensayo comprendía RPMI-1640 con GLUTAMAX I (Invitrogen) que contiene 5% de suero fetal bovino (Hyclone) y 50 µM 2-mercaptoetanol (Invitrogen). La IL-13 murina recombinante obtenida de bacterias (Peprotech) reemplazó a la IL-13 humana con una concentración final en el ensayo de 1 ng/ml.

Resultados

- 40 BAK209B11 (VH SEQ ID NO: 25; VL SEQ ID NO: 26) como una IgG4 humana neutralizó 1 ng/ml de IL-13 murina con una CI_{50} de 776 pM en el ensayo de B9 (Figura 11). Por lo tanto, BAK209B11 representa una herramienta útil para investigar el papel de IL-13 en modelos murinos de enfermedad. Esto se demuestra claramente en el Ejemplo 12, que demuestra la eficacia de BAK209B11 en un modelo murino de inflamación pulmonar aguda.

EJEMPLO 11

45 *Determinación de la afinidad de anticuerpos anti-IL-13 por análisis BIAcore*

La afinidad de BAK502G9 (VH SEQ ID NO: 15; VL SEQ ID NO: 16), BAK1167F2 (VH SEQ ID NO: 35; VL SEQ ID NO: 36) y BAK1183H4 (VH SEQ ID NO: 37; VL SEQ ID NO: 38) para IL-13 humana y BAK209B11 (VH SEQ ID NO: 25; VL SEQ ID NO: 26) para IL-13 murina como IgG4 humana se determinaron por medidas de resonancia de plasmón superficial usando un Biosensor BIAcore 2000 (BIAcore AB) esencialmente como se describe en [72]. Brevemente, se acoplaron los anticuerpos a chips sensores CM5 usando un kit de acoplamiento de amina (BIAcore) a una densidad superficial de aproximadamente 500Ru y se pasó sobre la superficie del chip del sensor una dilución seriada de IL-13 (entre 50 nM y 0,78 nM) en tampón HBS-EP. Los sensogramas resultantes se evaluaron usando el programa informático de evaluación BIA 3.1 para proporcionar datos cinéticos.

Resultados

BAK502G9, BAK1167F2 y BAK1183H4 IgG4 unieron IL-13 humana con alta afinidad con Kd de 178 pM, 136 pM y 81 pM, respectivamente correspondiente a su potencia relativa en ensayos basados en células. BAK209B11 unió IL-13 murina con una afinidad de 5,1 nM (Tabla 3).

EJEMPLO 12 comparativo

Eficacia de BAK209B11 en un modelo murino de inflamación pulmonar alérgica aguda

Modelo murino de inflamación pulmonar alérgica aguda

El efecto de BAK209B11 (VH SEQ ID NO: 25; VL SEQ ID NO: 26), un anticuerpo IgG4 humano neutralizante anti-IL-13 murina, se investigó en un modelo murino de inflamación pulmonar alérgica aguda. Este modelo se realizó esencialmente como describen Riffo-Vasquez et al [84] y se caracteriza en su punto final por IL-13 incrementada en el lavado bronquial alveolar (BAL) (Figura 12), infiltración celular en el pulmón y BAL (Figura 13), niveles de IgE incrementados en suero e hiperrespuesta de las vías aéreas (AHR).

Protocolo del modelo

Se trataron ratones hembra Balb/C (Charles River, UK) con anticuerpo anti-IL-13 murina BAK209B11 (a dosis de 12, 36, 119 ó 357 µg) o un anticuerpo control de isotipo equivalente (dosis de 357 µg). En los días 0 y 7, se sensibilizó a los ratones de cada grupo por inyección intraperitoneal de 10 µg de ovoalbúmina (Ova) en 0,2 ml de vehículo (disolución salina que contiene 2% Al₂O₃ (Rehydrigel) como adyuvante). Un grupo control independiente de ratones no sensibilizados recibió un volumen igual del vehículo. Los ratones se pulsaron con ovoalbúmina los días 14, 15 y 16. La ovoalbúmina se diluyó a 1% (p/v) en disolución salina estéril antes de la nebulización. Todos los pulsos de inhalación se administraron en una cámara de exposición de Plexiglás. Ova se aerosolizó usando un nebulizador de Vibiss Ultraneb 2000 (Sunrise Medical) en una serie de tres exposiciones de 20 minutos separadas por intervalos de 1 hora.

BAK209B11 o una IgG4 humana irrelevante se administraron por vía intravenosa, 1 día antes del primer pulso y 2 horas antes de cada pulso posterior (4 dosis en total). El modelo terminó en el día 17, 24 horas después del pulso final. Se recogieron sangre (suero) y BAL. El suero se ensayó para IgE total. BAL se obtuvo inyectando 3 alícuotas de disolución salina (0,3 ml, 0,3 ml y 0,4 ml) y combinando las muestras. A partir de las células BAL se obtuvo leucocitos totales y recuentos de células diferenciales.

Resultados

El pulso con ovoalbúmina de ratones sensibilizados causó un incremento significativo ($p < 0,05$) en el reclutamiento total de células en BAL sobre los animales no sensibilizados pero sometidos a pulso. Este reclutamiento se inhibió de manera dependiente de la dosis con BAK209B11; se observó una inhibición significativa ($p < 0,05$) con ≥ 36 µg de BAK209B11, pero no con el anticuerpo control (Figura 13). También se observaron efectos similares en los eosinófilos (Figura 14) y neutrófilos (Figura 15) con inhibición significativa ($p < 0,05$) del influjo celular a una dosis mínima de BAK209B11 de 36 µg. Esta inhibición no se observó con el anticuerpo control. También se indujeron los linfocitos en ratones sensibilizados pero no en no sensibilizados después del pulso. Esta inducción se inhibió de manera dependiente de la dosis con BAK209B11, observándose una inhibición máxima con 36 µg de BAK209B11. El anticuerpo control no tuvo efecto (Figura 16). Aunque los monocitos/macrófagos no se indujeron en animales sensibilizados cuando se compara con animales no sensibilizados, los niveles basales disminuyeron con ≥ 36 µg de BAK209B11 pero no con anticuerpo control (Figura 17). Los niveles de IgE en suero se incrementaron significativamente en animales sensibilizados cuando se compara con no sensibilizados después del pulso ($p < 0,05$). Este incremento disminuyó después de tratamiento con 36 µg de BAK209B11 pero no con el anticuerpo control.

En resumen, la administración sistémica de BAK209B11, un anticuerpo neutralizante de IL-13 murina, pero no de anticuerpo control, inhibió el influjo de células inflamatorias y la regulación al alza de los niveles de IgE en suero causados por la sensibilización y pulso posterior con ovoalbúmina en un modelo murino de inflamación alérgica.

Los ejemplos 13 a 20 son proféticos.

EJEMPLO 13 comparativo

Eficacia de BAK209B11 en el modelo murino de LLOYD de inflamación pulmonar aguda

Modelo murino de inflamación pulmonar alérgica aguda

- 5 El efecto de BAK209B11 (VH SEQ ID NO: 25; VL SEQ ID NO: 26), un anticuerpo neutralizante anti-IL-13 murina, se investigó en un segundo modelo murino de inflamación pulmonar alérgica aguda. Este modelo se realizó esencialmente como describen McMillan et al. [85] y se caracteriza en su punto final por IL-13 incrementada en BAL y en tejido pulmonar, infiltración celular en el pulmón y BAL, niveles de IgE incrementados en suero e hiperrespuesta de las vías aéreas (AHR).
- 10 *Protocolo del modelo*
- Se administró a ratones hembra Balb/C (Charles River, UK) varias dosis de con anticuerpo anti-IL-13 murina BAK209B11 o un anticuerpo control de isotipo equivalente, como sigue. En los días 0 y 12, se sensibilizó (SN) a los ratones de cada grupo por inyección intraperitoneal de 10 µg de ovoalbúmina (Ova) en 0,2 ml de vehículo (disolución salina que contiene 2 mg de Al(OH)₃ como adyuvante [calculado como se ha descrito en el Ejemplo 12]). Un grupo control independiente de ratones no sensibilizados (NS) recibió un volumen igual del vehículo. Los ratones se pulsaron con ovoalbúmina durante 20 minutos los días 19, 20, 21, 22, 23 y 24. La ovoalbúmina se diluyó a 5% (p/v) en disolución salina antes de la nebulización. Todos los pulsos de inhalación se administraron en una cámara de exposición de Plexiglas. Ova se aerosolizó usando un nebulizador de Vilbiss Ultraneb 2000 (Sunrise Medical). En los días 18, 19, 20, 21, 22, 23, y 24 se administró a los ratones varias dosis intraperitoneales (237 µg, 23,7 µg ó 2,37 µg; indicado en la figura 21 por H, M y L) de anticuerpo anti-IL-13 murina BAK209B11 mulgG1 o un anticuerpo control de isotipo equivalente (237 µg). Se evaluó la función de las vías aéreas en los días 0 y 25 por pulsos de metacolina crecientes y se monitorizó usando pletismografía consciente (Buxco). Se estimó la CP₅₀ (concentración de metacolina requerida para incrementar el PenH de la línea base un 50%) para ratones individuales tanto en el día 0 como 25 del ajuste de las curvas de dosis respuesta de metacolina con la curva sin fijar de 4 parámetros.
- 25 El modelo terminó en el día 25, 24 horas después del pulso final. Se recogieron sangre, suero, BAL y tejido pulmonar.

Resultados

- La función pulmonar se evaluó para animales individuales en el día 0 (pre-tratamiento) y en el día 25 (post-pulso) y se cuantificó calculando los valores de CP₅₀ (concentración de metacolina requerida para incrementar el PenH de la línea base un 50%) (Figura 21A). Se determinó la hiperrespuesta de las vías aéreas (AHR) de un individuo por el cambio en log CP₅₀ en el día 25 frente al día 0 (log día 25 CP₅₀-log día 0 CP₅₀). Este logCP₅₀ delta fue el punto final primario del estudio; los datos de CP₅₀ se transformaron logarítmicamente debido a los requerimientos de ANOVA de punto final. Los cambios individuales se promediaron en los grupos para generar delta log CP₅₀ media del grupo (como se muestra en la Figura 21B).
- 30 El pulso con ovoalbúmina de ratones sensibilizados causó una AHR significativa comparada con los ratones no sensibilizados y sometidos a pulso (p<0,01). BAK209B11 causó una disminución clara y dependiente de la dosis de AHR mientras que el anticuerpo control no tuvo efecto.
- 35

EJEMPLO 14 comparativo

Eficacia de BAK209B11 en el modelo murino de Gerard de inflamación pulmonar aguda

Modelo murino de inflamación pulmonar alérgica aguda

- 40 El efecto de BAK209B11 (VH SEQ ID NO: 25; VL SEQ ID NO: 26), un anticuerpo IgG4 humano neutralizante anti-IL-13 murina, se investigó en un tercer modelo murino de inflamación pulmonar alérgica aguda. Este modelo se realizó esencialmente como describen Humbles et al. [86] y se caracteriza en su punto final por IL-13 incrementada en BAL y en tejido pulmonar, infiltración celular en el pulmón y BAL, niveles de IgE incrementados en suero e hiperrespuesta de las vías aéreas (AHR).
- 45 *Protocolo del modelo*
- Se administró a ratones hembra Balb/C (Charles River, UK) varias dosis de con anticuerpo anti-IL-13 murina BAK209B11 o un anticuerpo control de isotipo equivalente. En los días 0, 7 y 14, se sensibilizó (SN) a los ratones de cada grupo por inyección intraperitoneal de 10 µg de ovoalbúmina (Ova) en 0,2 ml de vehículo (disolución salina que contiene 1,125 mg

de $\text{Al}(\text{OH})_3$ como adyuvante [calculado como se ha descrito en el Ejemplo 12]). Un grupo control independiente de ratones no sensibilizados (NS) recibió un volumen igual del vehículo. Los ratones se pulsaron con ovoalbúmina durante 20 minutos los días 21, 22, 23 y 24. La ovoalbúmina se diluyó a 5% (p/v) en disolución salina antes de la nebulización. Todos los pulsos de inhalación se administraron en una cámara de exposición de Plexiglás. Ova se aerosolizó usando un nebulizador de Vilbiss Ultraneb 2000 (Sunrise Medical).

El modelo terminó en el día 25, 24 horas después del pulso. Se recogieron sangre, suero, BAL y tejido pulmonar.

EJEMPLO 15 comparativo

Eficacia de BAK209B11 en el modelo de Lloyd de inflamación pulmonar crónica

Modelo murino de inflamación pulmonar alérgica crónica

- 10 El efecto de BAK209B11 (VH SEQ ID NO: 25; VL SEQ ID NO: 26), un anticuerpo IgG4 humano neutralizante anti-IL-13 murina, se investigó en un modelo de inflamación pulmonar alérgica crónica. Este modelo se realizó esencialmente como describen Temelkovski et al. [87] y se caracteriza en su punto final por infiltración celular en el pulmón y BAL, niveles de IgE incrementados en suero e hiperrespuesta de las vías aéreas (AHR).

Protocolo del modelo

- 15 Se dosificaron ratones hembra Balb/C (Charles River, UK) con varias dosis de anticuerpo anti-IL-13 murina BAK209B11 o un anticuerpo control de isotipo equivalente. En los días 0 y 11, se sensibilizó (SN) a los ratones de cada grupo por inyección intraperitoneal de 10 μg de ovoalbúmina (Ova) en 0,2 ml de vehículo (disolución salina que contiene 2 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$ como adyuvante [calculado como se ha descrito en el Ejemplo 12]). Un grupo control independiente de ratones no sensibilizados (NS) recibió un volumen igual del vehículo. Los ratones se pulsaron con ovoalbúmina durante 20 minutos los días 18, 19, 20, 21, 22, 23, 28, 30, 32, 35, 37, 39, 42, 44, 46, 49 y 51. La ovoalbúmina se diluyó a 5% (p/v) en disolución salina antes de la nebulización. Todos los pulsos de inhalación se administraron en una cámara de exposición de Plexiglás. Ova se aerosolizó usando un nebulizador de Vilbiss Ultraneb 2000 (Sunrise Medical).

El modelo terminó en el día 52, 24 horas después del pulso. Se recogieron sangre, suero, BAL y tejido pulmonar.

EJEMPLO 16

- 25 *Eficacia de anticuerpos anti-IL-13 humana frente a IL-13 humana exógena administrada al modelo murino de la bolsa de aire*

El efecto de anticuerpos anti-IL-13 humana en la acción proinflamatoria de IL-13 humana se investigó en un modelo murino básico. Este modelo se realizó esencialmente como describen Edwards et al [93] y se caracterizó en su punto final por la infiltración celular en la bolsa de aire.

- 30 *Protocolo del modelo*

Se creó una bolsa de aire en la espalda de ratones hembra Balb/C por inyección subcutánea de 2,5 mL de aire estéril en el día 0. La bolsa de aire se reinfloó con otros 2,5 mL de aire estéril en el día 3. Se inyectaron 2 μg de huIL-13 en 0,75% CMC directamente en la bolsa en el día 6. 24 horas después los ratones se sacrificaron y la bolsa de aire se lavó con 1 mL de disolución salina heparinizada. Los tratamientos con anticuerpo se proporcionaron con la huIL-13 (en la bolsa) o se proporcionaron sistémicamente.

Resultados

La IL-13 humana, inyectada en la bolsa de aire (i.po.), causó una infiltración significativamente incrementada de leucocitos totales ($p < 0,01$) y eosinófilos ($p < 0,01$) a las 24 horas después del pulso frente a ratones tratados con vehículo (0,75% carboximetil celulosa (CMC) en disolución salina i.po.).

- 40 BAK502G9 administrado localmente (200 mg, 20 mg ó 2 mg intrabolsa) inhibió significativamente y de manera dependiente de la dosis la infiltración total de leucocitos ($p < 0,01$) y eosinófilos ($p < 0,01$) en la bolsa de aire causada por 2 μg de huIL-13 en 0,75% CMC. BAK209B11 administrado sistémicamente (30 mg/kg, 10 mg/kg y 1 mg/kg) también inhibió significativamente y de manera dependiente de la dosis la infiltración total de leucocitos ($p < 0,01$) y eosinófilos ($p < 0,01$) en la bolsa de aire causada por 2 μg de huIL-13 en 0,75% CMC.

- 45 *EJEMPLO 17*

Generación de ratones transgénicos con IL-13 humana activada / IL-13 murina inactivada para los propósitos de evaluar la eficacia de anticuerpos anti-IL-13 humana en modelos de inflamación alérgica pulmonar

Los presentes inventores han generado ratones que expresan IL-13 humana en lugar de murina por direccionamiento génico. El gen de IL-13 de ratón se ha reemplazado desde el codón de inicio hasta el de parada con la parte relevante del gen de IL-13 humana. Esta cepa de ratón expresa la IL-13 humana en lugar de la IL-13 de ratón en respuesta al mismo estímulo que en el ratón de tipo salvaje, ya que el promotor de IL-13 endógeno y la cola IL-13 pA permanecen inalterados. Se ha mostrado que la IL-13 humana puede unirse a y señalar a través de los receptores de IL-13 de ratón para generar las mismas consecuencias fisiológicas que la señalización causada por la unión de la IL-13 de ratón a los receptores de IL-13 de ratón. Por ejemplo, la IL-13 humana exógena causó el reclutamiento de células inflamatorias en la bolsa de aire murina (Figura 18). Estos animales transgénicos nos permiten evaluar la reactividad cruzada no murina de anticuerpos anti-IL-13 humana en modelos murinos establecidos de enfermedad.

EJEMPLO 18

Eficacia de anticuerpos anti-IL-13 humana en el modelo murino de LLOYD transgénico hIL-13 de inflamación pulmonar aguda

Modelo murino de inflamación pulmonar alérgica aguda

El efecto de anticuerpos neutralizantes IgG4 humanos anti-IL-13 humana se investigó en un modelo murino de inflamación pulmonar alérgica aguda usando los ratones transgénicos generados en el ejemplo 17. Este modelo se realizó esencialmente como describen McMillan et al. [85] y el ejemplo 13. El modelo se caracteriza en su punto final por IL-13 incrementada en BAL y en tejido pulmonar, infiltración celular en el pulmón y BAL, niveles de IgE incrementados en suero e hiperrespuesta de las vías aéreas (AHR).

Protocolo del modelo

El protocolo para este modelo fue como se ha descrito en el Ejemplo 13 excepto en que se dosificaron anticuerpos anti-IL-13 humana en lugar de BAK209B11.

EJEMPLO 19

Eficacia de anticuerpos anti-IL-13 humana en el modelo murino de Gerard transgénico hIL-13 de inflamación pulmonar aguda

Modelo murino de inflamación pulmonar alérgica aguda

El efecto de anticuerpos neutralizantes IgG4 humanos anti-IL-13 humana se investigó en otro modelo murino de inflamación pulmonar alérgica aguda usando los ratones transgénicos generados en el ejemplo 17. Este modelo se realizó esencialmente como describen Humbles et al. [86] y el ejemplo 14. El modelo se caracteriza en su punto final por IL-13 incrementada en BAL y en tejido pulmonar, infiltración celular en el pulmón y BAL, niveles de IgE incrementados en suero e hiperrespuesta de las vías aéreas (AHR).

Protocolo del modelo

El protocolo para este modelo fue como se ha descrito en el Ejemplo 14 excepto en que se dosificaron anticuerpos anti-IL-13 humana en lugar de BAK209B11.

EJEMPLO 20

Eficacia de anticuerpos anti-IL-13 humana en el modelo murino de LLOYD transgénico hIL-13 de inflamación pulmonar crónica

El efecto de anticuerpos neutralizantes IgG4 humanos anti-IL-13 humana se investigó en un modelo de inflamación pulmonar alérgica crónica usando los ratones transgénicos generados en el ejemplo 17. Este modelo se realizó esencialmente como describen Temelkovski et al. [87] y en el Ejemplo 15 y se caracteriza en su punto final por infiltración celular en el pulmón y BAL, niveles de IgE incrementados en suero e hiperrespuesta de las vías aéreas (AHR).

Protocolo del modelo

El protocolo para este modelo fue como se ha descrito en el Ejemplo 15 excepto en que se dosificaron anticuerpos anti-IL-13 humana en lugar de BAK209B11.

EJEMPLO 21

Farmacocinética y farmacodinámica de anticuerpos anti-IL-13 humana en monos cynomolgus alérgicos a Ascaris.suum

- 5 La farmacocinética y farmacodinámica de 502G9 se evaluaron en 4 primates cynomolgus alérgicos pero no sometidos a pulso (2 machos/2 hembras) después de una única dosis de bolo 10 mg/kg i.v. El experimento se corrió durante 29 días. Los parámetros farmacocinéticos del anticuerpo se determinaron a partir de una curva de media geométrica de suero-concentración de fármaco y se detallan a continuación en la Tabla 4.
- 10 En el mismo estudio las concentraciones de IgE en el suero también se siguieron usando un kit ELISA de IgE humana (Bethyl Laboratories, EEUU).

Resultados

- 15 Las concentraciones de IgE en suero se redujeron significativamente después de una única dosis en bolo de 10 mg/kg i.v. de BAK502G9, desde niveles de 100% control (predosis) hasta $66 \pm 10\%$ de los valores control ($p < 0,05$) a los 4 y 5 días después de la dosificación. Esta disminución de la concentración de IgE en suero se recuperó hasta $88 \pm 8\%$ de los niveles control en el día 22 (véase la Figura 20). De nuevo, estos datos se obtuvieron normalizando cada concentración de IgE en suero de los animales hasta niveles predosis, en los que las concentraciones predosis fueron 100% y promediando las curvas de los 4 animales ensayados.

- 20 Los dos monos macho tuvieron una IgE en suero total predosis relativamente baja (60 ng/mL y 67 ng/mL). Estos niveles de IgE no cambiaron de una manera que sugiriera una tendencia después del tratamiento con BAK502G9 (Figura 20B). Los dos monos hembra tuvieron una IgE en suero total predosis relativamente alta (1.209 ng/mL y 449 ng/mL). Estos niveles de IgE disminuyeron después del tratamiento con BAK502G9, máximamente un 60% a los días 7 y volvieron aproximadamente a los niveles predosis a los 28 días después de la administración (Figura 20B). Estos datos proporcionan una indicación de que BAK502G9 disminuye las concentraciones de IgE en suero en animales con una IgE circulante relativamente alta.

25 EJEMPLO 22

Eficacia de anticuerpos anti-IL-13 humana en modelos de cynomolgus de alergia dérmica

- 30 Los efectos de anticuerpos neutralizantes IgG4 humanos anti-IL-13 humana se investigaron en un modelo de primate de inflamación dérmica alérgica aguda. Este modelo se realizó inyectando IL-13 humana y antígeno A.suum por vía intradérmica en monos cynomolgus. 24-96h después, se tomaron biopsias dérmicas y muestras de suero. El modelo se caracterizó en su punto final por la infiltración celular en la piel.

EJEMPLO 23

Eficacia de anticuerpos anti-IL-13 humana en modelos de cynomolgus de alergia pulmonar

- 35 El efecto de anticuerpos neutralizantes IgG4 humanos anti-IL-13 humana se investigaron en un modelo de primate de inflamación pulmonar alérgica aguda. Este modelo se realizó exponiendo primates cynomolgus alérgicos a *a.suum* a antígeno *a.suum* nebulizado, generando de esta manera una reacción alérgica. Esta alergia se caracterizó en su punto final por la infiltración celular en el pulmón y BAL, niveles de IgE incrementados en suero e hiperrespuesta de las vías aéreas.

- 40 Adicionalmente, se evaluó la farmacodinámica *ex vivo* usando un método de citometría de flujo. CD23 es el receptor de alta afinidad de IgE y puede expresarse en células mononucleares de sangre periférica humana. La expresión de CD23 puede inducirse, en términos de número de células que expresan CD23 y también la cantidad de CD23 que expresa cada célula tanto con IL-13 como IL-4. La respuesta mediada por IL-13 pero no IL-4 puede inhibirse por anticuerpos anti-IL-13 humana.

- 45 Los animales se preseleccionaron para entrar en este estudio de fase 2 tomando como base la AHR establecida previamente después del pulso con el antígeno nebulizado (extracto de *ascaris suum*). En la fase I, se evaluó la función de las vías aéreas durante un pulso con histamina intravenosa en los días 1 y 11. Se determinó la CP₃₀, la dosis de histamina requerida para generar un incremento de 30% en la resistencia pulmonar (R_L) por encima de la línea base, de cada curva de dosis respuesta de histamina. En los días 9 y 10, los animales se pulsaron con dosis determinadas individualmente de antígeno nebulizado que previamente mostraron que generaban un incremento de 40% en R_L así como una disminución de 35% en el cumplimiento dinámico (C_{DYN}). Históricamente, en este modelo, se ha observado

una R_L mayor después del segundo pulso con una dosis dada de alérgeno que el primero; esto es el cebado de antígeno. Los dos pulsos de antígeno causaron AHR, como se mide por un área incrementada bajo la curva de dosis respuesta de histamina y/o una disminución en CP_{30} y BAL, así como eosinofilia en el día 11 comparado con el día 1. Los animales que presentaban un fenotipo AHR se seleccionaron para entrar en la fase II.

- 5 La fase II se realizó exactamente como la fase I excepto que todos los animales recibieron una infusión de 30 mg/kg de BAK502G9 en los días 1, 5 y 9. Los efectos de BAK502G9 se evaluaron comparando los cambios observados en la fase II con los cambios observados en la fase I para animales individuales.

Se recogieron sangre, suero, BAL y tejido pulmonar. Los niveles de IgE en suero se monitorizaron por ELISA. El suero de monos cynomolgus tratados con BAK502G9 inhibía la expresión de CD23 en células mononucleares de sangre periférica humana inducida por IL-13 pero no IL-4. La magnitud de esta inhibición fue consistente con los niveles de BAK502G9 en suero predichos por PK ELISA.

Resultados

BAK502G9 inhibió significativamente AHR como se midió por R_L AUC ($p < 0,05$) (Figura 26A; Tabla 7). Se observó un efecto inhibidor de BAK502G9 en AHR, medido por CP_{30} , pero no alcanzó una significancia estadística (Figura 26B; Tabla 7). BAK502G9 también inhibió significativamente tanto el cebado de antígeno ($p < 0,01$) (Figura 26C; Tabla 7) como la inflamación BAL. BAK502G9 inhibió significativamente el flujo de células total ($p < 0,05$) y eosinófilos ($p < 0,05$) pero no de macrófagos, linfocitos o mastocitos en el BAL (Figura 26D; Tabla 7).

EJEMPLO 24

Eficacia de anticuerpos anti-IL-13 humana frente al fenotipo asmático que se desarrolla cuando se administra IL-13 humana al pulmón de ratón

Modelo murino de hiperrespuesta de las vías aéreas

Se investigó la eficacia del anticuerpo neutralizante anti-IL-13 humana BAK502G9, frente al desarrollo de hiperrespuestas de las vías aéreas (AHR) después de la administración de IL-13 humana al pulmón del ratón. Este modelo se realizó esencialmente como describen Yang et al [119] con la excepción de que se usó IL-13 humana en lugar de IL-13 murina.

Protocolo del modelo

Para desarrollar el fenotipo, ratones macho BALB/c se expusieron a dos dosis de IL-13 humana separadas por un intervalo de 48 horas. Brevemente, los ratones se anestesiaron con una inyección intravenosa de 100 μ l de disolución de safran (diluida 1:4 en agua). Los ratones se intubaron con una aguja de catéter de calibre 22, a través del cual se instiló IL-13 recombinante humana (25 μ g disuelta en 20 μ l de disolución salina tamponada con fosfato (PBS)) o vehículo control (PBS). La función de las vías aéreas se evaluó 24 horas después de la última administración de IL-13 incrementando los pulsos de metacolina y monitorizando usando pletismografía consciente (Buxco). Se determinó CP_{200} (concentración de metacolina requerida para incrementar penH de la línea base un 200%) a partir del ajuste de las curvas de dosis respuesta de metacolina con la curva sin fijar de 4 parámetros. Los tratamientos de anticuerpo se administraron por inyección intraperitoneal 24 horas antes de cada dosis de IL-13.

Resultados

La instalación intratraqueal de IL-13 humana en ratones de tipo salvaje sin estimular resultó en el desarrollo de hiperrespuestas de las vías aéreas significativas ($p < 0,05$) respecto a los animales control según se determinó por las concentraciones de metacolina CP_{200} . BAK502G9 administrado sistémicamente (1 mg/kg) inhibió significativamente ($p < 0,01$) el desarrollo de AHR mientras que el anticuerpo control nulo no tuvo efecto (Figura 23).

EJEMPLO 25

Potencia de neutralización de BAK502G9 como IgG4 humana frente a IgE liberada dependiente de IL-13 de células B humanas

Protocolo de ensayo de cambio de células B

Se ha mostrado que IL-13 induce la síntesis de IgE en células B humanas *in vitro* [120]. La liberación de IgE dependiente de factor de células B humanas se determinó por ELISA. La potencia de neutralización de BAK502G9 como una IgG4 humana se evaluó frente a la liberación de IgE dependiente de IL-13 humana de células B humanas.

Se purificaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de la capa leuco-plaquetaria humana (Blood Transfusion Service) por centrifugación sobre un gradiente de densidad de 1,077 g/L. Las células B se purificaron de PBMC con un kit de aislamiento de células B II (Miltenyi Biotec), usando reactivos y métodos descritos por el fabricante. El medio de ensayo comprendió medio Dulbecco modificado por Iscoves (Life Technologies) que contiene 10% de suero fetal bovino y 20 µg/mL de transferrina humana (Serologicals Proteins Inc). Después de la purificación, las células B se resuspendieron hasta una concentración final de 10⁶/mL en medio de ensayo. Se añadieron 50 µL de células resuspendidas a cada punto de ensayo en una placa de ensayo de 96 pocillos. Se añadieron 50 µL de 4 µg/mL del anticuerpo anti-CD40 EA5 (Biosource) a los pocillos de ensayo según era apropiado. Las diluciones de ensayo de los anticuerpos (seis réplicas) se diluyeron hasta la concentración deseada en medio de ensayo. Como control negativo se usó un anticuerpo irrelevante no dirigido a IL-13. Se añadieron 50 µL/pocillo del anticuerpo de ensayo apropiado a las células. Se añadió posteriormente IL-13 humana recombinante obtenida de bacterias (Peprotech) hasta una concentración final de 30 ng/mL para proporcionar un volumen total de ensayo de 200 µL/pocillo. La concentración de IL-13 usada en el ensayo se seleccionó para proporcionar una respuesta máxima. Las placas de ensayo se incubaron durante 14 días a 37°C bajo 5% de CO₂. Los niveles de IgE en el sobrenadante se determinaron por ELISA usando los reactivos y protocolos suministrados por el fabricante (BD Biosciences, Bethyl Laboratories). Los datos se analizaron usando el programa informático Graphpad prism.

Resultados

Como se demuestra en la Figura 24, BAK502G9 (VH SEQ ID NO: 15; VL SEQ ID NO: 16) fue capaz de inhibir la producción de IgE dependiente de IL-13 humana por las células B humanas. BAK502G9 como IgG4 humana tuvo una CI₅₀ de 1,8 nM frente a 30 ng/mL de IL-13 humana.

EJEMPLO 26

Eficacia de BAK502G9 frente a la potenciación de la señalización de Ca²⁺ inducida por histamina mediada por IL-13 en células de músculo liso bronquiales primarias humanas

Se ha mostrado que IL-13 modula directamente la contractibilidad del músculo liso de las vías aéreas [121, 122]. La movilización de calcio intracelular es un pre-requisito para la contracción del músculo liso. Estudios recientes han mostrado que la capacidad de IL-13 para alterar la contractibilidad del músculo liso está mediada en parte por la modulación del agonista contráctil inducido por la señalización de Ca²⁺ [123, 124].

La eficacia de BAK502G9, un anticuerpo anti-IL-13 humana formateado como una IgG4, frente a las alteraciones mediadas por IL-13 en las respuestas de señalización de células del músculo liso bronquiales (BSMC) primarias humanas al agonista contráctil histamina se investigó en un ensayo de señalización de Ca²⁺.

Protocolo del ensayo de señalización de Ca²⁺ en BSMC

BSMC primarias humanas, El medio 2 de Crecimiento de Músculo Liso (SmGM-2) y el Medio Basal de Músculo Liso (SmBM) se obtuvieron de Bio Whittaker. Las BSMC se mantuvieron en SmGM-2 según las recomendaciones del proveedor. Las BSMC se plaquearon a 2 x 10⁴ células/pocillo en una placa de cultivo celular de microtitulación de 96 pocillos y se dejó que se pegaran durante 24 horas, después se realimentaron y se incubaron durante 24 horas más. Antes del experimento de señalización de Ca²⁺, las BSMC se estimularon con IL-13 (Peprotech) a 50 ng/mL concentración final sin o con anticuerpo y se incubaron durante 18-24 horas. BAK502G9 y un anticuerpo monoclonal control irrelevante con isotipo equivalente, CAT-001, se evaluaron a una concentración final de 10 µg/mL. Los cambios en las concentraciones intracelulares de Ca²⁺ en respuesta a la histamina (Calbiochem), titulada de 20 µM, se midieron usando técnicas estándar con el marcador sensible a Ca²⁺ Fluo-4 (Molecular Probes) y un Lector de Placas de Imagen de Fluorescencia (FLIPR) de 96 pocillos (Molecular Devices). El área bajo la curva (AUC) de la respuesta de señalización de Ca²⁺ a histamina se determinó para cada condición de pre-tratamiento celular. Los análisis de los datos se realizaron usando GraphPad Prism versión 4 para Windows (Programa Informático GraphPad).

Resultados

La pre-incubación de BSMC con IL-13 incrementó significativamente la señalización de Ca²⁺ en respuesta a histamina. La pre-incubación de BAK502G9 (Figura 25B) (pero no un anticuerpo control de isotipo irrelevante) (Figura 25A)) con IL-13 inhibió significativamente la potenciación de la señalización de Ca²⁺ en respuesta a histamina (Figura 25).

EJEMPLO 27

Potencia de neutralización de anticuerpos anti-IL-13 en un ensayo de expresión de CD23 en PBMC dependiente de IL-13 humana

La potencia de un anticuerpo representativo IL-13 se evaluó en el sistema de expresión de CD23 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) dependiente de IL-13 humana. PBMC responden tanto a IL-13 como IL-4 incrementando la expresión en la superficie celular de CD23 [120]. CD23 (FceRII) es el receptor de baja afinidad para IgE y se expresa en varias células inflamatorias, incluyendo monocitos. La inhibición de la regulación al alza de la expresión de CD23 dependiente de IL-13 humana se determinó midiendo la reducción de la unión del anticuerpo monoclonal CD23 marcado con fluorescencia a PBMC por citometría de flujo.

Protocolo del ensayo

Se obtuvo sangre humana del Blood Transfusion Service y los eritrocitos se eliminaron por sedimentación de 40 minutos con dextrano-T500 (Pharmacia) (0,6% concentración final). La fracción rica en leucocitos y plaquetas se separó por una centrifugación de 20 minutos a 1.137 g en un gradiente Percoll discontinuo de 3 mL 64% y 5 mL 80% (100% fue 9 partes de Percoll y 1 parte 10xPBS). Las PBMC se recogieron de la parte superior de la capa 64%, se lavaron y se resuspendieron en tampón de ensayo (Invitrogen RPMI 1640, 10% FCS, 200UI/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina, 2 mM L-Glutamina). El ensayo se realizó en placas de 24 pocillos con 2×10^6 células, $\pm$ 80 pM IL-13 recombinante humana (Peprotech) ó 21 pM IL-4 recombinante humana (R&D Systems), $\pm$ BAK502G9 o IgG4 irrelevante, en un volumen final de 500 µL. Las células se cultivaron durante 48 h a 37°C antes de recogerlas y tñirlas con CD23-PE (BD Pharmingen) durante 20 minutos a 4°C. Finalmente, las células se leyeron en un citómetro de flujo. La expresión de CD23 se determinó por "puntuación" de CD23; porcentaje de células positivas para CD23 multiplicado por el "brillo" de la tñición (fluorescencia media geométrica). No se restó ninguna "puntuación" estimulante de CD23 y los datos se presentan como porcentaje de la respuesta a IL-13 sola (100%). Los datos se han expresado como la media $\pm$ SEM obtenida de 4-6 experimentos independientes, usando células de 4-6 donantes individuales, realizados en triplicado para cada punto.

Resultados

La incubación de PBMC con 80 pM de IL-13 ó 21 pM de IL-4 durante 48 horas resultó en una expresión clara de CD23 (Figura 27 y Figura 28). BAK502G9 inhibió de manera dependiente de la dosis la expresión de CD23 inducida por IL-13 con una media geométrica de 120,2 pM (Figura 27). Por el contrario, BAK502G9 no fue capaz de inhibir la expresión de CD23 inducida por 21,4 pM de IL-4 ($n=4$ de donantes individuales, Figura 28). La IgG4 irrelevante no inhibió la expresión de CD23 dependiente de IL-13 ni la de IL-4 en PBMC (Figura 27 y Figura 28). La co-estimulación de PBMC con 80 pM de IL-13 y 21,4 pM de IL-4 produjo una respuesta CD23 aditiva. BAK502G9, pero no CAT-001, redujo los niveles de expresión de CD23 hasta los observados con la estimulación de IL-4 sola (Figura 28).

EJEMPLO 28

Potencia de neutralización de un anticuerpo IL-13 humana en un ensayo de cambio de forma de eosinófilos dependiente de IL-13 humana

Los objetivos de este estudio fueron evaluar el efecto de anticuerpos IL-13 sobre el cambio de forma de eosinófilos inducido por los mediadores liberados de NHLF después de la estimulación con factores encontrados en los pulmones de asmáticos tales como IL-13 [125, 126], TNF- α [127], TGF- β 1 [128]. IL-13 actúa de manera sinérgica con TNF- α [129] o TGF- β 1 [130] para inducir fibroblastos para producir eotaxina-1 que puede actuar para quimioatraer directamente eosinófilos. Las respuestas de cambio de forma de leucocitos están mediadas por reorganizaciones del citoesqueleto celular y son esenciales para los procesos de migración de leucocitos desde la microcirculación a sitios de inflamación. La inhibición de la liberación de factor que induce el cambio de forma dependiente de IL-13 por NHLF se determinó midiendo la reducción de la secreción de eotaxina-1 por ELISA y la reducción del cambio de forma de eosinófilos por citometría de flujo.

Protocolo del ensayo

Las células NHLF se cocultivaron con medio solo o medio que contiene estimulantes (9,6 nM IL-13, 285,7 pM TNF- α (R&D Systems) y 160 pM TGF- β 1 (R&D Systems) en ausencia o presencia de BAK502G9 (intervalo de concentración 875 nM-6,84 nM). Las células se cultivaron durante 48 h más a 37°C antes de aspirar el medio condicionado resultante y almacenarlo a -80°C. La concentración de eotaxina-1 en el medio condicionado se evaluó usando el sistema ELISA DuoSet de R&D Systems (R&D Systems).

Se obtuvo sangre humana del Blood Transfusion Service y los eritrocitos se eliminaron por sedimentación de 40 minutos con dextrano-T500 (Pharmacia) (0,6% concentración final). La fracción rica en leucocitos y plaquetas se separó por una centrifugación de 20 minutos a 1.137 g en un gradiente Percoll discontinuo de 3 mL 64% y 5 mL 80% (100% fue 9 partes de Percoll y 1 parte 10xPBS). Los granulocitos se recogieron de la interfase 64%:80%, se lavaron y se resuspendieron en tampón de ensayo (Sigma PBS, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 10 mM D-glucosa, 0,1% Sigma BSA, pH 7,3). El ensayo se realizó en tubos FACS con 5×10^5 células, $\pm$ 3 nM eotaxina-1 recombinante humana (R&D Systems) o

medio condicionado, en un volumen final de 400 μ L. Las células se incubaron durante 8,5 minutos a 37°C antes de transferirlas a 4°C y fijarlas con un agente de fijación (CellFix, BD Biosciences) y finalmente leerlas en un citómetro de flujo. Los eosinófilos se identificaron por su autofluorescencia FL-2 y la lectura del parámetro de dispersión frontal (FSC), El FSC de eosinófilos cambió en respuesta tanto a eotaxina-1 como a medio condicionado proporcionando una medida del cambio de forma. Los tubos se muestrearon a una velocidad de flujo alta y la adquisición terminó después de 1.000 eventos de eosinófilos ó 1 minuto, lo que ocurriera antes. El cambio de forma se calculó como un porcentaje del FSC causado por cambio de forma con el tampón solo (100% blanco cambio de forma). Los datos se han expresado como la media % blanco cambio de forma $\pm$ SEM obtenido de 4 experimentos independientes. Cada experimento usó células de la placa leuco-plaquetaria de un individuo (y por lo tanto donante individual), realizado en duplicado para cada punto.

Resultados

Las células NHLF coestimuladas con 9,6 nM de IL-13, 285,7 pM de TNF- α y 160 pM de TGF- β 1 y cultivadas durante 48 h secretaron 9,6 nM de eotaxina-1 en el medio de cultivo. Por el contrario, las células NHLF cultivadas sólo con medio de mantenimiento secretaron 0,1 nM de eotaxina-1 en el medio de cultivo. Esta producción de eotaxina-1 fue dependiente de IL-13 ya que la producción de eotaxina-1 por las células NHLF coestimuladas por IL-13/TNF- α /TGF- β 1 se inhibió de manera dependiente de la dosis con BAK502G9 con una CI_{50} de 32,4 nM (Figura 29A).

El objetivo principal de esta parte del estudio fue examinar el cambio de forma de los eosinófilos. La magnitud del cambio de forma de los eosinófilos en respuesta a 3 nM de eotaxina (control positivo) fue 122,2 $\pm$ 2,1% (n=4). El cambio de forma inducido por eotaxina-1 se inhibió completamente con 100 nM de un anticuerpo anti-eotaxina CAT-213, cambio medio de forma 101,0 $\pm$ 1,0% (n=4).

El medio de las células NHLF coestimuladas con 9,6 nM de IL-13, 285,7 pM de TNF- α y 160 pM de TGF- β 1 y cultivadas durante 48 h (medio condicionado) indujo un cambio claro de forma de los eosinófilos (Figura 29B). Por el contrario, el medio de NHLF cultivadas durante 48 h en medio de mantenimiento de NHLF solo no indujo cambio en la forma de los eosinófilos (Figura 29B).

La adición de anticuerpo anti-IL-13 BAK502G9 a medio coestimulado antes del cultivo de NHLF, resultó en una inhibición dependiente de la dosis del cambio de forma de los eosinófilos, con una media geométrica de CI_{50} de 16,8 nM cuando se ensayó a una dilución 1:16 (Figura 29B).

La capacidad de los estimulantes (IL-13, TNF- α y TGF- β 1) no cultivados con las células NHLF para inducir el cambio de forma de eosinófilos y neutrófilos también se investigó. 9,6 nM de IL-13, 285,7 pM de TNF- α y 160 pM de TGF- β 1 no indujo un cambio claro de forma de los eosinófilos. Esto sugiere que la capacidad de cambiar la forma de los eosinófilos del medio condicionado que se desarrolla durante el cultivo de las células NHLF con los estimulantes no se debe a ninguno de los estimulantes solo o en combinación (Figura 29B).

Ejemplo 29

Mapeo de anticuerpos anti-IL-13 en IL-13 Humana

El mapeo de epítomos de un anticuerpo IL-13 representativo BAK502G9 se realizó usando un método molecular y escisión peptídica estándar.

Método Molecular

Se prepararon por ingeniería quimeras de IL-13, en las que partes de la secuencia de IL-13 humana se reemplazaron por secuencia murina. Estas quimeras se usaron en estudios de unión con anticuerpos representativos IL-13 para ayudar en la identificación del epítomo específico.

Se produjeron dos paneles de quimeras de IL-13. El primer panel contenía nueve quimeras (Figura 30) y se usó para localizar la posición general del epítomo. El segundo panel contenía diez quimeras (Figura 31) y se usó para mapear más fino el epítomo.

Las secuencias de quimeras de IL-13 se ensamblaron usando PCR y se clonaron en un vector de entrada Gateway®, que se recombinó con un vector de destino pDEST8 (modificado para codificar una etiqueta de detección y afinidad en el extremo C de la proteína recombinante). Estos vectores de expresión se usaron para transformar *E. coli* DH10Bac™ químicamente competentes lo que permite la transposición específica de sitio de IL-13 química etiquetada, en el vector de transposición de baculovirus (bácmido). El ADN de bácmido recombinante se aisló para cada quimera de IL-13 y se transfectó en células de insecto Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) usando Reactivo Cellfectin®. Los baculovirus recombinantes se recogieron 72 horas después de la transfección y se pasaron a través células de insecto Sf9 dos veces más.

2.000 -500 ml del sobrenadante del cultivo de insectos se purificaron en una columna de afinidad y el material eluido se concentró de 16 a 1 ml y se cargó en una columna de exclusión por tamaño Superdex 200 HR10/300GL para un pulido final e intercambio de tampón.

Se desarrolló un ensayo de competición homogéneo usando IL-13 humana biotinilada, estreptavidina-antofiocinato y BAK502G9 marcado con Europio. El ensayo es como sigue: Eu-BAK502G9 se une a la IL-13 humana biotinilada, el complejo es reconocido por el conjugado estreptavidina APC y cuando un flash de luz se aplica la energía se transfiere desde el marcaje APC al Europio por proximidad, y puede medirse la fluorescencia en tiempo resuelto. La competición para esta unión se introduce mediante la IL-13 humana no marcada (como control) y las construcciones quiméricas. Esta competición se cuantifica para calcular las afinidades relativas de los mutantes de IL-13 para los anticuerpos IL-13 permitiendo la identificación de las mutaciones que alteran la unión.

Resultados

Se encontró que la construcción quimérica IL-13-HéliceD (Tabla 5) era el competidor más débil frente a IL-13 humana biotinilada para unir BAK502G9, lo que indica que la héliceD en la molécula de IL-13 estaba implicada con la unión de BAK502G9 al epítipo (Tabla 5). También se observó una actividad reducida para los mutantes 4041 y 3334 en los que los restos 40, 41 y 33, 34 de la secuencia parental respectivamente se cambiaron lo que indica la implicación potencial de la hélice A en el reconocimiento de BAK502G9. Las actividades reducidas del bucle3 se descontaron ya que este bucle tiene un número reducido de aminoácidos en el mutante comparado con la molécula humana y probablemente altere la estructura global de la proteína. Otras reducciones en la capacidad de las moléculas de IL-13 quiméricas para competir para la unión con BAK502G9 no se consideraron significativas para tales cambios de aminoácidos.

Se ensayó un conjunto de mutaciones más dirigidas en la héliceD (Figura 26). Los resultados obtenidos se demuestran en la Tabla 6 y son como sigue:

Los resultados muestran que las construcciones quiméricas 116117TK (en la que la lisina en la posición 116 se reemplazó por treonina y el aspartato en la posición 117 se reemplazó por lisina), 123KA (en la que se reemplazó la lisina en la posición 123) y 127RA (en la que se reemplazó la arginina en la posición 127) son las menos capaces de competir para la unión a BAK502G9 (123KA y 127RA no compiten a 1 μ M). Otros restos implicados en la unión a BAK502G9 debido a su reducida eficacia en el ensayo de competición incluyen los restos de la héliceD 124Q (aquí la lisina se ha reemplazado por glutamina) y 120121SY (un par leucina histidina se ha cambiado a un par serina tirosina). La mutación de leucina en la posición 58L también reduce la unión y el análisis de las estructuras 3D reveló que este resto se empaqueta frente a la héliceD y puede contactar directamente con BAK502G9 o puede afectar el alineamiento de la héliceD.

Estos experimentos demuestran que los restos en la héliceD son críticos para la unión de BAK502G9 a IL-13. En particular, la lisina en la posición 123 y la arginina en la posición 127 son críticos para esta unión porque la mutación de cualquiera de ellos anula la unión de BAK502G9.

Escisión del Epítipo

El mapeo del epítipo de BAK502G9 también se realizó usando el procedimiento de escisión peptídico estándar. Aquí, se inmoviliza IgG en fase sólida y se deja que capture el ligando IL-13. El complejo formado se somete a digestión proteolítica específica, durante la cual se escinden los enlaces peptídicos accesibles, sin embargo los protegidos por la interfase IgG:ligando permanecen intactos. Así, un péptido que contiene el epítipo permanece unido a la IgG. Éste puede desorberse, recogerse e identificarse por espectrometría de masas (ms).

Se usaron dos técnicas complementarias, la primera usa el espectrómetro de masas Ciphergen ProteinChip Reader MALDI-TOF, en el que fue posible unir covalentemente la IgG a un chip del espectrómetro de masas y realizar la digestión y extracción in situ. La segunda técnica usó BAK502G9 biotinilado unido a lechos recubiertos con estreptavidina y permitió la recogida de péptido suficiente para la confirmación de la secuencia por espectrometría de masas en tándem (ms/ms).

Los dos procedimientos aunque se diferencian en absoluto detalle y escala implicaron esencialmente las mismas etapas, acoplamiento de la IgG, bloqueo de los sitios de unión que no han reaccionado, lavado, captura del ligando, eliminación del ligando no unido, digestión y una etapa final de lavado.

El método MALDI-TOF ms usa chips ms patentados activados con carbonildiimidazol que se une covalentemente a grupos amino primarios a los que se acopló la IgG a 1-2 mg/ml en PBS toda la noche a 4°C. El chip se bloqueó posteriormente con una disolución de etanolamina a temperatura ambiente durante 1 hora y se lavó extensamente con PBS o HBS más un detergente adecuado. Una alícuota de un picomol de IL-13 se aplicó al chip en PBS o HBS y se dejó que se uniera a la IgG químicamente inmovilizada durante 2 horas a temperatura ambiente. Esto se siguió de lavados

adicionales en PBS o HBS con y sin detergente para eliminar cualquier IL-13 unida no específicamente. Una disolución de tripsina en el intervalo de 200 a 3,1 µg/ml en PBS o HBS se aplicó al complejo IgG:ligando y se dejó que continuara la digestión durante 30 minutos a temperatura ambiente después de lo cual el chip se lavó en PBS o HBS más detergente, PBS o HBS y finalmente agua. Después de la aplicación de una matriz MALDI-TOF ms adecuada el chip se puso directamente en el espectrómetro de masas y se analizó.

El método basado en lechos empezó con la biotilación de la IgG, usando un compuesto NHS biotina, en una proporción molar de 1 IgG a 4 moléculas de biotina. La eliminación de biotina no unida y los productos secundarios de la reacción usando filtración en gel siguió a esto. Se dejó que la IgG biotinilada se uniera a los lechos de agarosa recubiertos con neutravidina, en los que se intentó maximizar la captura de IgG. Se dispensaron alícuotas de los lechos recubiertos con IgG en columnas spin de concentrador y se lavaron con Dulbecco PBS + 0,05% Tween 20 seguido de resuspensión en Dulbecco PBS + 0,05% Tween 20. Se aplicó un pulso de IL-13 a los lechos de IgG resuspendidos y se dejó que la unión continuara durante 10 minutos después de lo cual se eliminó la fase líquida por centrifugación y los lechos se lavaron con Dulbecco PBS + 0,05% Tween 20 seguido de resuspensión en Dulbecco PBS + 0,05% Tween 20.

El complejo lecho:IgG:ligando se sometió a proteólisis con tripsina o quimotripsina con incubación a temperatura ambiente ó 37°C. Después de esto, los lechos se lavaron de nuevo en Dulbecco PBS + 0,05% Tween 20 seguido de lavados adicionales en Dulbecco PBS sin detergente. Los lechos se resuspendieron en una mezcla agua, acetonitrilo, trifluoroacético y se recuperó el sobrenadante. Éste se analizó de varias maneras por MALDI-TOF ms o por HPLC en fase reversa espectrometría de masas, incluyendo fragmentación en tándem (ms/ms) usando el espectrómetro de masas con trampa de iones ThermoQuest LCQ ESI. Se hizo un intento para cotejar el patrón de fragmentación resultante con la secuencia de IL-13 humana y la secuencia separada de la cadena pesada y ligera de la IgG BAK502G9.

Durante la secuencia experimental, se emplearon varios controles, principalmente superficies blanco, IgG solo e isotipos control para demostrar que los péptidos identificados se obtuvieron específicamente de IL-13 capturada por IgG y no un producto de BAK502G9 o digestión de IL-13 unida de manera no específica.

Resultados

La serie experimental proporcionó de manera consistente péptidos específicos para IL-13 para cada digestión. Los datos del instrumento con trampa de iones LCQ revelaron que el fragmento tríptico tenía una masa monoisotópica de 3.258 Da (MH+) y el fragmento de quimotripsina una masa monoisotópica de 3.937 Da (MH+).

Una búsqueda de estas masas frente a la digestión in silico apropiada de IL-13 humana proporcionó correspondencias cercanas a péptidos relacionados en la parte C terminal de la molécula.

Correspondencia para la masa del péptido con tripsina: 3.258 Da

A una tolerancia de 1.000 ppm, 3.258 Da se corresponde con la secuencia desde el ácido aspártico en la posición 106 hasta la asparagina C terminal en la posición 132. No hay otras correspondencias a esta tolerancia. Esta región está resaltada en negrita en la secuencia de la forma precursora de IL-13 humana a continuación.

MALLLTTVIALTCLGGFASPGVPVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGM
YCAALESLINVSGCSAIEKTQRMISGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLHLKK
LFREGRFN

Correspondencia para la masa del péptido con quimotripsina: 3.937 Da

A una tolerancia de 1.000 ppm, 3.937 Da se corresponde con la secuencia desde la serina en la posición 99 hasta la asparagina C terminal en la posición 132. Esta región está resaltada en negrita en la secuencia de la forma precursora de IL-13 humana a continuación.

MALLLTTVIALTCLGGFASPGVPVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGM
YCAALESLINVSGCSAIEKTQRMISGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLHLKK
LFREGRFN

Estas correspondencias muestran que la IgG BAK502G9 retiene la parte C terminal de la molécula de IL-13 durante la proteólisis del complejo anticuerpo:ligando.

La identidad de ambos péptidos se confirmó con éxito por ms/ms, ninguno de los cuales mostró ningún paralelismo de secuencia significativo con BAK502G9. El mapa del fragmento ms/ms personalizado para identificar iones Y o B matched

26 de 104 iones posibles en un estado de carga para el péptido de tripsina y 19 de 128 iones posibles para el péptido de quimotripsina. Una revisión de todos los estados de carga muestra la identificación de 23 de los 27 restos de aminoácidos para el fragmento de tripsina y 29 de los 33 restos para el fragmento de quimotripsina. Esto es suficiente para confirmar la identidad.

- 5 La secuencia experimental como un todo ha identificado que parte del epítipo de BAK502G9 en IL-13 humana está en los veintisiete restos de aminoácidos C terminales. Estos descubrimientos corroboran el descubrimiento del método molecular detallado anteriormente.

REFERENCIAS

1. McKenzie, A.N., et al. J Immunol, 1993. 150(12): p. 5436-44.
2. Minty, A., et al. Nature, 1993. 362(6417): p. 248-50.
3. Nakamura, Y., et al. Am J Respir Cell Mol Biol, 1996. 15 (5) : p. 680-7.
4. Robinson, D.S., et al. N Engl J Med, 1992. 326(5): p. 298-304.
5. Walker, C., et al. Am J Respir Crit Care Med, 1994. 150(4): p. 1038-48.
6. Humbert, M., et al. Am J Respir Crit Care Med, 1996. 154(5): p. 1497-504.
7. Corrigan, C.J. and A.B. Kay Int Arch Allergy App1 Immunol, 1991. 94(1-4) : p. 270-1.
8. Bentley, A.M., et al. Am J Respir Cell Mol Biol, 1993. 8(1): p. 35-42.
9. Murata, T., et al. Int J Hematol, 1999. 69(1): p. 13-20.
10. Andrews, A.L., et al. J Biol Chem, 2002. 277(48): p. 46073-8.
11. Miloux, B., et al. FEBS Lett, 1997. 401(2-3): p. 163-6.
12. Hilton, D.J., et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(1): p. 497-501.
13. Kuperman, D., et al. J Exp Med, 1998. 187(6): p. 939-48.
14. Nelms, K., et al. Annu Rev Immunol, 1999. 17: p. 701-38.
15. Zhang, J.G., et al. J Biol Chem, 1997. 272(14): p. 9474-80.
16. Caput, D., et al. J Biol Chem, 1996. 271(28): p. 16921-6.
17. Kawakami, K., et al. Blood, 2001. 97(9): p. 2673-9.
18. Wood, N., et al. J Exp Med, 2003. 197(6): p. 703-709.
19. Chiaramonte, M.G., et al. J Exp Med, 2003. 197(6): p. 687-701.
20. Beasley, R., et al. J Allergy Clin Immunol, 2000. 105(2 Pt 2): p. S466-72.
21. Peat, J.K. y J. Li J Allergy Clin Immunol, 1999. 103(1 Pt 1): p. 1-10.
22. Society, B.T., British guideline on the management of asthma. Thorax, 2003. 58 Supl 1: p. i1-94.
23. GINA, Global Strategy for Asthma Management and Prevention. 2002, National Institute of Health.
24. Milgrom, H., B. Bender, and F. Wamboldt. Ann Allergy Asthma Immunol, 2002. 88(5): p. 429-31.
25. Fish, L. y C.L. Lung, Adherence to asthma therapy. Ann Allergy Asthma Immunol, 2001. 86(6 Supl 1): p. 24-30.
26. Bender, B.G. J Allergy Clin Immunol, 2002. 109(6 Supl): p. S554-9.
27. Wills-Karp, M., et al. Science, 1998. 282(5397): p. 2258-61.
28. Grunig, G., et al. Science, 1998. 282(5397): p. 2261-3.
29. Venkayya, R., et al. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002. 26(2): p. 202-8.
30. Morse, B., et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. 282(1): p. L44-9.
31. Zhu, Z., et al. J Clin Invest, 1999. 103(6): p. 779-88.
32. Walter, D.M., et al. J Immunol, 2001. 167(8): p. 4668-75.
33. Cohn, L., J.S. Tepper, y K. Bottomly. J Immunol, 1998. 161(8): p. 3813-6.
34. Taube, C., et al. J Immunol, 2002. 169(11): p. 6482-9.
35. Yang, E.S., et al. J. Allergy Immunol., 2002. 109: p. A168.

36. Blease, K., et al. *J Immunol*, 2001. 166(8): p. 5219-24.
37. Heinzmann, A., et al. *Hum Mol Genet*, 2000. 9(4): p. 549-59.
38. Howard, T.D., et al. *Am J Hum Genet*, 2002. 70(1): p. 230-6.
39. Kauppi, P., et al. *Genomics*, 2001. 77(1-2): p. 35-42.
40. Graves, P.E., et al. *J Allergy Clin Immunol*, 2000. 105(3): p. 506-13.
41. Arima, K., et al. *J Allergy Clin Immunol*, 2002. 109(6): p. 980-7.
42. van der Pouw Kraan, T.C., et al. *Genes Immun*, 1999. 1(1): p. 61-5.
43. Humbert, M., et al. *J Allergy Clin Immunol*, 1997. 99(5): p. 657-65.
44. Kotsimbos, T.C., P. Ernst, and Q.A. Hamid, *Proc Assoc Am Physicians*, 1996. 108(5): p. 368-73.
45. Komai-Koma, M., F.Y. Liew, y P.C. Wilkinson, *J Immunol*, 1995. 155(3): p. 1110-6.
46. Naseer, T., et al. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997. 155(3): p. 845-51.
47. Huang, S.K., et al. *J Immunol*, 1995. 155(5): p. 2688-94.
48. Kroegel, C., et al. *Eur Respir J*, 1996. 9(5): p. 899-904.
49. Ohshima, Y., et al. *Pediatr Res*, 2002. 51(2): p. 195-200.
50. Hasegawa, M., et al. *J Rheumatol*, 1997. 24(2): p. 328-32.
51. Hancock, A., et al. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1998. 18 (1) : p. 60-5.
52. Lee, C.G., et al. *J Exp Med*, 2001. 194(6): p. 809-21.
53. Jain-Vora, S., et al. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997. 17(5): p. 541-51.
54. Fallon, P.G., et al. *J Immunol*, 2000. 164(5): p. 2585-91.
55. Chiaramonte, M.G., et al. *J Clin Invest*, 1999. 104(6): p. 777-85.
56. Chiaramonte, M.G., et al. *Hepatology*, 2001. 34(2): p. 273-82.
57. Sluiter, H.J., et al. *Eur Respir J*, 1991. 4(4): p. 479-89.
58. Zheng, T., et al. *J Clin Invest*, 2000. 106(9): p. 1081-93.
59. Tashkin, D.P., et al., Methacholine reactivity predicts changes in lung function over time in smokers with early chronic obstructive pulmonary disease. The Lung Health Study Research Group. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996. 153(6 Pt 1): p. 1802-11.
60. Van Der Pouw Kraan, T.C., et al. *Genes Immun*, 2002. 3(7): p. 436-9.
61. Skinnider, B.F., et al. *Blood*, 2001. 97(1): p. 250-5.
62. Kapp, U., et al. *J Exp Med*, 1999. 189(12): p. 1939-46.
63. Fiumara, P., F. Cabanillas, y A. Younes, *Blood*, 2001. 98(9): p. 2877-8.
64. Terabe, M., et al. *Nat Immunol*, 2000. 1(6): p. 515-20.
65. Ahlers, J.D., et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(20): p. 13020-5.
66. Hutchings, C., Generation of Naive Human Antibody Libraries, In *Antibody Engineering*, R. Kontermann and S. Dubel, Editors. 2001, Springer Laboratory Manuals, Berlin. p. 93-108.
67. Vaughan, T.J., et al. *Nat Biotechnol*, 1996. 14(3): p. 309-14.
68. Kitamura, T., et al. *Blood*, 1989. 73(2): p. 375-80.
69. Lefort, S., et al. *FEBS Lett*, 1995. 366(2-3): p. 122-6.
70. Osbourn, J.K., et al. *Immunotechnology*, 1996. 2(3): p. 181-96.
71. Howard, T.D., et al. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001. 25 (3) : p. 377-84.
72. Karlsson, R., A. Michaelsson, and L. Mattsson, *J Immunol Methods*, 1991. 145(1-2): p. 229-40.
73. Tomlinson, VBASE. 1997, MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK.
74. Altmann, F., et al. *Glycoconj J*, 1999. 16(2): p. 109-23.
75. Drexler, H.G., et al. *Leuk Res*, 1986. 10(5): p. 487-500.
76. Skinnider, B.F., U. Kapp, and T.W. Mak, *Leuk Lymphoma*, 2002. 43(6): p. 1203-10.
77. Terada, N., et al. *Clin Exp Allergy*, 2000. 30(3): p. 348-55.
78. Wenzel, S.E., et al. *J Immunol*, 2002. 169(8): p. 4613-9.
79. Richter, A., et al. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001. 25(3): p. 385-91.
80. Bochner, B.S., et al. *J Immunol*, 1995. 154(2): p. 799-803.
81. Kotowicz, K., et al. *Int Immunol*, 1996. 8(12): p. 1915-25.
82. McKenzie, A.N., et al. *Journal of Immunology*, 1993. 150(12): p. 5436-44.
83. Bouteiller, C.L., et al. *J Immunol Methods*, 1995. 181(1): p. 29-36.
84. Riffo-Vasquez, Y., et al. *Clin Exp Allergy*, 2000. 30(5): p. 728-38.
85. McMillan, S.J., et al. *J Exp Med*, 2002. 195(1): p. 51-7.
86. Humbles, A.A., et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(3): p. 1479-84.
87. Temelkovski, J., et al. *Thorax*, 1998. 53(10): p. 849-5G.
88. Belvisi, M.G., et al., *Pulm Pharmacol Ther*, 2001. 14(3): p. 221-7.
89. Barnes, P.J., et al. *Eur Respir J*, 1996. 9(4): p. 636-42.
90. Barnes, P.J., *Pharmacol Ther*, 2003. 97(1): p. 87-94.

91. Wardlaw, A.J., Clin Med, 2001. 1(3): p. 214-8.
92. Edwards, J.C., et al. J Pathol, 1981. 134(2): p. 147-56.
93. McDonough, J.E., et al. W.M. Elliot, and J.C. Hogg. TGF-beta Isoform and IL-13 Immunostaining on Lung Tissue from Patients with COPD. EnATS 99th International Conference. 2003. Seattle.
94. Wold, et al. Multivariate data analysis in chemistry. Chemometrics - Mathematics and Statistics in Chemistry (Ed.: B. Kowalski), D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland, 1984 (ISBN 90-277-1846-6).
95. Norman et al. Applied Regression Analysis. Wiley-Interscience; **3a edición (Abril 1998)** ISBN: 0471170828
96. Abraham Kandel, Eric Backer. Computer-Assisted Reasoning in Cluster Analysis. Prentice Hall PTR; (**11 Mayo**, 1995), ISBN: 0133418847
97. Wojtek Krzanowski. Principles of Multivariate Analysis: A User's Perspective (Oxford Statistical Science Series, No 22 (Paper)). Oxford University Press; (**Diciembre 2000**), ISBN: 0198507089
98. Ian H. Witten, Eibe Frank. Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques with Java Implementations. Morgan Kaufmann; (**11 Octubre 1999**), ISBN: 1558605525
99. David G. T. Denison (Editor), Christopher C. Holmes, Bani K. Mallick, Adrian F. M. Smith. Bayesian Methods for Nonlinear Classification and Regression (Wiley Series in Probability and Statistics). John Wiley & Sons; (**Julio 2002**), ISBN: 0471490369
100. Arup K. Ghose, Vellarkad N. Viswanadhan. Combinatorial Library Design and Evaluation Principles, Software, Tools, and Applications in Drug Discovery. ISBN: 0-8247-0487-8
101. Chothia C. et al. Journal Molecular Biology (1992) 227, 799-817.
102. Al-Lazikani, et al. Journal Molecular Biology (1997) 273(4), 927-948.
103. Chothia, et al. Science, 233, 755-758 (1986).
104. Whitelegg, N.R.J. y Rees, A.R (2000). Prot. Eng., 13, 819-824.
105. **Disponible en** Accelrys Inc.
106. Guex, N. y Peitsch, M.C. (1997). Electrophoresis (1997) 18, 2714-2723.
107. Kabat E A et al (1991): Sequences of Proteins of Immunological Interest, **5a Edición**. US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington.
108. Kontermann R y Dubel Stefan; (2001) Antibody Engineering, Springer Laboratory Manuals.
109. Mendez et al (1997); Nature Genetics Vol. 2: 146-156.
110. Csonka E et al (2000) Journal of Cell Science, 113: 3207-3216.
111. Vanderbyl S et al (2002) Molecular Therapy, 5(5): 10.
112. Marasco WA (1997) Gene Therapy, 4(1): 11.
113. Hanes J et al (2000). Methods in Enzymology, Vol 328:24.
114. Li et al (2003). Abstract for poster [605] **Enviado a** The American Thoracic Society Annual Meeting, 2003, Seattle.
115. Koide et al (1998). Journal of Molecular Biology, Vol 284:1141-1151.
116. Nygren et al (1997). Current Opinion in Structural Biology, Vol 7:463-469.
117. Heller, F., et al. (2002) Immunity, 17(5):629-38.
118. Inoue, S., et al. (1999) Am J Gastroenterol, 94(9):2441-6.
119. Yang, M., et al. Am J Respir Cell Mol Biol. 2001. 25(4): p. 522-30
120. Punnonen J., et al 1993. Proc Natl Acad Sci. 90(8):3730-4.
121. Grunstein, M., et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2002. 282: p. L520-L528.
122. Laporte, J., et al. Am J Respir Crit Care Med 2001. 164: p. 141-148.
123. Tliba O., et al. Br J Pharmacol 2003. 140(7): p. 1159-62.
124. Deshpande, D., et al. Am J Respir Cell Mol Biol 2004. 31(1): p. 36-42; Epub Feb 5 as doi:10.1165/rcmb.2003-03130C.
125. Humbert et al. 1997. J. Allergy Clin. Immunol., 99:657.
126. Berry, M.A., Parker, D., Neale, N., Woodman, L., Morgan, A. Monk, P.D.. **Enviado a** J. Allergy Clin Immunol.
127. Obase et al. Ann Allergy Asthma Immunol. 2001; 86(3):304-10.
128. Chu et al. 2000; J. Allergy Clin. Immunol. 106:1115
129. Terada et al. 2000. Clin. Exp. Allergy., 30: 348-55.
130. Wenzel et al. 2000. J. Immunol. 169: 4613-19.

Table 1

[illegible]

Tabla 1 (cont.)[illegible]

Tabla 2

Especificidad de unión de anticuerpos anti-IL-13 humana			
	IL-13 humana	Variante de IL-13 humana	IL-13 de primates no humanos
BAK278D6	+	+	+
BAK502G9	+	+	+
BAK615E3	+	-	-

Tabla 3a

Análisis cinético de anticuerpos anti-IL-13 humana			
IgG	Velocidad de disociación (s ⁻¹)	Velocidad de asociación (M ⁻¹ s ⁻¹)	KD (pM)
BAK278D6	7,41e ⁻³	5,49e ⁵	13.500
BAK502G9	4,09e ⁻⁴	2,49e ⁵	178
BAK1167F2	4,05e ⁻⁴	2,99e ⁵	136
BAK1183H4	4300e ⁻⁴	3,7e ⁵	81

Tabla 3b

Análisis cinético de anticuerpos anti-IL-13 murina			
IgG	Velocidad de disociación (s ⁻¹)	Velocidad de asociación (M ⁻¹ s ⁻¹)	KD (pM)
BAK209B11	1,98e ⁻²	3,9e ⁵	5.100

Tabla 4

Farmacocinética de BAK502G9 en 4 primates cynomolgus alérgicos pero no sometidos a pulso (2 machos/2 hembras) después de una única dosis en bolo 10 mg/kg i.v durante 29 días. Los niveles de BAK502G9 en suero se midieron por ELISA (datos medios)		
C _{max} (t=0,25h) (µg/mL)	349,04	
Vd _{inf} (mL.kg ⁻¹)	75,03	<80mL/kg, infiere sin unión al tejido.
Cl _{inf} (mL.hr ⁻¹ .kg ⁻¹) AUC _{inf} (mg.h.mL ⁻¹)	0,23	
AUC _{ext} (%)	42,99	
T _{0,5} (h)	17,34	<30% por lo que el aclaramiento y el vol. de distribución deben ser

		precisos.
	223,55	
$V_{d_{inf}}$ = volumen de distribución sobre tiempo 0-infinito, calculado de la AUC extrapolada. Cl_{inf} = aclaramiento sobre tiempo 0-infinito, calculado de la AUC extrapolada. AUC_{inf} = (medida de la exposición total al fármaco) área bajo la curva sobre tiempo 0-infinito, incluyendo un término extrapolado basado en la constante de la velocidad de eliminación (k) y la última concentración sérica observada de fármaco. AUC_{ext} = porcentaje de la AUC total que se extrapola. $T_{0,5}$ = Vida media del fármaco en la fase de eliminación terminal.		

Tabla 5

Primer conjunto de construcciones quiméricas	
Construcciones quiméricas	CI50 nM
BAK502G9	0,17 ± 0,07
bucle1	0,71 ± 0,35
hum-flag	1,30 ± 0,18
30R	1,76 ± 0,45
3738VN	1,89 ± 1,9
héliceB	2,49 ± 0,88
héliceC	4,11 ± 0,70
bucle3	5,45 ± 3,96
4041	12,02 ± 1,3
3334	12,17 ± 1,2
héliceD	110,07 ± 9,9

Tabla 6

Segundo conjunto de construcciones químicas	
Construcciones químicas	CI50 nM
BAK502G9	$0,11 \pm 0,04$
113H	$1,6 \pm 0,5$
128H	$1,6 \pm 1,0$
119LA	$1,96 \pm 1,0$
130P	$2,22 \pm 0,8$
120121SY	$4,73 \pm 1,5$
58LA	$5,2 \pm 2,0$
124Q	$18,7 \pm 15,9$
116117T	$82 \pm 11,3$
123KA	ninguna
127RA	ninguna

Tabla 7

Efectos de BAK502G9 en varios puntos finales predefinidos					
Parámetro	Cambio en fase I	N	Cambio en fase II	N	Punto final
AHR (R _L AUC)	0.02010.003	14 ^a	0,004±0,006	14 ^a	-0,016±0,006*
AHR (CP ₃₀)	-1,343±0,318	18 ^b	1,061±0,244	18 ^b	0,282±0,179
Cebado de antígeno (R _L AUC)	0,159±0,033	20 ^c	0,033±0,025	20 ^c	-0.12610.043**
Células totales BAL	20,623±3,160	21 ^d	14,597±1,95	21 ^d	-6,026±2,194*

Eosinófilos BAL	18,453±3,009	21 ^d	13,412±1,73	21 ^d	-5,041±2,090*
Células mononucleares BAL	2,050±0,438	21 ^d	1,176±0,481	21 ^d	-0,874±0,506

21 animales que presentan AHR (CP₃₀) en Fase I y un animal adicional con un fenotipo de cebado de antígeno se pasaron a ensayo en Fase II (22 en total). No todos los animales tenían AHR medido tanto por AUC como CP₃₀. Sólo los animales que presentaban AHR en fase I y cuya AHR se evaluó tanto en Fase I como en Fase II se incluyeron en los resultados de AHR. El ensayo estadístico se realizó usando InStat. El ensayo fue un ensayo de t de student de dos vías frente a la hipótesis nula de que el punto final incluía el número 0 (es decir, no había cambio en la fase II comparado con la fase I); *p<0,05, **p<0,01. Los datos se muestran como media aritmética±SEM (n=14-21).

^a5 animales se excluyeron del análisis de AUC ya que no presentaban AHR (AUC incrementada) en la Fase I. 3 animales más se excluyeron debido a fallo técnico en la recogida de los datos de la función de las vías aéreas en la Fase II.

^b3 animales se excluyeron del análisis de CP₃₀ debido a fallo técnico en la recogida de los datos de la función de las vías aéreas en la Fase II (los mismos animales que en a). El animal adicional con fenotipo de cebado de antígeno se excluyó ya que no presentaba CP₃₀ AHR en la Fase I.

^c2 animales se excluyeron del análisis de cebado de antígeno porque hubo un fallo técnico en la recogida de los datos de la función de las vías aéreas en la Fase I.

^d1 animal se excluyó del análisis de BAL debido a inflamación marcada de BAL al inicio del estudio.

BAK278D6

CADENA PESADA

CDR1- SEQ ID NO 1: NYGLS
 CDR2- SEQ ID NO 2: WISANNGDTNYGQEFQG
 CDR3- SEQ ID NO 3: DSSSNWARWFFDL

BAK278D6

CADENA LIGERA

CDR1- SEQ ID NO 4: GGNNIGSKLVH
 CDR2- SEQ ID NO 5: DDGDRPS
 CDR3- SEQ ID NO 6: QVWDTGSDPW

BAK502G9

CADENA PESADA

CDR1-SEQ ID NO 7: NYGLS
CDR2-SEQ ID NO 8: WISANNGDTNYGQEFQG
CDR3-SEQ ID NO 9: DSSSSWARWFFDL

CADENA LIGERA

CDR1-SEQ ID NO 10: GGNIIGSKLVH
CDR2-SEQ ID NO 11: DDGDRPS
CDR3-SEQ ID NO 12: QVWDTGSDPW

BAK278D6

DOMINIO DE CADENA PESADA

SEQ ID NO 13:
EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFRNYGLSWVRQAPGQGLEWMGWISANNGDTN
YGQEFQGRITMTTETSTNTAHMELRSLRSDDTAVYYCVRDSSSNWARWFFDLWGKGTMV
TVSS

BAK278D6

DOMINIO DE CADENA LIGERA

SEQ ID NO 14:
SYVLTQPPSVSVAPGQTARI PCGGNNIGSKLVHWYQQKPGQAPVLVVYDDGDRPSGIPE
RFSGSNSGNTATLTISRIDAGDEADYYCQVWDTGSDPVVFGGGTKLTVL

BAK502G9

DOMINIO DE CADENA PESADA

SEQ ID NO 15:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGLSWVRQAPGQGLEWMGWISANNGDTN
YGQEFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDSSSSWARWFFDLWGRGTLV
TVSS

BAK502G9

DOMINIO DE CADENA LIGERA

SEQ ID NO 16:

SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNIIGSKLVHWYQQKPGQAPVLVIYDDGDRPSGIPE
RFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDTGSDPVVFGGGTKLTVL

BAK278D6

CADENA PESADA

FR1- SEQ ID NO 17: EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFR
FR2- SEQ ID NO 18: WVRQAPGQGLEWMG
FR3- SEQ ID NO 19: RITMTTETSTNTAHMELRSLRSDDTAVYYCVR

BAK278D6

CADENA LIGERA

FR1- SEQ ID NO 20: SYVLTQPPSVSVAPGQTARIPC
FR2- SEQ ID NO 21: WYQQKPGQAPVLWY
FR3- SEQ ID NO 22: GIPERFSGSNSGNTATLTISRIDAGDEADYYC

BAK167A11

DOMINIO DE CADENA PESADA

SEQ ID NO 23:

EVQLLES GGG LVQP GGS LRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGAAGEGYGYWGRGTLVTV
SS

BAIt167A11

DOMINIO DE CADENA LIGERA

SEQ ID NO 24:

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSAPTTVIYDDNQRPSGV
PDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSNNDVFGGGTKVTVL

BAK209BII

DOMINIO DE CADENA PESADA

SEQ ID NO 25:

QVQLQESGGGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLEWVSSISASGDST
FYADSVKGRFTISRDNKNMVFLQVNSLRADDTAVYFCAKDWSQWLVGDAFDVWGRGTT
VTVSS

BAK209BII

DOMINIO DE CADENA LIGERA

SEQ ID NO 26:

DIQLTQSPSTLSASVGDRVITITCRASQSVSLWVAWYQQRPGKAPKLLIYDGSTLQSGVP
ARFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQYKTFSTFGQGTKVEIKRA

BAK502G9

CADENA PESADA

FR1- SEQ ID NO 27: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
FR2- SEQ ID NO 28: WYRQAPGQGLEWMG
FR3- SEQ ID NO 29: RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR

BAK502G9

CADENA LIGERA

FR1- SEQ ID NO 30: SYVLTQPPSVSVAPGKTARITC
FR2- SEQ ID NO 31: WYQQKPGQAPVLVIY
FR3- SEQ ID NO 32: GIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYC

BAK615E3

DOMINIO DE CADENA PESADA

SEQ ID NO 33:
EVQLLES G GGLVQP G GSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGKATTEEGYYGYWGRGTLV
TVSS

BAK615E3

DOMINIO DE CADENA LIGERA

SEQ ID NO 34:
NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSAPTTVIYDDNQRPSGV
PDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSNNDVFGGGKVTVL

BAK1167F2

DOMINIO DE CADENA PESADA

SEQ ID NO 35:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFEQTGVSWVRQAPGQGLEWMGWISANNGDTN
YGQEFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDSSSSWARWFFDLWGRGTLV
TVSS

BAK1167F2

DOMINIO DE CADENA LIGERA

SEQ ID NO 36:

SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNIIGSKLVHWYQQKPGQAPVLVIYDDGDRPSGIPE
RFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDTGSDPVVFGGGTKLTVL

BAK1183H4

DOMINIO DE CADENA PESADA

SEQ ID NO 37:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINYDGGNTQ
YGQEFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDSSSSWARWFFDLWGRGTLV
TVSS

BAK1183H4

DOMINIO DE CADENA LIGERA

SEQ ID NO 38:

SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNIIGSKLVHWYQQKPGQAPVLVIYDDGDRPSGIPE
RFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDTGSDPVVFGGGTKLTVL

BAIS1105H3

DOMINIO DE CADENA PESADA

SEQ ID NO 39:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGLSWVRQAPGQGLEWMGWISGLNGETL
YGQEFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDSSSSWARWFFDLWGRGTLV
TVSS

BAK1105H3

DOMINIO DE CADENA LIGERA

SEQ ID NO 40:

SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNIIGSKLVHWYQQKPGQAPVLVIYDDGDRPSGIPE
RFGSGNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDTGSDPVVFEGGGTKLTVL

BAKIIID10

DOMINIO DE CADENA PESADA

SEQ ID NO 41:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGLSWVRQAPGQGLEWMGWIATPDGQTS
YGQEFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDNSSSWARWFFDLWGRGTLV
TVSS

BAKIIID10

DOMINIO DE CADENA LIGERA

SEQ ID NO 42:

SYVLTOPPSVSVAPGKTARITCGGNIIGSKLVHWYOOKPGOAPVLVIYDDGDRPSGIPE
RFGSGNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDTGSDPVVFEGGGTKLTVL

BAK1167F4

DOMINIO DE CADENA PESADA

SEQ ID NO 43:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIDTGVSWVRQAPGQGLEWMGWISANNGDTN
YGQEFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDSSSSSWARWFFDLWGRGTLV
TVSS

BAK1167F4

DOMINIO DE CADENA LIGERA

SEQ ID NO 44:

SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNIIGSKLVHWYQQKPGQAPVLVIYDDGDRPSGIPE
RFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDTGSDPVVFEGGGTKLTVL

BAK1184C8

DOMINIO DE CADENA PESADA

SEQ ID NO 45:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGLSWVRQAPGQGLEWMGWISGSNGYTS
YGQEFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDSSSSSWARWFFDLWGRGTLV
TVSS

BAK1184C8

DOMINIO DE CADENA LIGERA

SEQ ID NO 46:

SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNIIGSKLVHWYQQKPGQAPVLVIYDDGDRPSGIPE
RFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCOVWDTGSDPVVFEGGGTKLTVL

BAKI185E1

DOMINIO DE CADENA PESADA

SEQ ID NO 47:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINDATGDTQ
YGQEFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDSSSSWARWFFDLWGRGTLV
TVSS

BAKI185E1

DOMINIO DE CADENA LIGERA

SEQ ID NO 48:

SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNIIGSKLVHWYQQKPGQAPVLVIYDDGDRPSGIPE
RFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDTGSDPVVFGGGTKLTVL

BAK1185F8

DOMINIO DE CADENA PESADA

SEQ ID NO 49:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYGLSWVRQAPGQGLEWMGWIRNIDGYTI
YGQEFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDSSSSWARWFFDLWGRGTLV
TVSS

BAKI185F8

DOMINIO DE CADENA LIGERA

SEQ ID NO 50:

SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNIIGSKLVHWYQQKPGQAPVLVIYDDGDRPSGIPE
RFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDTGSDPVVFGGGTKLTVL

BAK1187B4

DOMINIO DE CADENA PESADA

SEQ ID NO 51:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGLSWVRQAPGQGLEWMGWIDDDSGTTI
YGQEFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDSSSSWARWFFDLWGRGTLV
TVSS

BAK1187B4

DOMINIO DE CADENA LIGERA

SEQ ID NO 52:

SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNIIGSKLVHWYQQKPGQAPVLVIYDDGDRPSGIPE
RFGSGNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDTGSDPVVFGGGTKLTVL

BAK1166G2

DOMINIO DE CADENA PESADA

SEQ ID NO 53:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFANTGISWVRQAPGQGLEWMGWISANNGDTN
YGQEFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDSSSSWARWFFDLWGRGTLV
TVSS

BAK1166G2

DOMINIO DE CADENA LIGERA

SEQ ID NO 54:

SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNIIGSKLVHWYQQKPGQAPVLVIYDDGDRPSGIPE
RFGSGNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDTGSDPVVFGGGTKLTVL

BAK167A11

CADENA PESADA

CDR1- SEQ ID NO 55: SYAMS
CDR2- SEQ ID NO 56: AISGSGGSTYYADSVKG
CDR3- SEQ ID NO 57: VGAAGEGYGY

BAK167A11

CADENA LIGERA

CDR1- SEQ ID NO 58: TRSSGSIASNYVQ
CDR2- SEQ ID NO 59: DDNQRPS
CDR3- SEQ ID NO 60: QSYDSNNDV

BAK1167F2

CADENA PESADA

CDR1- SEQ ID NO 61: QTGVS
CDR2- SEQ ID NO 62: WISANNGDTNYGQEFQG
CDR3- SEQ ID NO 63: DSSSSWARWFFDL

BAK1167F2

CADENA LIGERA

CDR1- SEQ ID NO 64: GGNIIGSKLVH
CDR2- SEQ ID NO 65: DDGDRPS
CDR3- SEQ ID NO 66: QVWDTGSDPVV

BAK1166G2

CADENA PESADA

CDR1- SEQ ID NO 67: NTGIS
CDR2- SEQ ID NO 68: WISANNGDTNYGQEFQG
CDR3- SEQ ID NO 69: DSSSSWARWFFDL

BAK1166G2

CADENA LIGERA

CDR1- SEQ ID NO 70: GGNIIGSKLVH
CDR2- SEQ ID NO 71: DDGDRPS
CDR3- SEQ ID NO 72: QVWDTGSDPVV

BAK1184C8

CADENA PESADA

CDR1- SEQ ID NO 73: NYGLS
CDR2- SEQ ID NO 74: WISGSNGYTSYGQEFQG
CDR3- SEQ ID NO 75: DSSSSWARWFFDL

BAK1184C8

CADENA LIGERA

[0349]

CDR1- SEQ ID NO 76: GGNIIGSKLVH
CDR2- SEQ ID NO 77: DDGDRPS
CDR3- SEQ ID NO 78: QVWDTGSDPVV

BAK1185E1

CADENA PESADA

[0350]

CDR1- SEQ ID NO 79: NYGLS
CDR2- SEQ ID NO 80: WINDATGDTQYGQEFQG
CDR3- SEQ ID NO 81: DSSSSWARWFFDL

BAK1185E1

CADENA LIGERA

[0351]

CDR1- SEQ ID NO 82: GGNIIGSKLVH
CDR2- SEQ ID NO 83: DDGDRPS
CDR3- SEQ ID NO 84: QVWDTGSDPVV

BAK1167F4

CADENA PESADA

CDR1- SEQ ID NO 85: DTGVS
CDR2- SEQ ID NO 86: WISANNGDTNYGQEFQG
CDR3- SEQ ID NO 87: DSSSSWARWFFDL

BAK1167F4

CADENA LIGERA

CDR1- SEQ ID NO 88: GGNIIGSKLVH
CDR2- SEQ ID NO 89: DDGDRPS
CDR3- SEQ ID NO 90: QVWDTGSDPVV

BAK1111D10

CADENA PESADA

CDR1- SEQ ID NO 91: NYGLS
CDR2- SEQ ID NO 92: WIATPDGQTSYGQEFQG
CDR3- SEQ ID NO 93: DSNSSWARWFFDL

BAK1111D10

CADENA LIGERA

CDR1- SEQ ID NO 94: GGNIIGSKLVH
CDR2- SEQ ID NO 95: DDGDRPS
CDR3- SEQ ID NO 96: QVWDTGSDPVV

BAK1183H4

CADENA PESADA

CDR1- SEQ ID NO 97: NYGLS
CDR2- SEQ ID NO 98: WINYDGGNTQYGQEFQG
CDR3- SEQ ID NO 99: DSSSSWARWFFDL

BAK1183H4

CADENA LIGERA

CDR1- SEQ ID NO 100: GGNIIGSKLVH
CDR2- SEQ ID NO 101: DDGDRPS
CDR3- SEQ ID NO 102: QVWD TGSDPW

BAK1185H8

CADENA PESADA

CDR1- SEQ ID NO 103: DYGLS
CDR2- SEQ ID NO 104: WRINDGYTIYGQEFQG
CDR3- SEQ ID NO 105: DSSSSWARWFFDL

BAK1185H8

CADENA LIGERA

CDR1- SEQ ID NO 106: GGNIIGSKLVH
CDR2- SEQ ID NO 107: DDGDRPS
CDR3- SEQ ID NO 108: QVWD TGSDPVV

BAK278D6

CADENA PESADA- SEQ ID NO: 109

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT
CTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACAAATTATGGTCTCAGCTGGGTGCGACAGG
CCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTAATAATGGCGACACAAAT
TATGGACAGGAATTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGATACATCCACGAGCACAGC
CTACATGGAGTTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAG
ACTCCAGCAGCAACTGGGCCCCTGGTTTTTCGATCTCTGGGGCCGGGGGACACTGGTC
ACCGTCTCCTCA

BAK278D6

CADENA LIGERA- SEQ ID NO:110

TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGTAAGACGGCCAGGAT
TACCTGTGGGGGAAACAACATTGGAAGTAAACTTGTACACTGGTACCAGCAGAAGCCAG
GCCAGGCCCCCTGTGCTGGTCATCTATGATGATGGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAG
CGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAGGC
CGGGGATGAGGCCGACTATTATTGTGAGGTGTGGGATACTGGTAGTGATCCCGTGGTAT
TCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT

BAK502G9

CADENA PESADA- SEQ ID NO:111

CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT
CTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACAAATTATGGTCTCAGCTGGGTGCGACAGG
CCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTAATAATGGCGACACAAAT
TATGGACAGGAATTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGATACATCCACGAGCACAGC
CTACATGGAGTTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAG

ACTCCAGCAGCAGCTGGGCCCCTGGTTTTTCGATCTCTGGGGCCGGGGGACACTGGTC
ACCGTCTCCTCA

BAK502G9

CADENA LIGERA- SEQ ID NO:112

TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGAAAGACGGCCAGGAT
TACCTGTGGGGGAAACATCATTGGAAGTAACTTGTACACTGGTACCAGCAGAAGCCAG
GCCAGGCCCCCTGTGCTGGTCATCTATGATGATGGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAG
CGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAGGC
CGGGGATGAGGCCGACTATTATTGTCAGGTGTGGGATACTGGTAGTGATCCCGTGGTAT
TCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT

BAK1105HO3

CADENA PESADA- SEQ ID NO: 113

CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT
CTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACAAATTATGGTCTCAGCTGGGTGCGACAGG
CCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCTCCGGCTTGAACGGCGAGACATTG
TATGGACAGGAATTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGATACATCCACGAGCACAGC
CTACATGGAGTTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAG
ACTCCAGCAGCAGCTGGGCCCCGCTGGTTTTTCGATCTCTGGGGCCGGGGGACACTGGTC
ACCGTCTCCTCA

BAK1105H03

CADENA LIGERA- SEQ ID NO: 114

TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGAAAGACGGCCAGGAT
TACCTGTGGGGGAAACATCATTGGAAGTAACTTGTACACTGGTACCAGCAGAAGCCAG
GCCAGGCCCCCTGTGCTGGTCATCTATGATGATGGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAG
CGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAGGC
CGGGGATGAGGCCGACTATTATTGTCAGGTGTGGGATACTGGTAGTGATCCCGTGGTAT
TCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT

BAK1111D10

CADENA PESADA- SEQ ID NO:115

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT
 CTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACAAATTATGGTCTCAGCTGGGTGCGACAGG
 CCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCGCAACCCAGACGGCCAGACAAGC
 TATGGACAGGAATTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGATACATCCACGAGCACAGC
 CTACATGGAGTTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAG
 ACTCCAACAGCAGCTGGGCCCCGCTGGTTTTTCGATCTCTGGGGCCGGGGGACACTGGTC
 ACCGTCTCCTCA

BAK1111D10

CADENA LIGERA- SEQ ID NO:116

TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGAAAGACGGCCAGGAT
 TACCTGTGGGGGAAACATCATTGGAAGTAACTTGTACACTGGTACCAGCAGAAGCCAG
 GCCAGGCCCTGTGCTGGTCATCTATGATGATGGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAG
 CGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTTCGAGGC
 CGGGGATGAGGCCGACTATTATTGTCAGGTGTGGGATACTGGTAGTGATCCCGTGGTAT
 TCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT

BAK 1167F2

CADENA PESADA- SEQ ID NO: 117

CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT
 CTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTGAGCAGACCGGCGTCTCCTGGGTGCGACAGG
 CCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTAATAATGGCGACACAAAT
 TATGGACAGGAATTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGATACATCCACGAGCACAGC
 CTACATGGAGTTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAG
 ACTCCAGCAGCAGCTGGGCCCCGCTGGTTTTTCGATCTCTGGGGCCGGGGGACACTGGTC
 ACCGTCTCCTCA

BAK 1167F2

CADENA LIGERA- SEQ ID NO:118

TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGAAAGACGGCCAGGAT
TACCTGTGGGGGAAACATCATTGGAAGTAAACTTGTACACTGGTACCAGCAGAAGCCAG
GCCAGGCCCTGTGCTGGTCATCTATGATGATGGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAG
CGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAGGC
CGGGGATGAGGCCGACTATTATTGTCAGGTGTGGGATACTGGTAGTGATCCCGTGGTAT
TCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT

BAK 1167F04

CADENA PESADA- SEQ ID NO:119

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT
CTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTATCGACACCGGGGTCTCCTGGGTGCGACAGG
CCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTAATAATGGCGACACAAAT
TATGGACAGGAATTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGATAACATCCACGAGCACAGC
CTACATGGAGTTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAG
ACTCCAGCAGCAGCTGGGCCCCTGGTTTTTCGATCTCTGGGGCCGGGGGACACTGGTC
ACCGTCTCCTCA

BAK 1167F04

CADENA LIGERA- SEQ ID NO:120

TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGAAAGACGGCCAGGAT
TACCTGTGGGGGAAACATCATTGGAAGTAAACTTGTACACTGGTACCAGCAGAAGCCAG

GCCAGGCCCTGTGCTGGTCATCTATGATGATGGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAG
CGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAGGC
CGGGGATGAGGCCGACTATTATTGTCAGGTGTGGGATACTGGTAGTGATCCCGTGGTAT
TCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT

BAK 1183H4

CADENA PESADA- SEQ ID NO:121

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT
CTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACAAATTATGGTCTCAGCTGGGTGCGACAGG
CCCCGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACTACGACGGCGGCAACACACAG
TATGGACAGGAATTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGATACATCCACGAGCACAGC
CTACATGGAGTTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAG
ACTCCAGCAGCAGCTGGGCCCGCTGGTTTTTCGATCTCTGGGGCCGGGGGACACTGGTC
ACCGTCTCCTCA

BAK 1183H4

CADENA LIGERA- SEQ ID NO:122

TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGAAAGACGGCCAGGAT
TACCTGTGGGGGAAACATCATTGGAAGTAACTTGTACACTGGTACCAGCAGAAGCCAG
GCCAGGCCCTGTGCTGGTCATCTATGATGATGGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAG
CGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTTCGAGGC
CGGGGATGAGGCCGACTATTATTGTGAGGTGTGGGATACTGGTAGTGATCCCGTGGTAT
TCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT

BAK1184C8

CADENA PESADA- SEQ ID NO:123

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT
CTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACAAATTATGGTCTCAGCTGGGTGCGACAGG
CCCCGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGGGAGCAACGGCTACACATCT
TATGGACAGGAATTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGATACGTCCACGAGCACAGC
CTACATGGAGTTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAG
ACTCCAGCAGCAGCTGGGCCCGCTGGTTTTTCGATCTCTGGGGCCGGGGGACACTGGTC
ACCGTCTCCTCA

BAK1184C8

CADENA LIGERA- SEQ ID NO:124

TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGAAAGACGGCCAGGAT
TACCTGTGGGGGAAACATCATTGGAAGTAACTTGTACACTGGTACCAGCAGAAGCCAG
GCCAGGCCCTGTGCTGGTCATCTATGATGATGGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAG
CGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTTCGAGGC

CGGGGATGAGGCCGACTATTATTGTCAGGTGTGGGATACTGGTAGTGATCCCGTGGTAT
TCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT

BAK1185E1

CADENA PESADA- SEQ ID NO:125

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT
CTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACAAATTATGGTCTCAGCTGGGTGCGACAGG
CCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACGACGCCACCGGCGACACACAG
TATGGACAGGAATTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGATACATCCACGAGCACAGC
CTACATGGAGTTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAG
ACTCCAGCAGCAGCTGGGCCCCTGGTTTTTTCGATCTCTGGGGCCGGGGGACACTGGTC
ACCGTCTCCTCA

BAK1185E1

CADENA LIGERA- SEQ ID NO:126

TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGAAAGACGGCCAGGAT
TACCTGTGGGGGAAACATCATTGGAAGTAACTTGTACACTGGTACCAGCAGAAGCCAG
GCCAGGCCCTGTGCTGGTCATCTATGATGATGGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAG
CGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAGGC
CGGGGATGAGGCCGACTATTATTGTCAGGTGTGGGATACTGGTAGTGATCCCGTGGTAT
TCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT

BAK1185F8

CADENA PESADA- SEQ ID NO:127

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT
CTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACAGATTATGGTCTCAGCTGGGTGCGACAGG
CCCCTGGACAAGGGCTAGAGTGGATGGGATGGATCCGCAACATCGACGGCTACACAATT
TATGGACAGGAATTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGATACATCCACGAGCACAGC
CTACATGGAGTTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAG
ACTCCAGCAGCAGCTGGGCCCCTGGTTTTTTCGATCTCTGGGGCCGGGGGACACTGGTC
ACCGTCTCCTCA

BAK1185F8

CADENA LIGERA- SEQ ID NO:128

TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGAAAGACGGCCAGGAT
TACCTGTGGGGGAAACATCATTGGAAGTAACTTGTACACTGGTACCAGCAGAAGCCAG
GCCAGGCCCTGTGCTGGTCATCTATGATGATGGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAG
CGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAGGC
CGGGGATGAGGCCGACTATTATTGTCAGGTGTGGGATACTGGTAGTGATCCCGTGGTAT
TCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT

BAK1187B4

CADENA PESADA- SEQ ID.NO:129

CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT
CTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACAAATTATGGTCTCAGCTGGGTGCGACAGG
CCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCGACGACGACAGCGGCACGACAATA
TATGGACAGGAATTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGATACATCCACGAGCACAGC
CTACATGGAGTTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAG
ACTCCAGCAGCAGCTGGGCCCCGCTGGTTTTTCGATCTCTGGGGCCGGGGGACACTGGTC
ACCGTCTCCTCA

BAK1187B4

CADENA LIGERA- SEQ ID NO:130

TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGAAAGACGGCCAGGAT
TACCTGTGGGGGAAACATCATTGGAAGTAACTTGTACACTGGTACCAGCAGAAGCCAG
GCCAGGCCCTGTGCTGGTCATCTATGATGATGGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAG
CGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAGGC
CGGGGATGAGGCCGACTATTATTGTCAGGTGTGGGATACTGGTAGTGATCCCGTGGTAT
TCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT

BAK1166G02

CADENA PESADA-SEQ ID NO: 131

CAAGTGCAGTTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT
CTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTGCGAACACCGGGATCTCGTGGGTGCGACAGG
CCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTAATAATGGCGACACAAAT
TATGGACAGGAATTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGATACATCCACGAGCACAGC
CTACATGGAGTTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAG
ACTCCAGCAGCAGCTGGGCCCCGCTGGTTTTTCGATCTCTGGGGTCGGGGGACACTGGTC
ACCGTCTCCTCA

BAK166G02

CADENA LIGERA- SEQ ID NO: 132

TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGAAAGACGGCCAGGAT
TACCTGTGGGGGAAACATCATTGGAAGTAACTTGTACACTGGTACCAGCAGAAGCCAG
GCCAGGCCCTGTGCTGGTCATCTATGATGATGGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAG
CGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAGGC
CGGGGATGAGGCCGACTATTATTGTCAGGTGTGGGATACTGGTAGTGATCCCCTGGTAT
TCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT

BAK165E7

CADENA PESADA- SEQ ID NO: 133

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGLSWVRQAPGQGLEWMGWI SANNGETN
YGQEFQGRVTMTTETPTNTAHMELRSLTSDDTAVYYCVRDSSSNWARWYFDLWGQGLV
TVSS

BAK165E7

CADENA LIGERA- SEQ ID NO: 134

SYVLTPPPSVSVAPGQTARIPCGGNNIGSKLVHWYQQKPGQAPVLVVYDDGDRPSGIPE
RFGSGNSGNTATLTISRIDAGDEADYYCQVWDTGSDPVVFGGGTKLTVLG

BAK165E7

CADENA PESADA

CDR1- SEQ ID NO:135 NYGLS
CDR2- SEQ ID NO:136 WISANNGETNYGQEFQG
CDR3- SEQ ID NO:137 DSSSNWARWYFDL

BAK165E7

CADENA LIGERA

CDR1- SEQ ID NO:138 GGNNIGSKLVH
CDR2- SEQ ID NO:139 DDGDRPS
CDR3- SEQ ID NO:140 QVWDTGSDPVV

BAK582F7

CADENA PESADA

CDR1- SEQ ID NO 141: SYAMS
CDR2- SEQ ID NO 142: AISGSGGSTYYADSVKG
CDR3- SEQ ID NO 143: VGAAGEGYGY

BAK582F7

CADENA LIGERA

CDR1-SEQ ID NO 144: TRSSGSIASNYVE
CDR2-SEQ ID NO 145: DDNQRPS
CDR3-SEQ ID NO 146: QSYDSNNDV

BAK612B5

CADENA PESADA

CDR1- SEQ ID NO 147: SYAMS
CDR2- SEQ ID NO 148: AISGSGGSTYYADSVKG
CDR3- SEQ ID NO 149: VGRATTDEGYGY

BAK612B5

CADENA LIGERA

CDR1- SEQ ID NO 150: TRSSGSIASNYVQ
CDR2- SEQ ID NO 151: DDNQRPS
CDR3- SEQ ID NO 152: QSYDSNNDV

BAK615E3

CADENA PESADA

CDR1- SEQ ID NO 153: SYAMS
CDR2- SEQ ID NO 154: AISGSGGSTYYADSVKG
CDR3- SEQ ID NO 155: VGKATTEEGYY

BAK615E3

CADENA LIGERA

CDR1- SEQ ID NO 156: TRSSGSIASNYVQ
CDR2- SEQ ID NO 157: DDNQRPS
CDR3- SEQ ID NO 158: QSYDSNNDV

BAK0278D6

CADENA PESADA

CDR1- SEQ ID NO 159: AATTATGGTCTCAGC

CDR2- SEQ ID NO 160: TGGATCAGCGCTAATAATGGCGACACAAATTAT
GGACAGGAATTCCAGGGC

CDR3- SEQ ID NO 161: GACTCCAGCAGCAACTGGGCCCCGCTGGTTTTTC
GATCTC

BAK278D6

CADENA LIGERA

CDR1- SEQ ID NO 162: GGGGGAAACAACATTGGAAGTAACTTGACAC
CDR2- SEQ ID NO 163: GATGATGGCGACCGGCCCTCA
CDR3- SEQ ID NO 164: CAGGTGTGGGATACTGGTAGTGATCCCGTGGTA

BAK502G9

CADENA PESADA

CDR1- SEQ ID NO 165: AATTATGGTCTCAGC

CDR2- SEQ ID NO 166: TGGATCAGCGCTAATAATGGCGACACAAATTATGGACA
GGAATTCCAGGGC

CDR3- SEQ ID NO 167: GACTCCAGCAGCAGCTGGGCCCGCTGGTTTTTCGATCTC

BAK502G9

CADENA LIGERA

CDR1- SEQ ID NO 168: GGGGGAAACATCATTGGAAGTAACTTGTACAC
CDR2- SEQ ID NO 169: GATGATGGCGACCGGCCCTCA
CDR3- SEQ ID NO 170: CAGGTGTGGGATACTGGTAGTGATCCCGTGGTA

Dominios CH-SEQ ID NO: 171

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS
RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

Dominio CL-SEQ ID NO: 172

QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSK
QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

REIVINDICACIONES

1. Un miembro de unión específico aislado para IL-13 humana, que comprende un sitio de unión al antígeno de anticuerpo que está compuesto por un dominio VH de anticuerpo humano y un dominio VL de anticuerpo humano y que comprende un conjunto de CDR HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en el que el dominio VH comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y el dominio VL comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en el que el conjunto de CDR consiste en un conjunto de CDR seleccionadas del grupo que consiste en:
 - el conjunto de CDR de BAK278D6, definido en el que HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y
 - el conjunto de CDR de BAK502G9, definido en el que HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12;
 en el que el miembro de unión específico se une a IL-13 humana e IL-13 de rhesus o cynomolgus.
2. Un miembro de unión específico aislado según la reivindicación 1, en el que HCDR1, HCDR2 y HCDR3 del dominio VH están en un marco de línea germinal y/o LCDR1, LCDR2 y LCDR3 del dominio VL están en un marco de línea germinal.
3. Un miembro de unión específico aislado según la reivindicación 2, en el que HCDR1, HCDR2 y HCDR3 del dominio VH están en el marco de línea germinal VH1 DP-14.
4. Un miembro de unión específico aislado según la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en el que LCDR1, LCDR2 y LCDR3 del dominio VL están en el marco de línea germinal VL %3-3H.
5. Un miembro de unión específico aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que se une a una variante de IL-13 humana en la que la arginina en la posición 130 está reemplazada por glutamina.
6. Un miembro de unión específico según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 que comprende el dominio VH de BAK502G9 (SEQ ID NO: 15).
7. Un miembro de unión específico según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 que comprende el dominio VL de BAK502G9 (SEQ ID NO: 16).
8. Un miembro de unión específico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que neutraliza IL-13 humana.
9. Un miembro de unión específico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende una molécula de scFv de anticuerpo, o comprende una región constante de anticuerpo o comprende un anticuerpo completo, opcionalmente en el que el anticuerpo completo es IgG4.
10. Un dominio VH de anticuerpo aislado de un miembro de unión específico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. Un dominio VL de anticuerpo aislado de un miembro de unión específico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
12. Una composición que comprende un miembro de unión específico, dominio VH de anticuerpo o dominio VL de anticuerpo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y al menos un componente adicional.
13. Una composición según la reivindicación 12 que comprende un excipiente, vehículo o transportador aceptable farmacéuticamente.
14. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un miembro de unión específico o dominio VH o VL de anticuerpo de un miembro de unión específico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
15. Una célula anfitriona transformada in vitro con un ácido nucleico según la reivindicación 14.

16. Un método para producir un miembro de unión específico o dominio VH o VL de anticuerpo, comprendiendo el método cultivar las células anfitrionas según la reivindicación 15 bajo condiciones para la producción de dicho miembro de unión específico o dominio VH o VL de anticuerpo.

5 17. Un método según la reivindicación 16 que comprende además aislar y/o purificar dicho miembro de unión específico o dominio VH o VL variable de anticuerpo.

18. Un método según la reivindicación 16 o la reivindicación 17 que comprende además formular el miembro de unión específico o dominio VH o VL variable de anticuerpo en una composición que incluye al menos un componente adicional.

10 19. Un método para producir un dominio de unión al antígeno de anticuerpo específico para IL-13 humana, comprendiendo el método, proporcionar, por adición, delección, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un dominio VH parental que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3, en el que HCDR1, HCDR2 y HCDR3 del dominio VH parental son el conjunto de HCDR de BAK278D6, definido en el que HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 o el conjunto de HCDR de BAK502G9, definido en el que HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, un dominio VH que es una variante de la secuencia de aminoácidos del dominio VH parental y opcionalmente combinar el dominio VH así proporcionado con uno o más dominios VL para proporcionar una o más combinaciones VH/VL; y

20 ensayar dicho dominio VH que es una variante de la secuencia de aminoácidos del dominio VH parental o la combinación o combinaciones VH/VL para identificar un dominio de unión al antígeno de anticuerpo específico para IL-13 humana.

20. Un método según la reivindicación 19 en el que la secuencia de aminoácidos del dominio VH parental se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 13 y SEQ D NO: 15.

25 21. Un método según la reivindicación 19 o la reivindicación 20 en el que dichos uno o más dominios VL se proporcionan por adición, delección, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un dominio VL parental que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en el que LCDR1, LCDR2 y LCDR3 del dominio VL parental son el conjunto de LCDR de BAK278D6, definido en el que LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, o el conjunto de LCDR de BAK502G9, definido en el que LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, produciendo uno o más dominios VL cada uno de los cuales es una variante de la secuencia de aminoácidos del dominio VL parental.

22. Un método según la reivindicación 21 en el que la secuencia de aminoácidos del dominio VL parental se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14 y SEQ D NO: 16.

35 23. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22 en el que dicho dominio VH que es una variante de la secuencia de aminoácidos del dominio VH parental se proporciona por mutagénesis de CDR.

24. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23 que comprende además proporcionar el sitio de unión al antígeno de anticuerpo en una molécula de IgG, scFv o Fab de anticuerpo.

25. Un método para producir un miembro de unión específico que se une a IL-13 humana, comprendiendo el método:

40 proporcionar un ácido nucleico de partida que codifica un dominio VH o un repertorio de partida de ácidos nucleicos cada uno que codifica un dominio VH, en el que el dominio VH o los dominios VH comprenden una HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3 que se va a reemplazar o que carecen de una región que codifica HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3;

45 combinar dicho ácido nucleico de partida o repertorio de partida con ácido nucleico donante o ácidos nucleicos donantes que codifican o producidos por mutación de la secuencia de aminoácidos de HCDR1 (SEQ ID NO: 1) o HCDR1 (SEQ ID NO: 7), HCDR2 (SEQ ID NO: 2) o HCDR2 (SEQ ID NO: 8) y/o HCDR3 (SEQ ID NO: 3) o HCDR3 (SEQ ID NO: 9) de manera que dicho ácido nucleico o ácidos nucleicos donantes se insertan en la región CDR1. CDR2 y/o CDR3 en el ácido nucleico de partida o repertorio de partida, para proporcionar un repertorio de productos de ácidos nucleicos que codifican dominios VH;

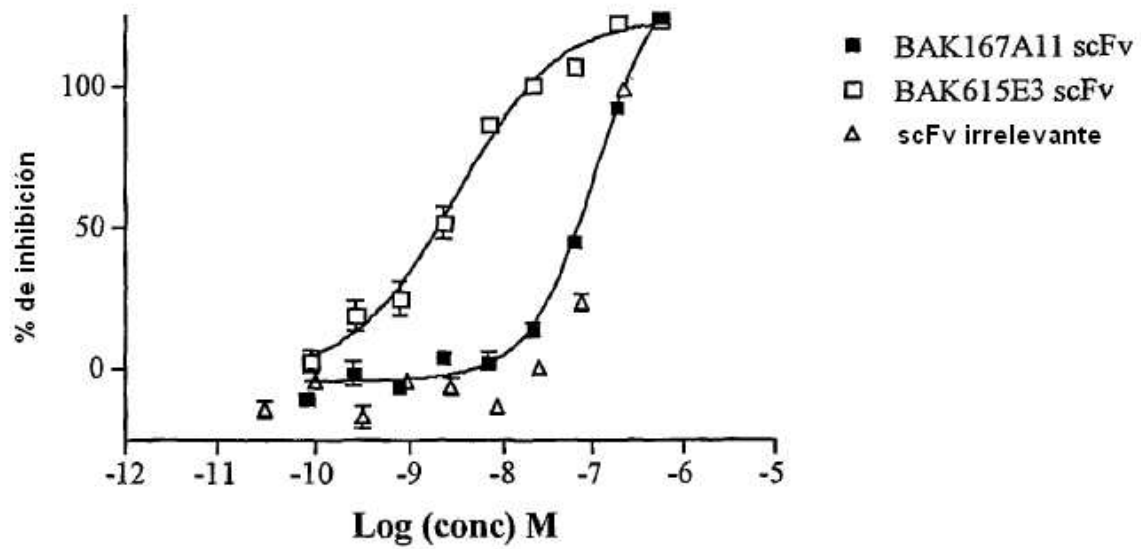
expresar los ácidos nucleicos de dicho repertorio de productos para producir como productos dominios VH;

opcionalmente combinar dichos dominios VH productos con uno o más dominios VL;

seleccionar un miembro de unión específico para IL-13 humana, comprendiendo dicho miembro de unión específico un dominio VH producto y opcionalmente un dominio VL; y

recuperar dicho miembro de unión específico o ácido nucleico que lo codifica.

- 5 26. Un método según la reivindicación 25 en el que los ácidos nucleicos donantes se producen por mutación de dicha HCDR1 y/o HCDR2.
27. Un método según la reivindicación 25 en el que el ácido nucleico donante se produce por mutación de HCDR3.
28. Un método según la reivindicación 27 que comprende proporcionar el ácido nucleico donante por mutación del ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de HCDR3 (SEQ ID NO: 3) o HCDR3 (SEQ ID NO: 9).
- 10 29. Un método según la reivindicación 25 que comprende proporcionar el ácido nucleico donante por mutación aleatoria de ácido nucleico.
30. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 29 que comprende además unir un dominio VH producido que está comprendido en el miembro de unión específico recuperado a una región constante de anticuerpo.
31. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 29 que comprende proporcionar una molécula de IgG, scFv o Fab de anticuerpo que comprende el dominio VH producido y un dominio VL.
- 15 32. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 31 que comprende además ensayar el dominio de unión al antígeno del anticuerpo o miembro de unión específico que se une a IL-13 humana para su capacidad de neutralizar IL-13 humana para identificar un dominio de unión al antígeno del anticuerpo o miembro de unión específico que se une y neutraliza IL-13 humana.
- 20 33. Un método según la reivindicación 32 en el que el fragmento de anticuerpo es una molécula scFv de anticuerpo o una molécula Fab de anticuerpo, opcionalmente en el que el método comprende además proporcionar el dominio VH y/o el dominio VL del fragmento de anticuerpo en un anticuerpo completo.
34. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 33 que comprende además formular el miembro de unión específico que se une a IL-13, sitio de unión al antígeno de anticuerpo o un dominio variable VH o VL de anticuerpo del miembro de unión específico o sitio de unión al antígeno de anticuerpo que se une a IL-13, en una
25 composición que incluye al menos un componente adicional.
35. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 34 que comprende además unir un miembro de unión específico que se une a IL-13 humana a IL-13 o un fragmento de IL-13, en el que dicha unión tiene lugar *in vitro*.
36. Un método que comprende unir un miembro de unión específico que se une a IL-13 humana según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 a IL-13 humana o un fragmento de IL-13 humana, en el que dicha unión tiene lugar *in vitro*.
- 30 37. Un método según la reivindicación 35 ó 36 que comprende determinar la cantidad de unión del miembro de unión específico a IL-13 o un fragmento de IL-13.
38. Uso de un miembro de unión específico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que consiste en asma, dermatitis atópica, rinitis alérgica, fibrosis, enfermedad inflamatoria del intestino y linfoma de Hodgkin.

Figura 1

scFv irrelevante

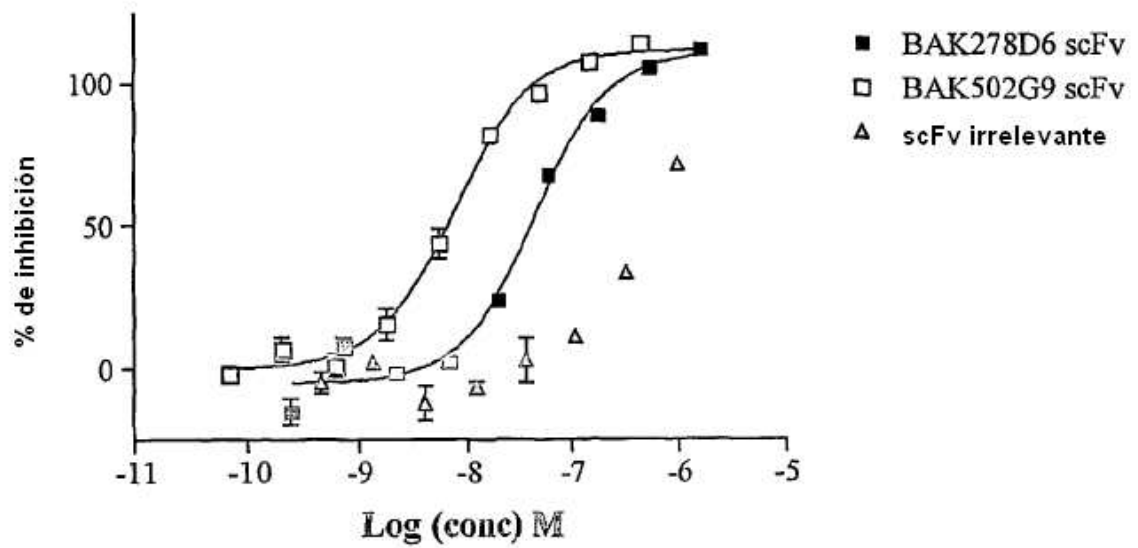
Figura 2

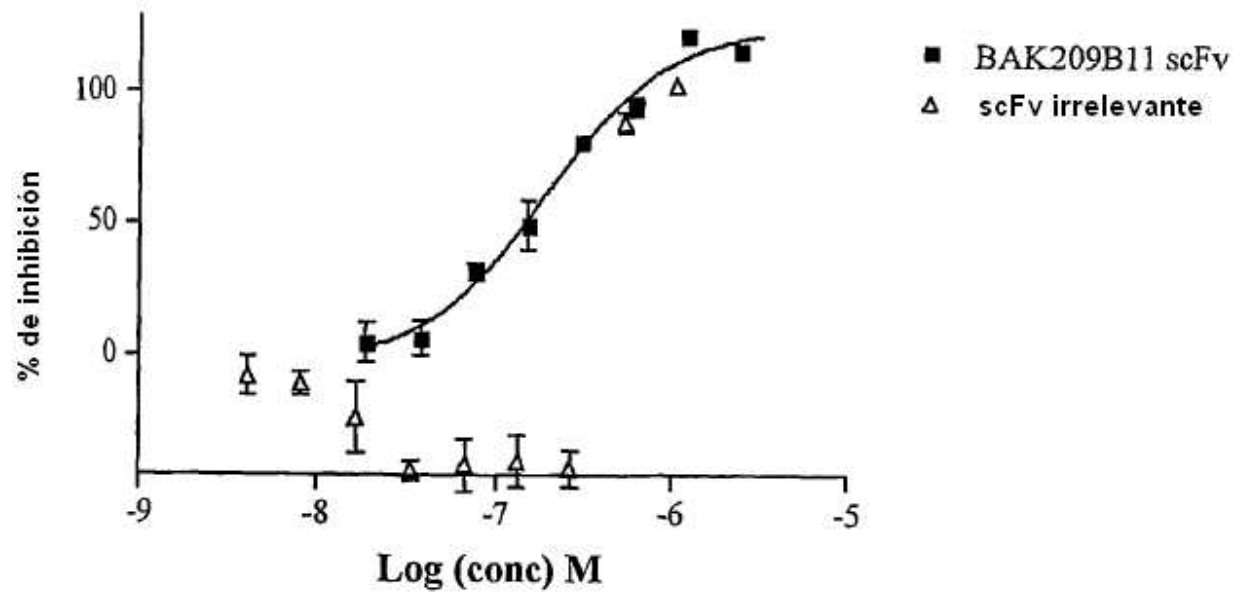
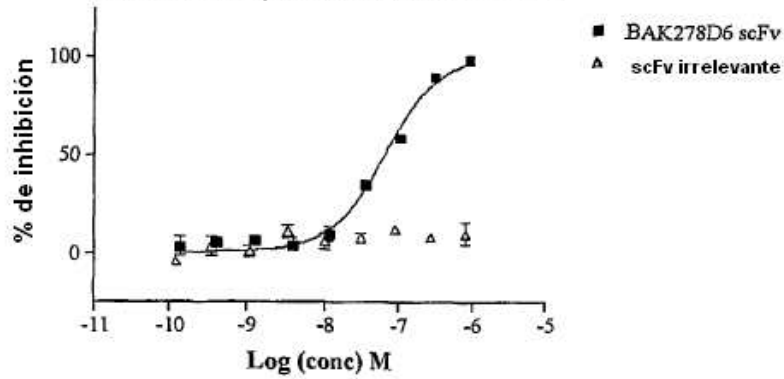
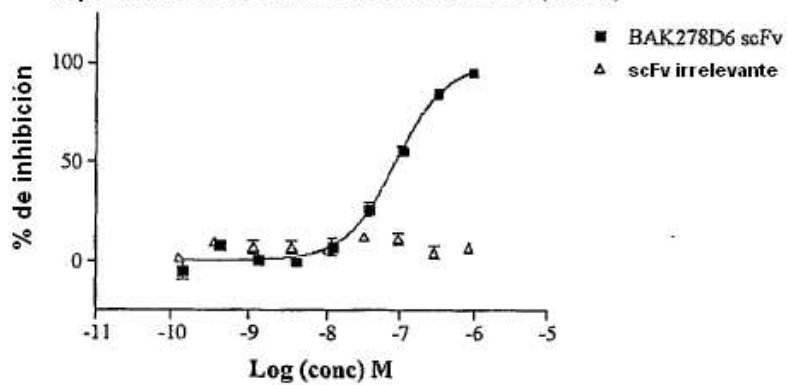
Figura 3

Figura 4A

Inhibición de la proliferación de células TF-1 dependiente de IL-13 humana

**Figura 4B**

Inhibición de la proliferación de células TF-1 dependiente de la variante de IL-13 humana (Q130R)

**Figura 4C**

Inhibición de la proliferación de células TF-1 dependiente de IL-13 de primates no humanos

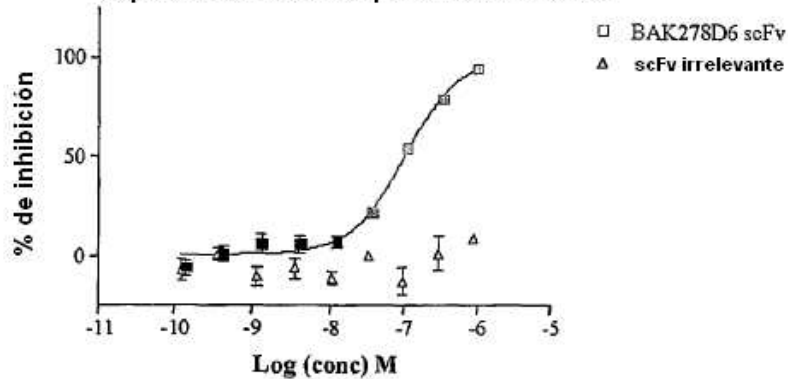


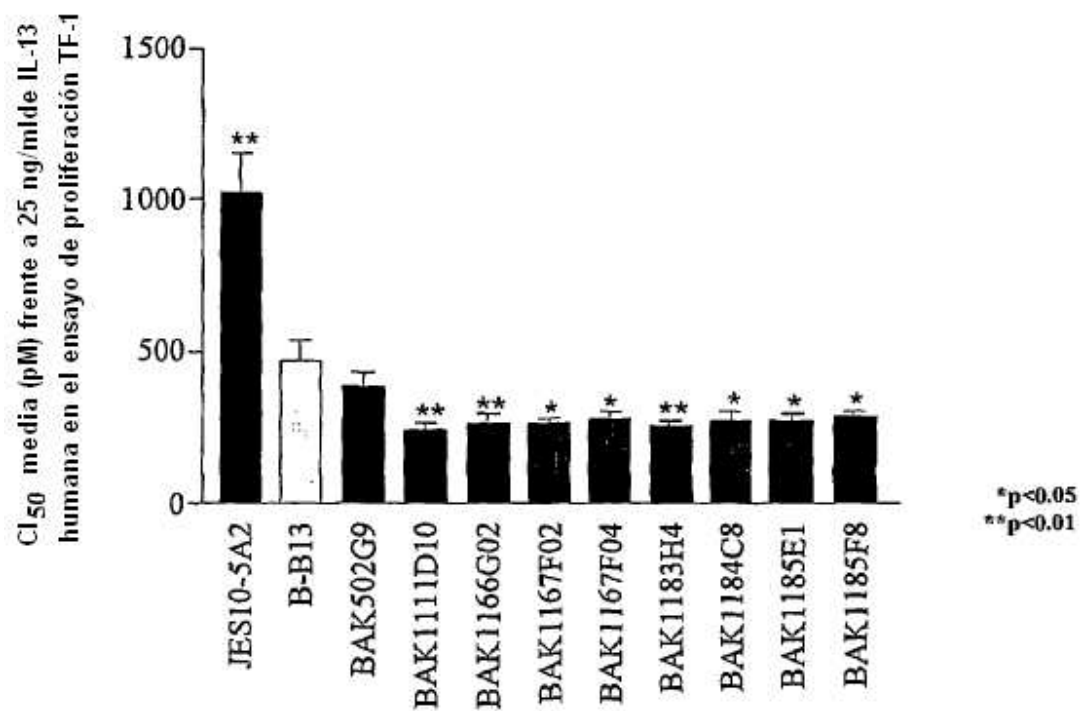
Figura 5

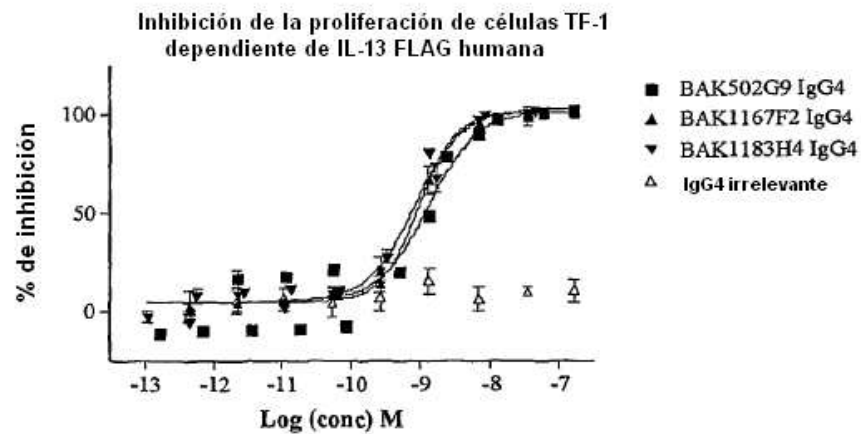
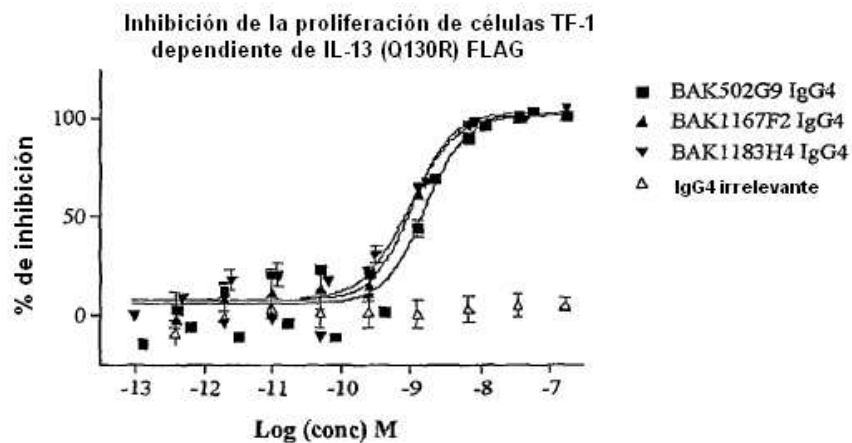
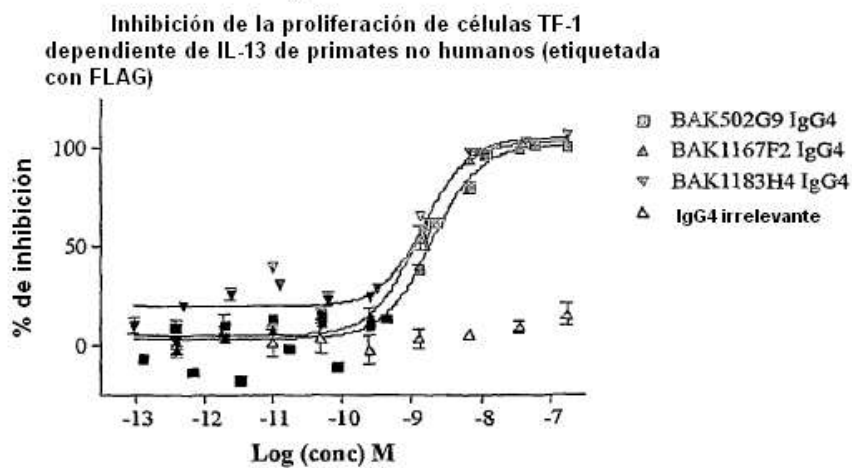
Figura 6A**Figura 6B****Figura 6C**

Figura 7

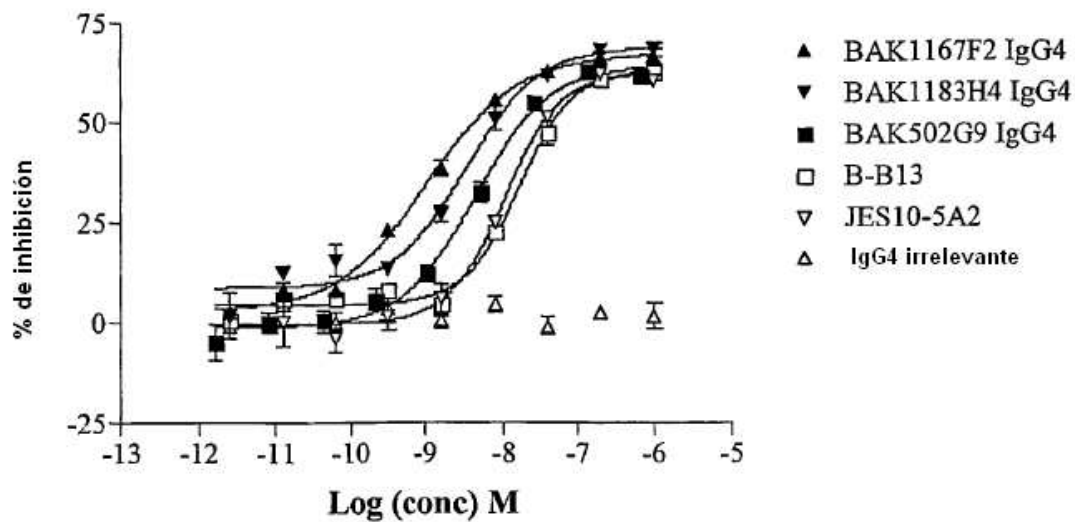


Figura 8

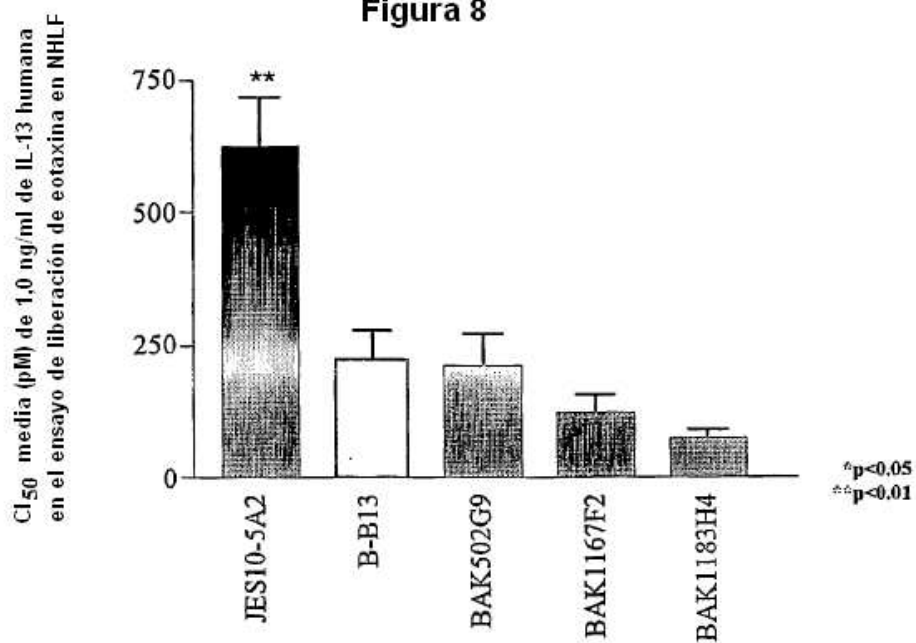
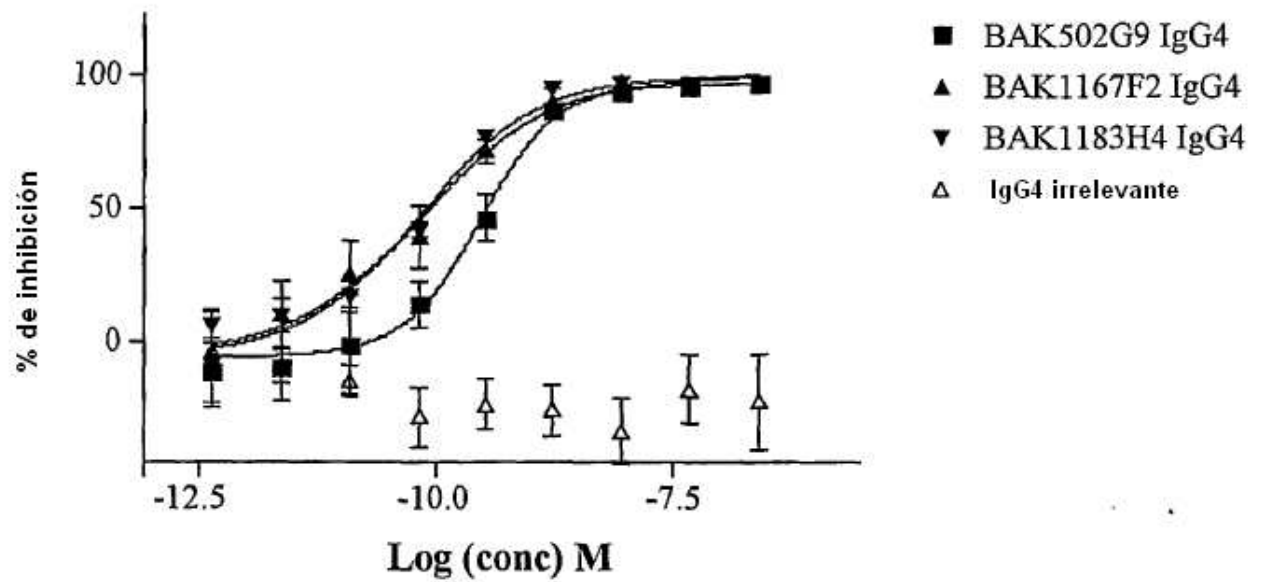
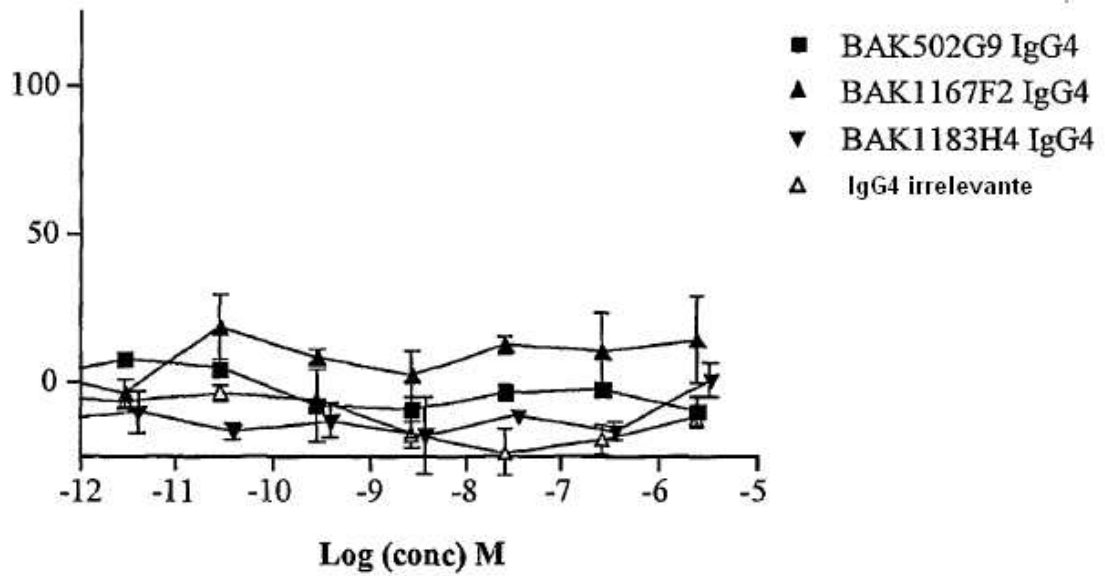


Figura 9



% de inhibición de 1 ng/ml de IL-4 humana
en el ensayo de regulación al alza de VCAM-1 en HUVEC

Figura 10A



% de inhibición de 0,5 ng/ml de IL-1 β humana
en el ensayo de regulación al alza de VCAM-1 en HUVEC

Figura 10B

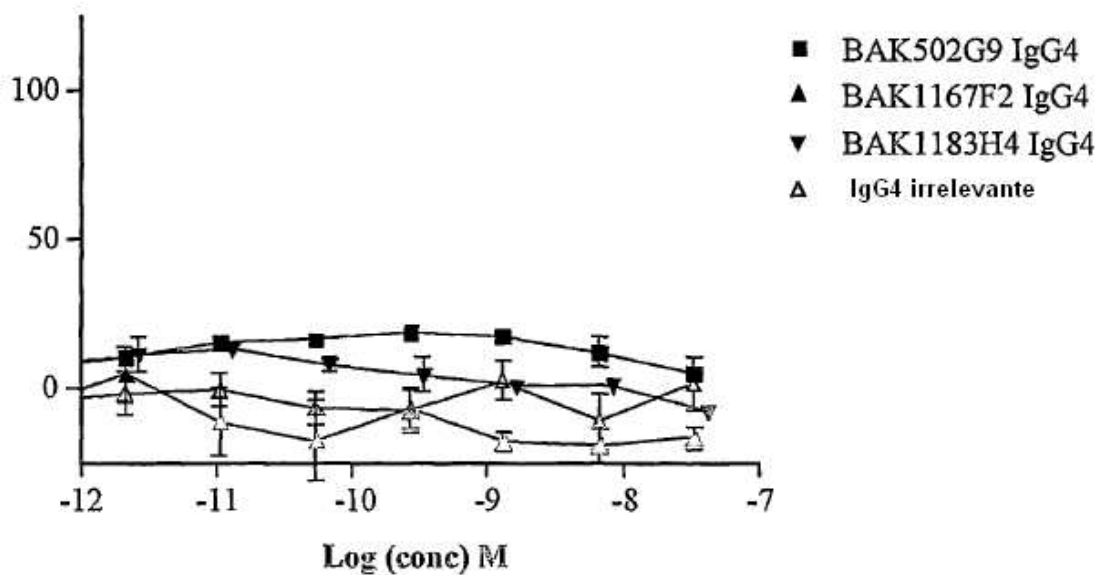


Figura 11

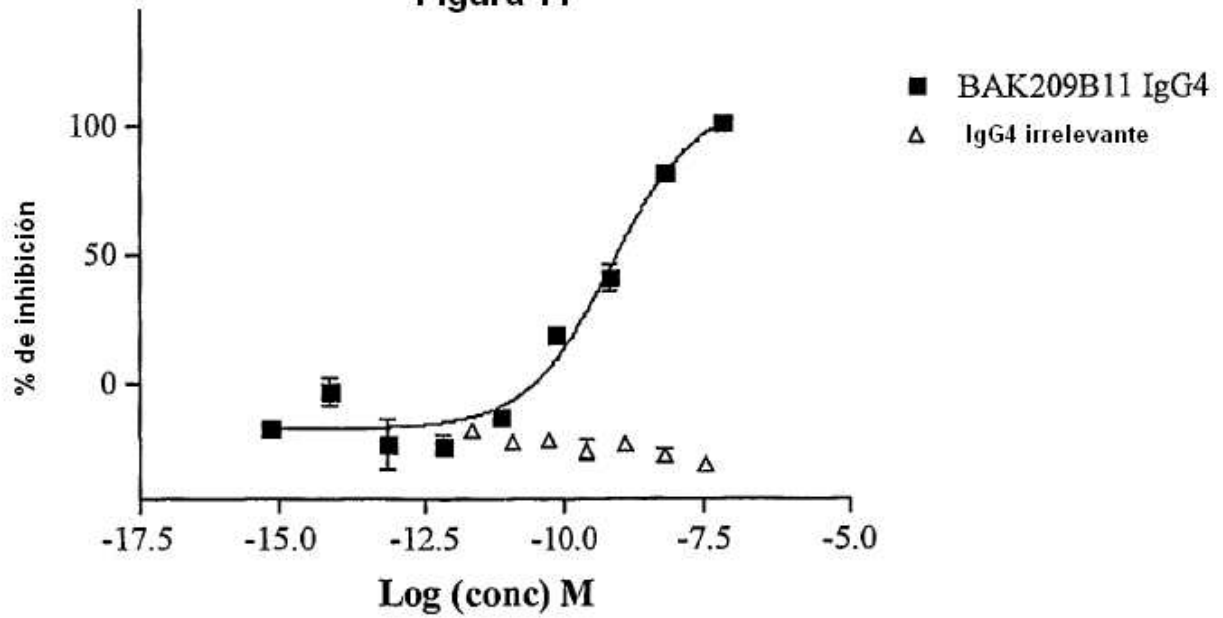


Figura 12

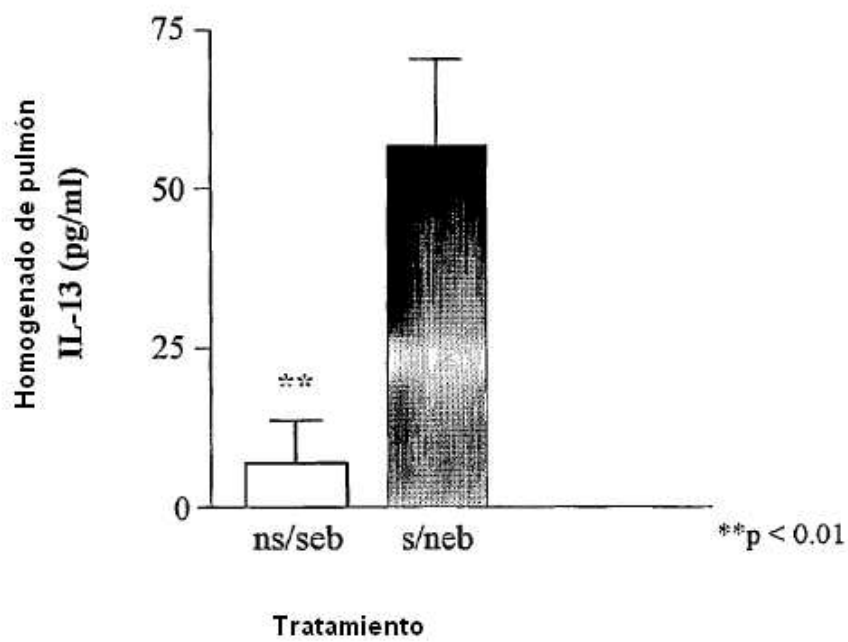


Figura 13

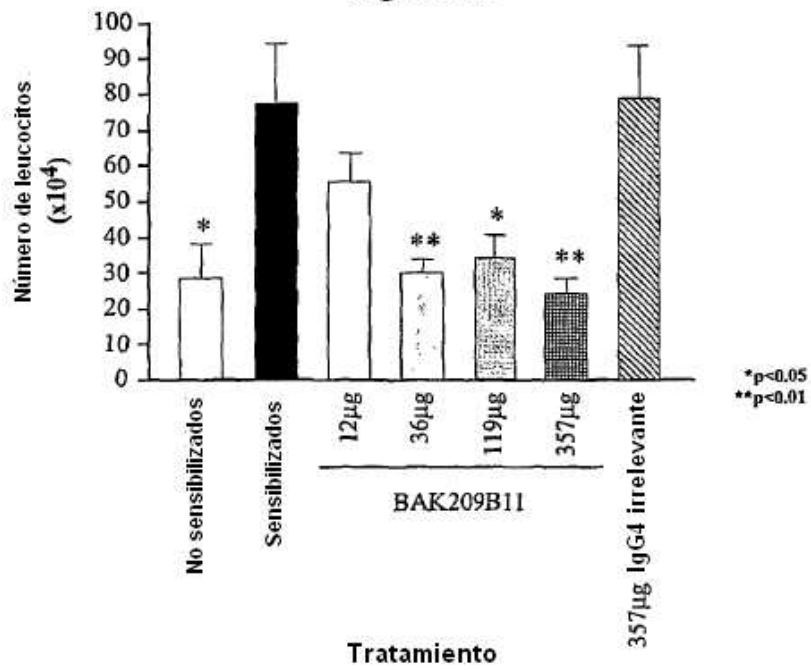


Figura 14

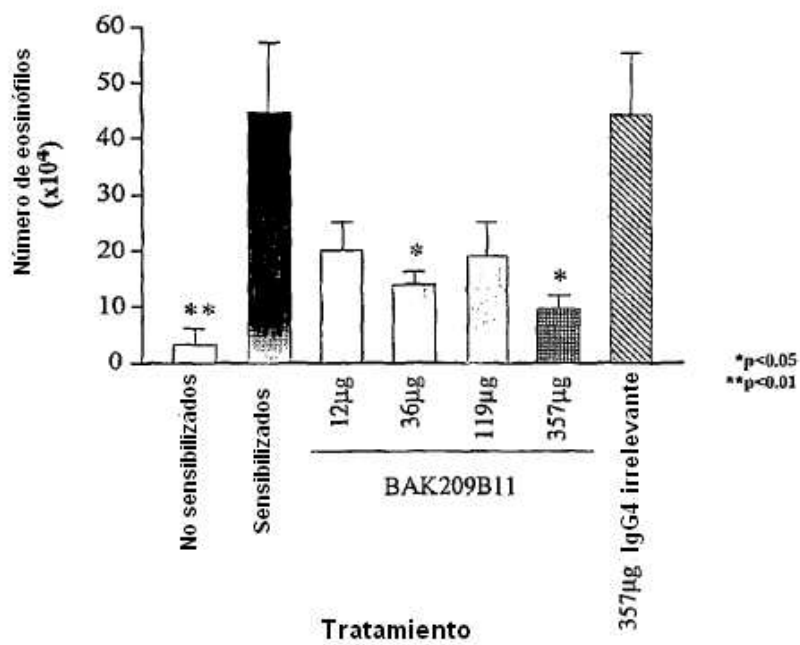


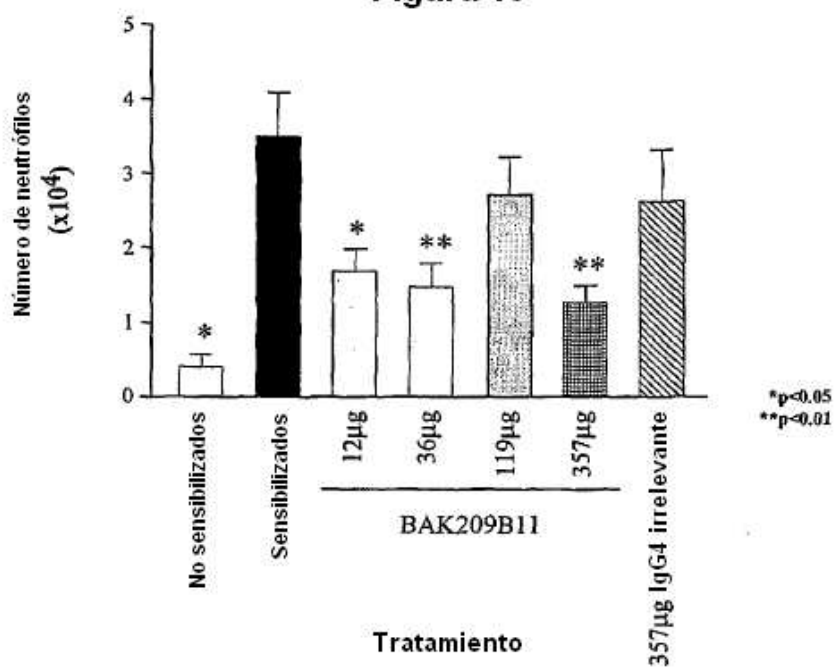
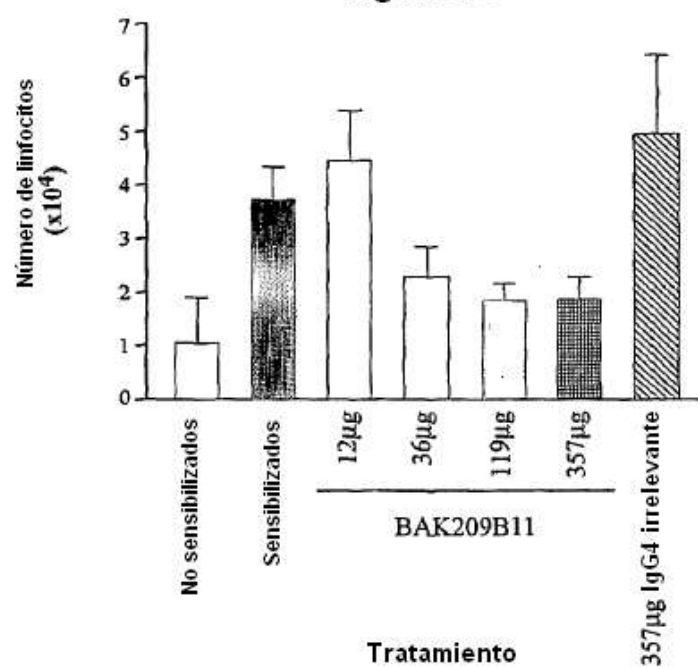
Figura 15**Figura 16**

Figura 17

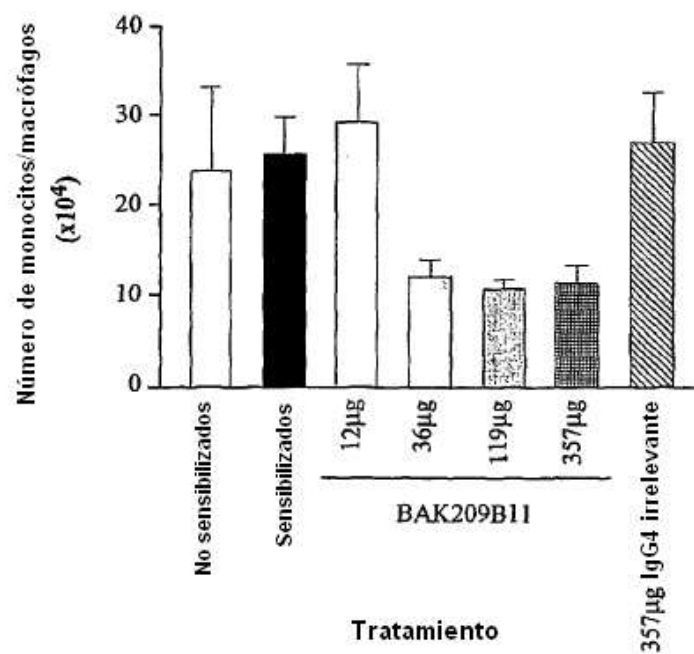


Figura 18

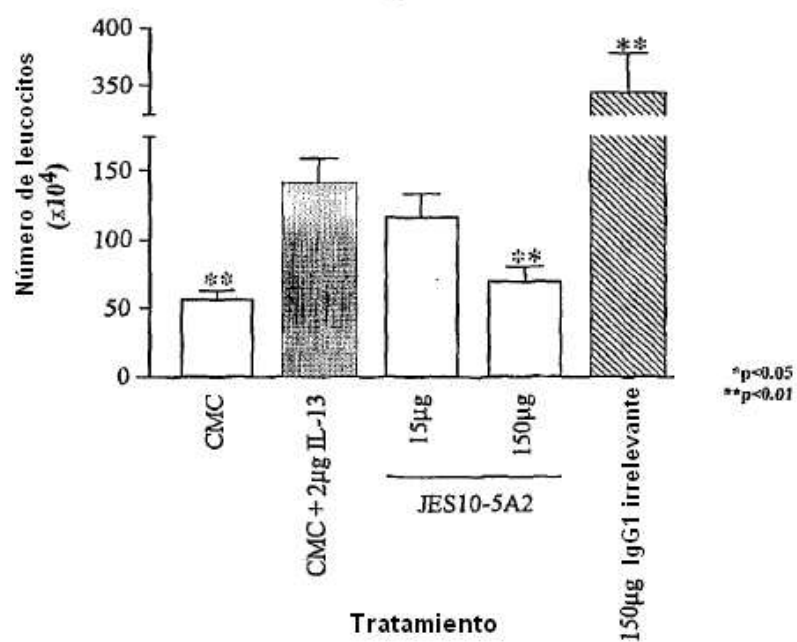


Figura 19

	10	20	30	40
IL-13 Humana	MALLLTTVIALTCLGGFASPG	PVPPSTAL	RELIEELVNIT	
IL-13 de Cynomolgus	MALLLTTVIALTCLGGFASPS	PVPPSTAL	KELIEELVNIT	
	MALLLTTVIALTCLGGFASP	PVPPSTAL	ELIEELVNIT	
	50	60	70	80
IL-13 Humana	QNQKAPLCNGSMVWSINLTAGM	YCAALES	LINVSGCSAIE	
IL-13 de Cynomolgus	QNQKAPLCNGSMVWSINLTAGV	YCAALES	LINVSGCSAIE	
	QNQKAPLCNGSMVWSINLTAG	YCAALES	LINVSGCSAIE	
	90	100	110	120
IL-13 Humana	KTQRMLS	GFCHPKVSAGQFSSL	HVRDTKIEVAQFVKDLL	L
IL-13 de Cynomolgus	KTQRMLS	GFCHPKVSAGQFSSL	RVRDTKIEVAQFVKDLL	V
	KTQRMLS	GFCHPKVSAGQFSSL	VRDTKIEVAQFVKDLL	
	130			
IL-13 Humana	HLKKLFREG	R	FN	
IL-13 de Cynomolgus	HLKKLFREG	Q	FN	
	HLKKLFREG	FN		

Figura 20

Efecto de una única dosis de 10 mg/kg de BAK502G9 (IgG4) en los niveles de IgE en suero en monos cynomolgus alérgicos pero no sometidos a pulso

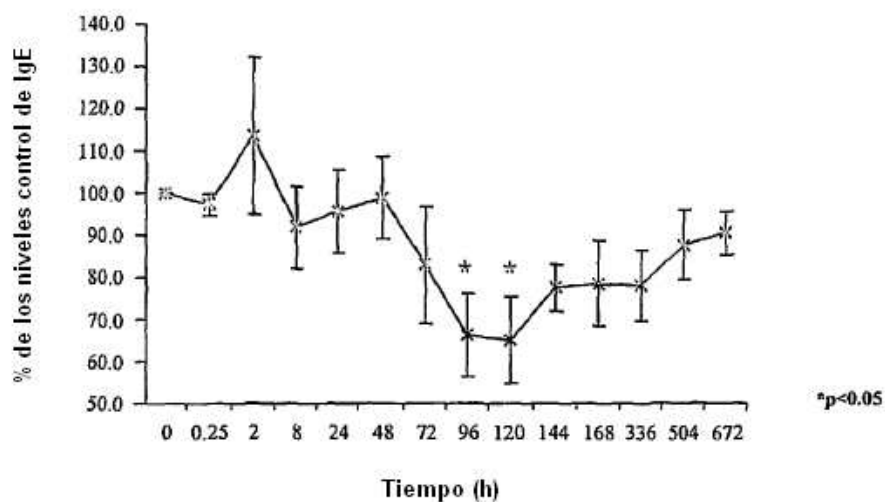


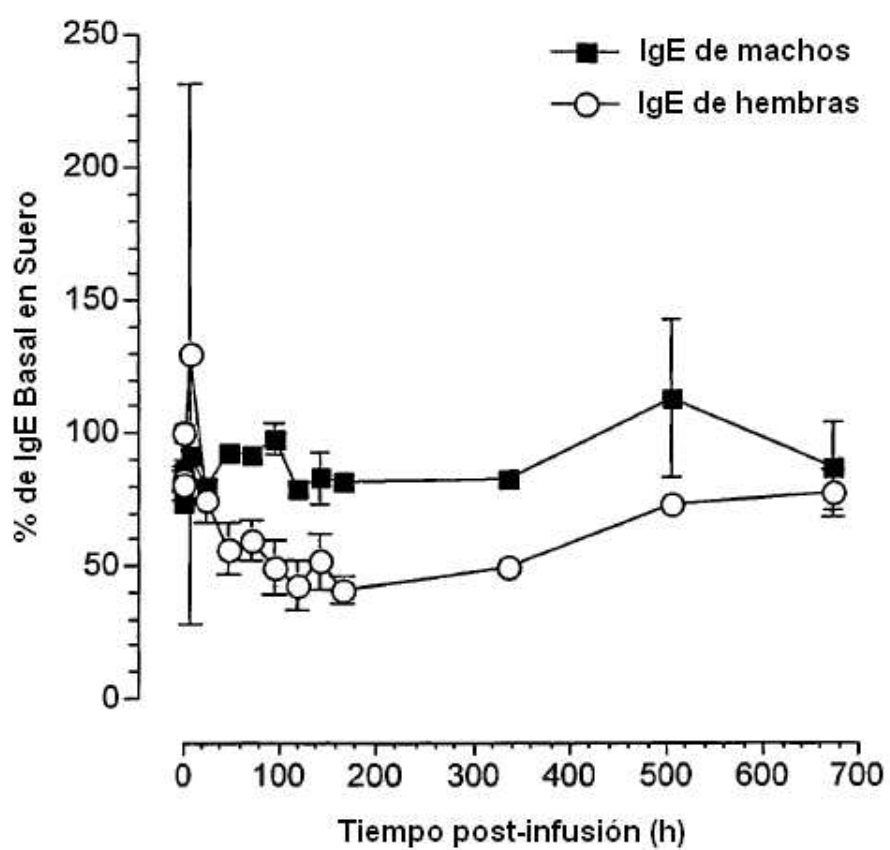
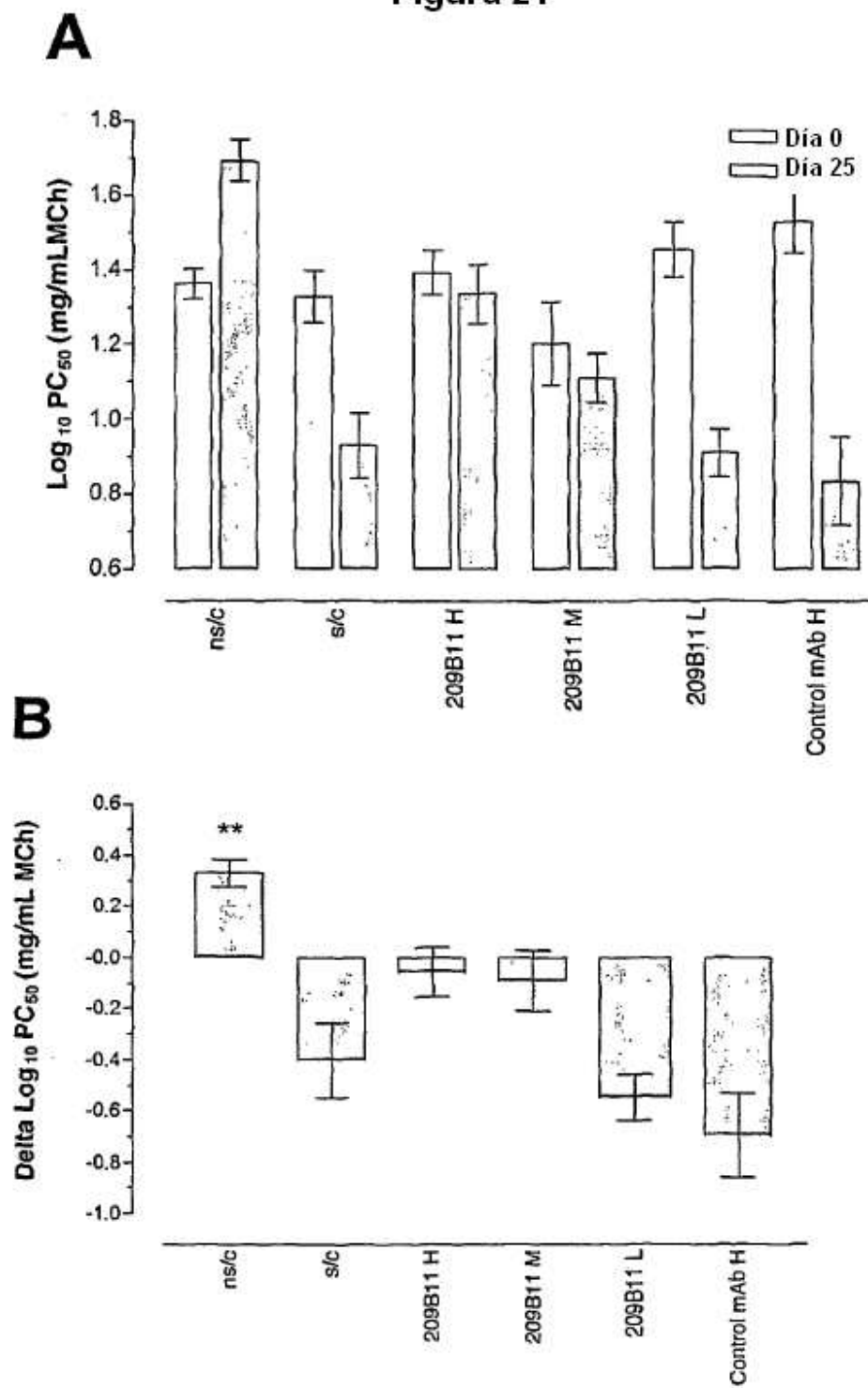
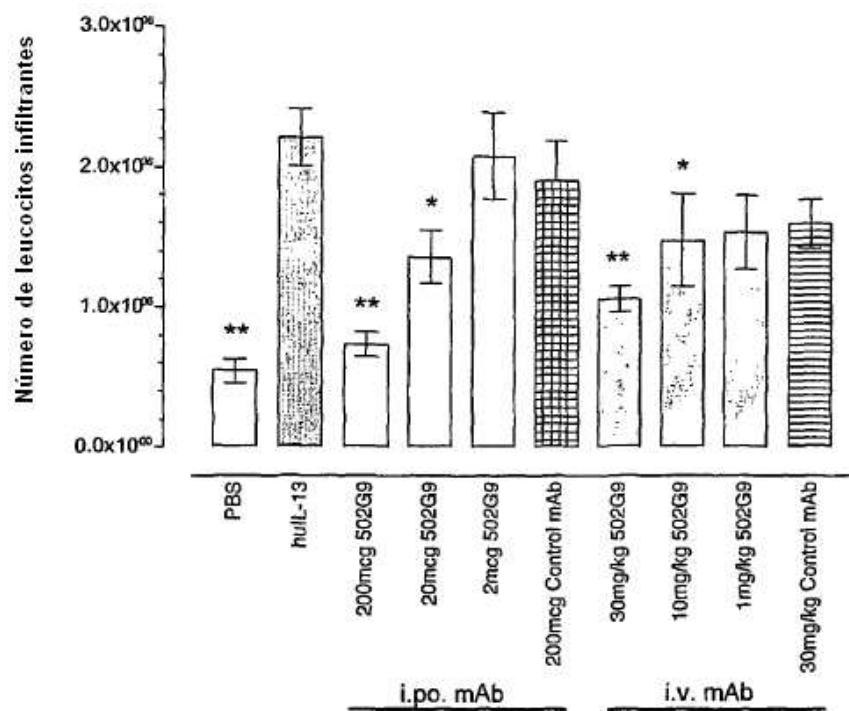
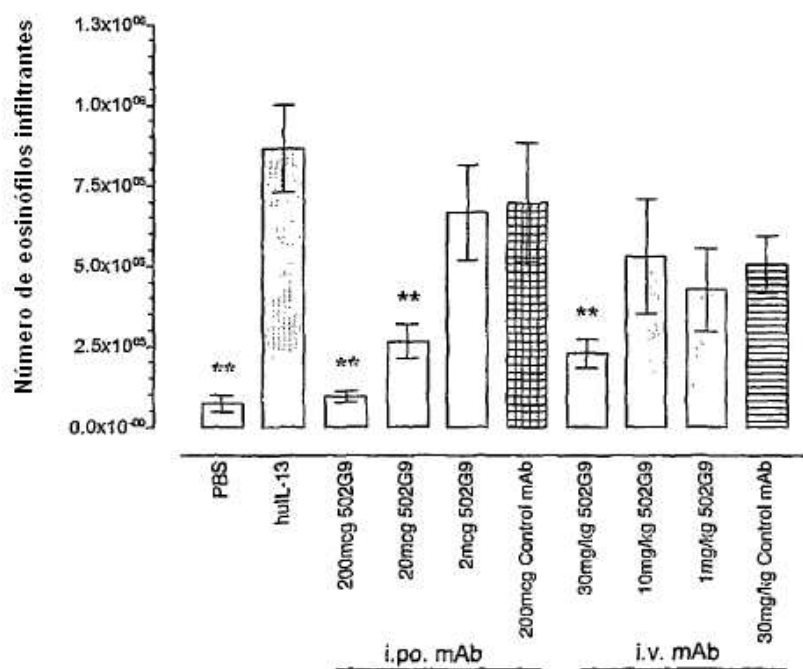
Figura 20B

Figura 21



** p<0.01 vs s/c control; ANOVA de una vía seguido por ensayo de Dunnett de comparaciones múltiples

Figura 22

A**B**

A y B; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs hULL-13 control; ANOVA de una vía en datos transformados log, seguido de ensayo de Dunnett de comparaciones múltiples

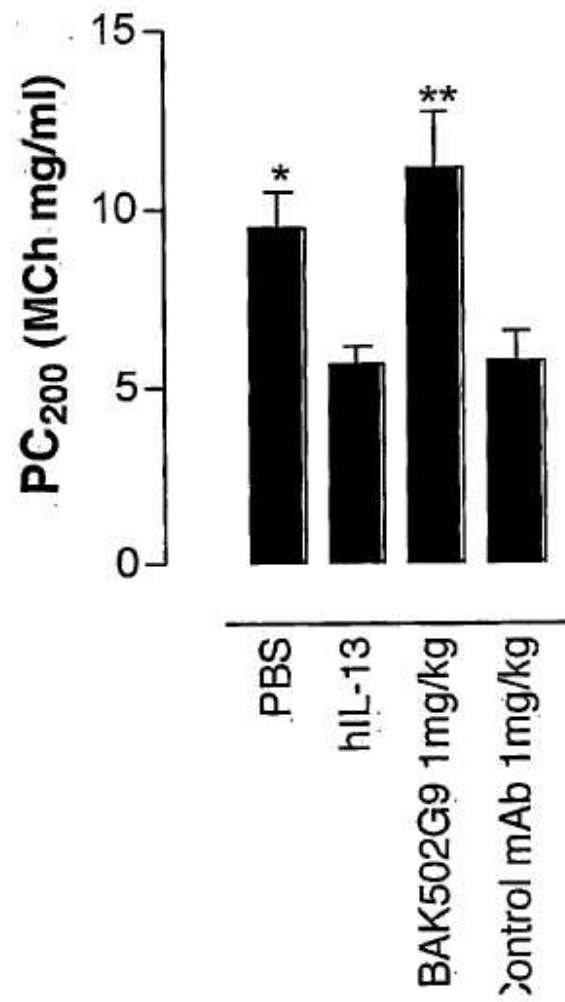
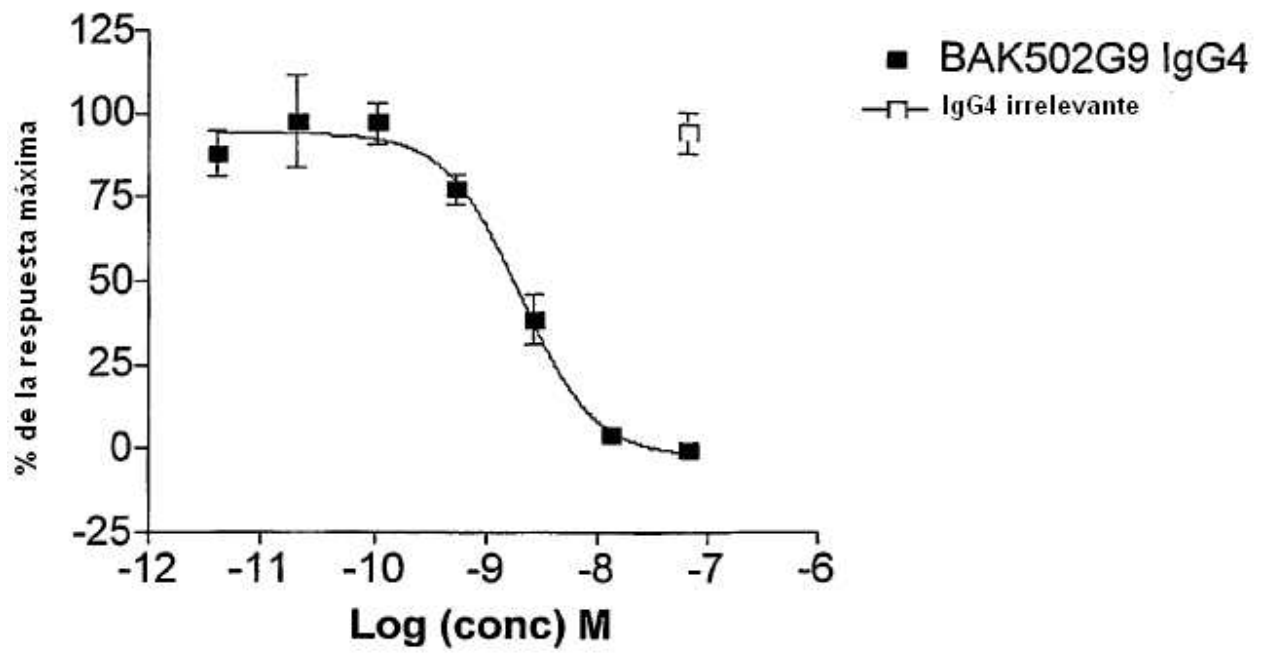
Figura 23

Figura 24

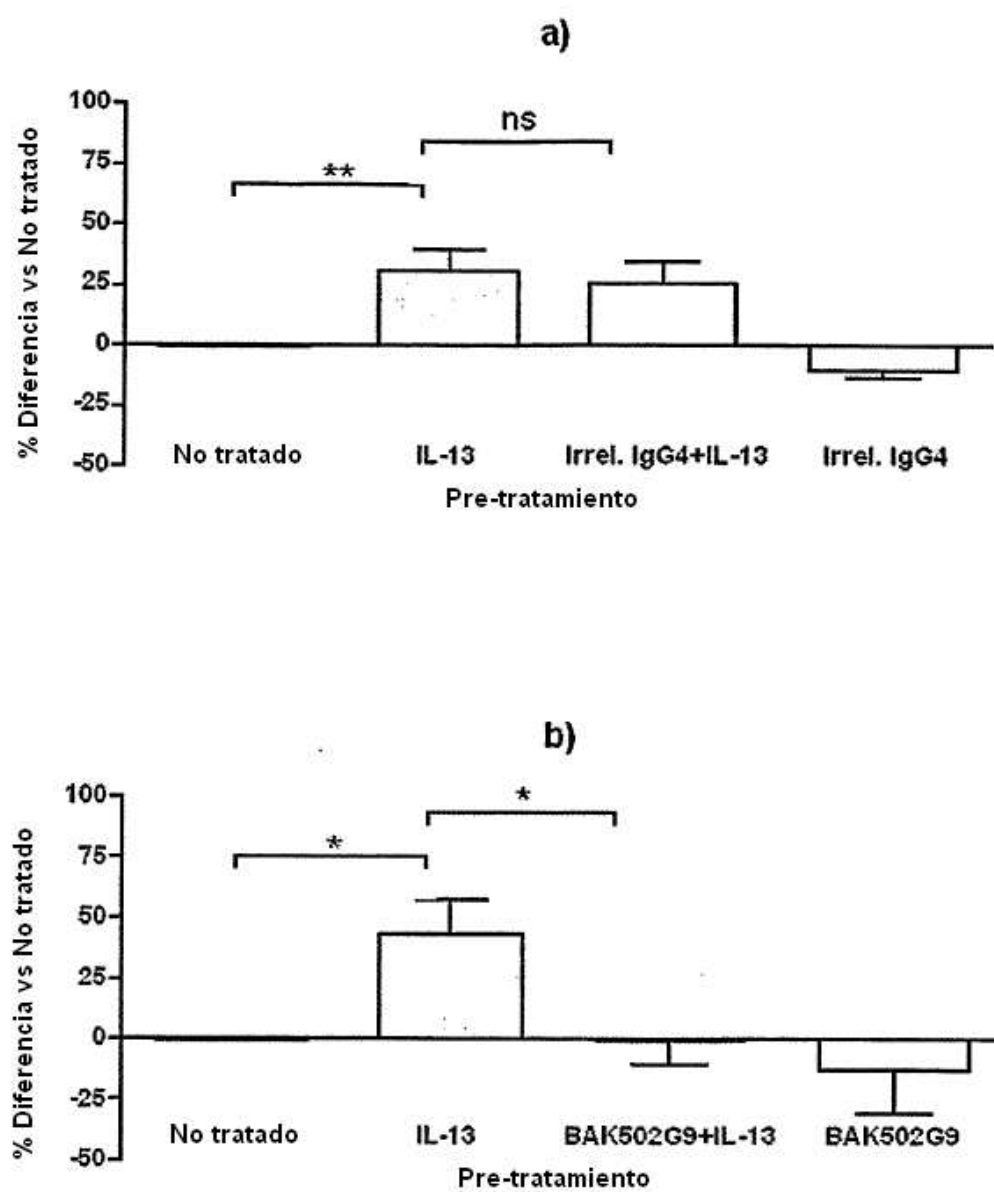


Figura 25

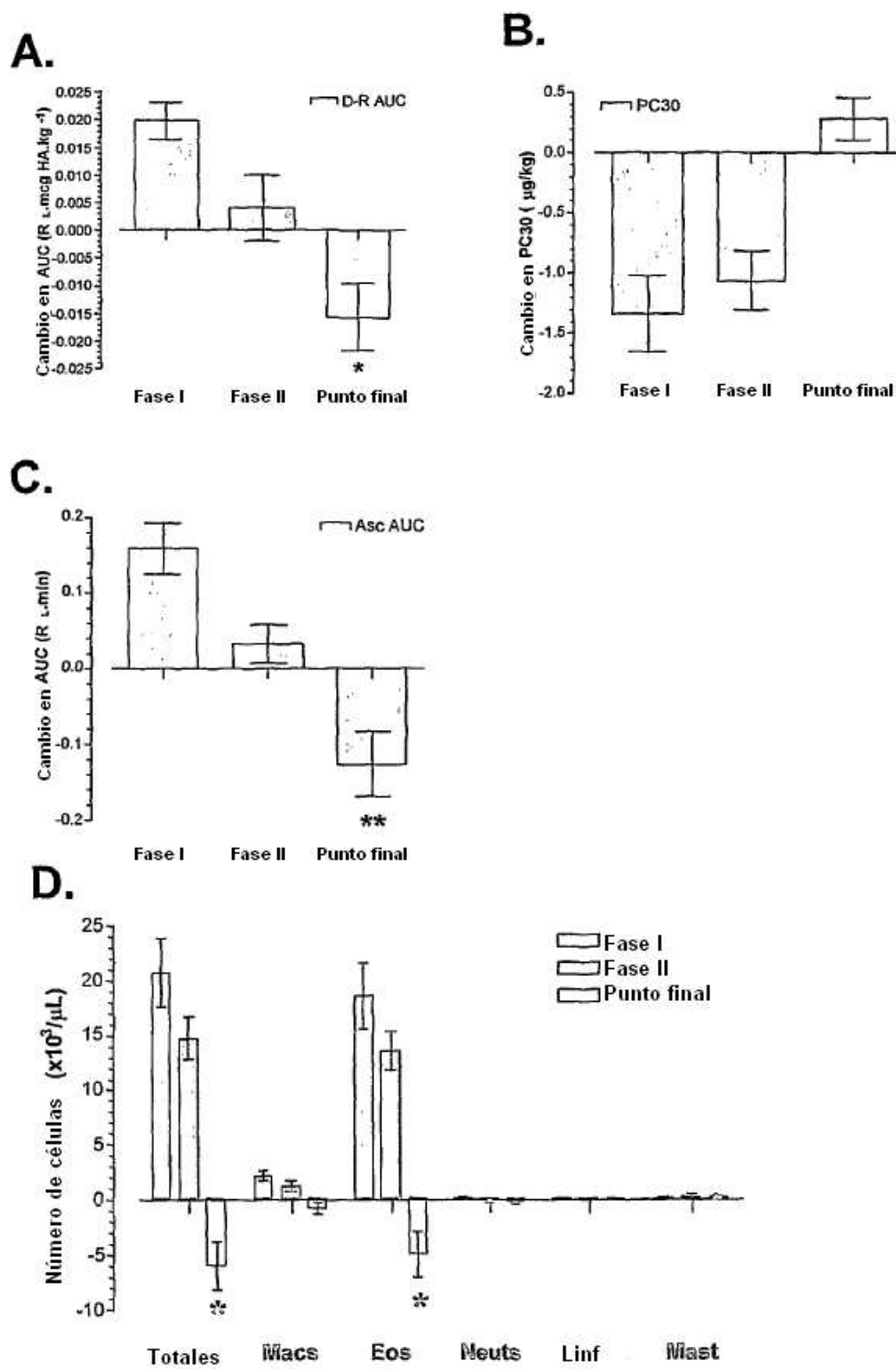


Figura 26

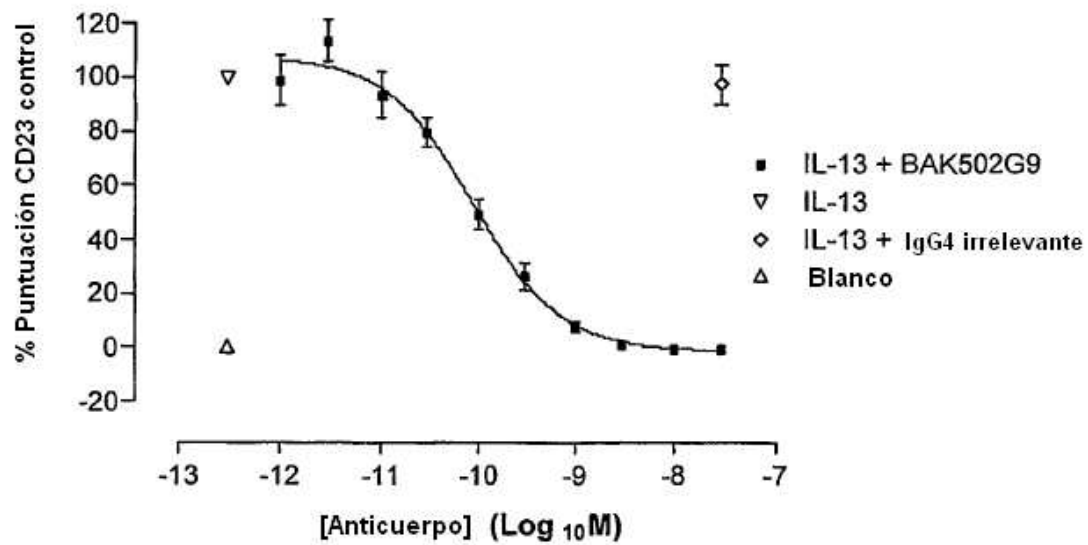


Figura 27

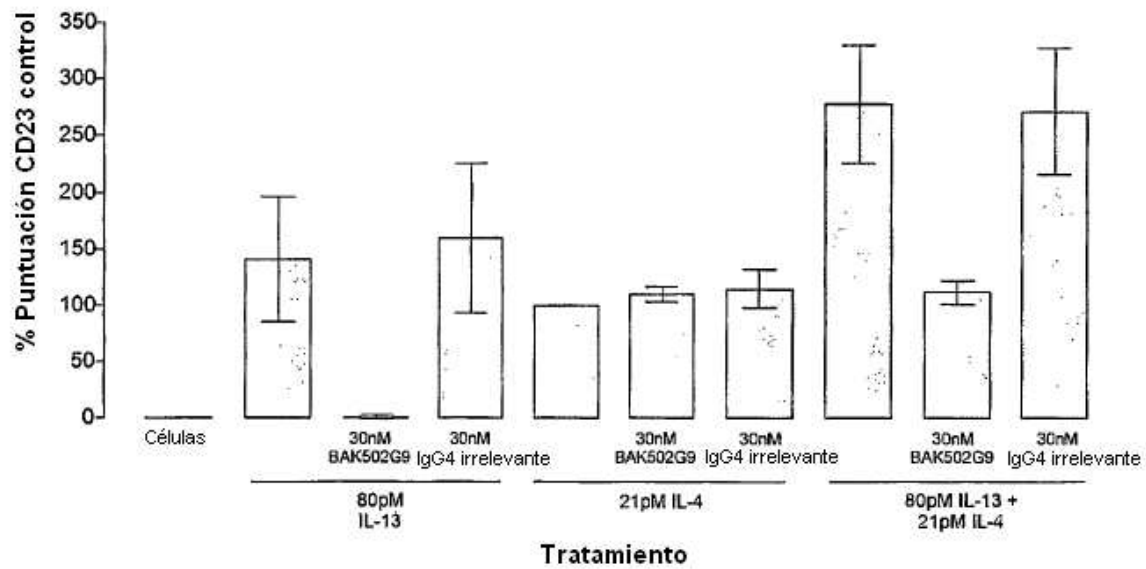


Figura 28

Figura 29A

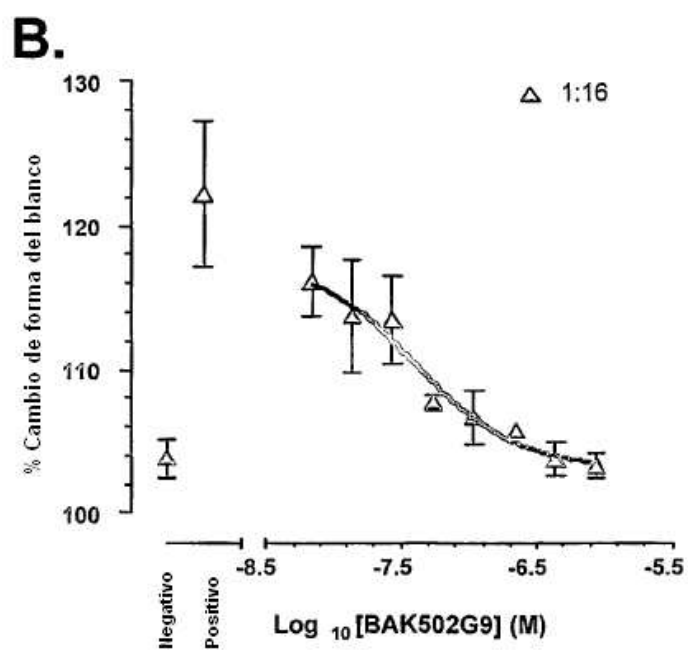
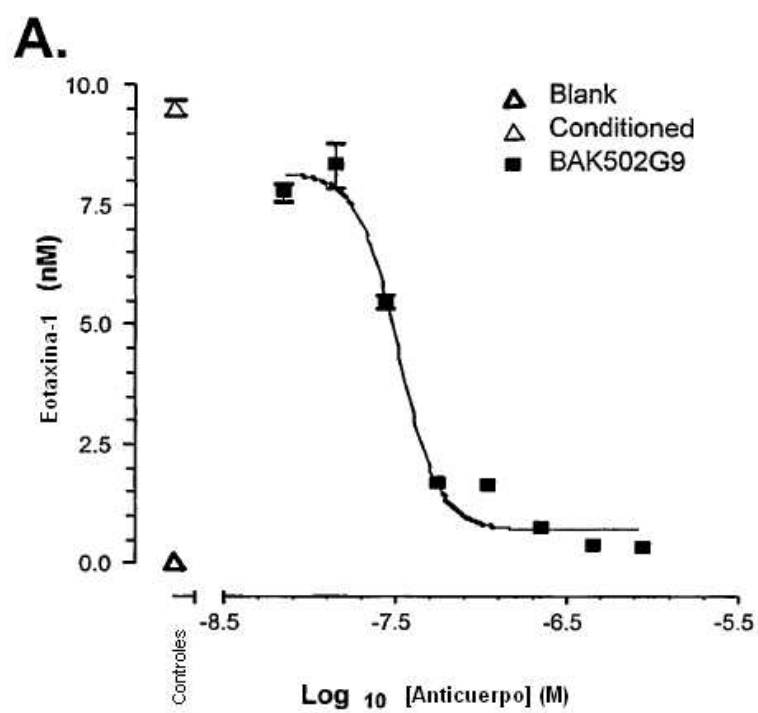


Figura 29B

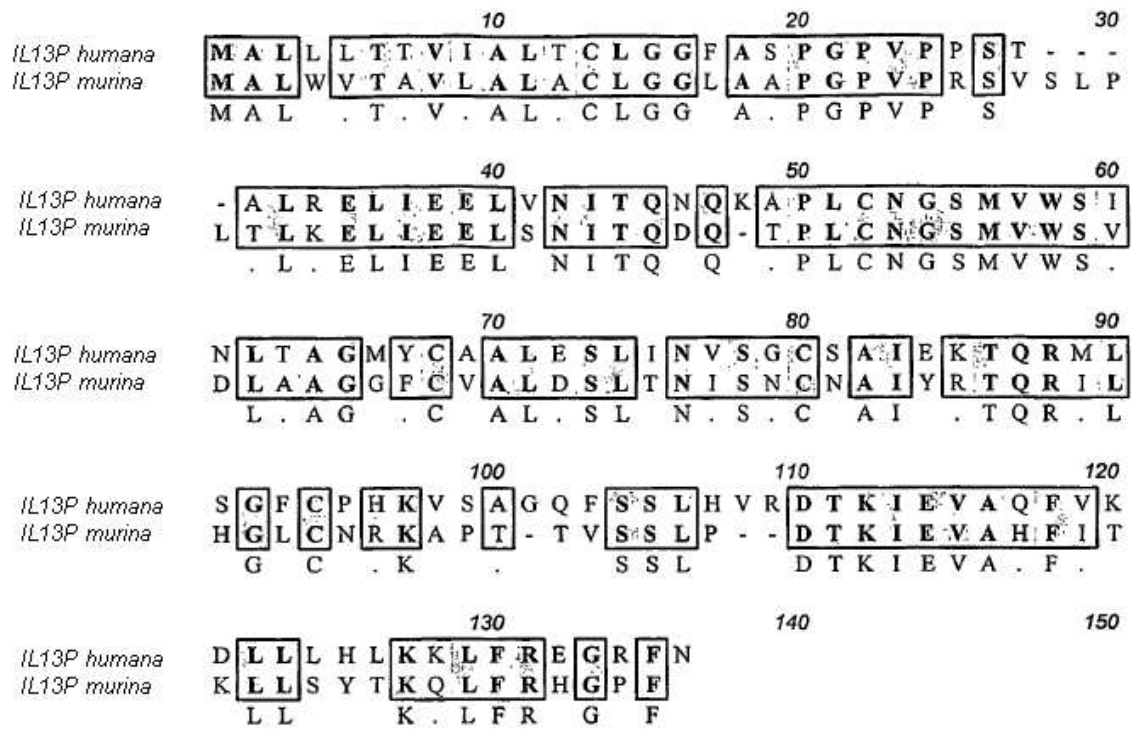


Figura 30

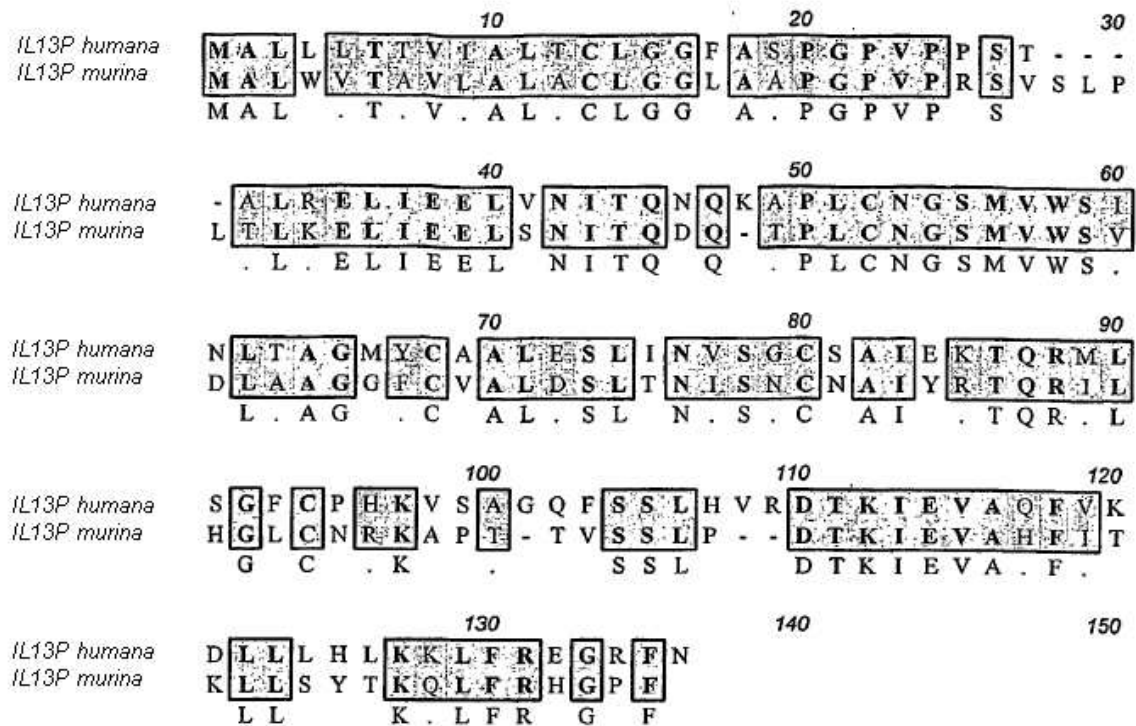


Figura 31

10 20 30 40 50
MALLTTVIA LTCCLGGFASP GPVPPSTALR ELIEELVNIT QNOKAPLCNG
60 70 80 90 100
SMVWSINLTA GMYCAALES INVSAGCSAIEK TORMLSGFCP HKVSAGQFS
110 120 130
SLHVRDTKIE VAQFVKDLL HLKCLFREGR FN

Figura 32