



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 210**

51 Int. Cl.:

<b>G06G 7/48</b> (2006.01)	<b>G06G 7/58</b> (2006.01)
<b>A61P 1/00</b> (2006.01)	<b>A61P 37/06</b> (2006.01)
<b>A61K 39/395</b> (2006.01)	<b>A61K 38/17</b> (2006.01)
<b>G01N 33/68</b> (2006.01)	<b>G01N 33/50</b> (2006.01)
<b>C07K 16/28</b> (2006.01)	<b>C07K 16/24</b> (2006.01)
<b>C07K 14/715</b> (2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02742057 .9**

96 Fecha de presentación : **14.06.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1552462**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.07.2005**

54

Título: **Procedimientos de tratamiento y prevención de colitis en la que se implican la IL-13 y los linfocitos T citolíticos naturales.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**26.09.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**26.09.2011**

73

Titular/es: **Government of the United States of America, as represented by the Secretary, Department of Health National Institutes of Health, Office of Technology Transfer, 6011 Executive Boulevard, Suite 325 Rockville, Maryland 20852-3804, US Brigham and Women's Hospital, Inc.**

72

Inventor/es: **Strober, Warren; Fuss, Ivan, J.; Heller, Frank y Blumberg, Richard**

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 365 210 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

Procedimientos de tratamiento y prevención de colitis en la que se implican la il-13 y los linfocitos t citolíticos naturales.

### Antecedentes de la invención

#### 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso de determinados anticuerpos que modulan los efectos inductores de colitis de células NK-T, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de colitis ulcerosa. Adicionalmente se proporciona un procedimiento para explorar sustancias para determinar su eficacia en cuanto a la reducción de la respuesta inflamatoria de la colitis y la prevención de la colitis.

#### 10 Técnica anterior

Se piensa que las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) humanas, la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU), se deben a una sensibilidad anómala de linfocitos T en la mucosa contra antígenos bacterianos en el lumen intestinal (Sartor, 1995). En la EC, los linfocitos T respondedores muestran un fenotipo Th1 y por tanto producen grandes cantidades de interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y de factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ). La secreción de IL-12, la fuerza conductora de la diferenciación de Th1 también aumenta (Parronchi y col., 1997). En la CU, los linfocitos T respondedores están menos bien definidos. En este caso, mientras que la producción de citocina Th1 es normal o está disminuida y alguna producción de citocina Th2 (IL-5 e IL-10) está aumentada, la producción de IL-4, la citocina "representativa" de la respuesta Th2, no está aumentada (Fuss y col., 1996). Además, en la técnica se sabe que los anticuerpos anti-CD4 son adecuados para tratar la colitis ulcerosa en seres humanos (Sandbom y col., 2002 y Okamoto y col., 1999).

### Sumario de la invención

La presente invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-V $\alpha$ 14J $\alpha$ 281, un anticuerpo anti-V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18 o un anticuerpo anti-NK1.1 que inhibe la activación de células NK-T y que reduce el número de células NK-T en el sujeto para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de la colitis ulcerosa en un sujeto.

25 La presente invención también proporciona el uso de un anticuerpo que inhibe la presentación del antígeno a las células NK-T y que se une específicamente a CD1, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de la colitis ulcerosa en un sujeto.

La invención también proporciona el uso de una sustancia que inhibe la actividad IL-13 para preparar un medicamento para el tratamiento o prevención de la colitis ulcerosa en un sujeto, en el que la sustancia es un anticuerpo que se une a IL-13, un anticuerpo que se une a IL-13R $\alpha$  o a IL13R $\alpha$ 2-Fc.

30 La presente invención también proporciona un procedimiento para explorar una sustancia para determinar su eficacia en la reducción de la respuesta inflamatoria de la colitis modulando la actividad de IL-13 que comprende:

(a) administrar la sustancia a un animal no humano susceptible a colitis;  
 (b) someter al animal a un tratamiento que inducirá una respuesta inflamatoria; y  
 35 (c) ensayar las células de los tejidos inflamatorios del animal para determinar una cantidad de secreción de IL-13, mediante lo cual una disminución o una ausencia de aumento de la cantidad de IL-13 en las células inflamatorias de tejido del animal en comparación con un aumento de la cantidad de IL-13 de un animal de control que presenta una colitis en ausencia de la sustancia identifica una sustancia que es eficaz para prevenir la respuesta inflamatoria de la colitis por modulación de la actividad de IL-13.

40 La presente invención proporciona adicionalmente un procedimiento para explorar una sustancia eficaz en la prevención de la respuesta inflamatoria de colitis modulando el número de células NK-T cuyo método comprende:

(a) administrar la sustancia a un animal no humano susceptible a colitis;  
 (b) someter al animal a un tratamiento que inducirá una respuesta inflamatoria; y  
 45 (c) someter al animal a ensayo para determinar un efecto sobre el número de células NK-T o la capacidad de unirse a CD1 e inhibir la presentación del antígeno a los linfocitos T citolíticos naturales, mediante lo cual una disminución o una ausencia de aumento del número de células NK-T en las células inflamatorias del tejido del animal en comparación con un aumento del número de células NK-T en un animal de control que presenta una colitis en ausencia de la sustancia, identifica una sustancia que es eficaz para prevenir la respuesta inflamatoria de la colitis por modulación del miembro de linfocitos T citolíticos naturales.

#### 50 Breve descripción de los dibujos

Los dibujos adjuntos, que se incorporan en y que constituyen una parte de la presente memoria descriptiva, ilustran diversas realizaciones de la presente invención y junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la misma.

Las Figuras 1A-F muestran que la pre-sensibilización antes de la exposición intrarrectal con oxazolona conduce a una colitis progresiva crónica. Pérdida de peso (A) y mortalidad (B) de ratones después de pre-sensibilización con vehículo (etanol) u oxazolona y exposición intrarrectal con vehículo o con diferentes dosis de oxazolona aumento 5x (C) y 10x (E) de cortes transversales teñidos con H.E. de colon de ratón 7 días después de pre-sensibilización y exposición con etanol. D+F muestran los efectos después de la pre-sensibilización con oxazolona y re-exposición con oxazolona al 1% por vía intrarrectal.

Las Figuras 2A-B muestran la producción de citocinas de linfocitos de ratones con colitis inducida con oxazolona. Cinco días después de la inducción de la colitis con oxazolona (en color gris) o con TNBS (en color negro) se aislaron (A) células mononucleares de la lámina propia (CMLP), células mononucleares hepáticas (CMNH), células de nódulos linfáticos mesentéricos (CNLM) y esplenocitos (SPC) y se estimularon *in vitro* durante 48 horas con anti-CD3 y anti-CD28 unido a placas. Las concentraciones de citocina se midieron en sobrenadantes por ELISA. (B) Las CMLP se aislaron el día 2, 5 u 8 después de la inducción de la colitis con oxazolona. Las CMLP se estimularon como se ha indicado anteriormente y en los sobrenadantes se midieron las concentraciones de IL-4 (en blanco) e IL-13 (con rayas).

Las Figuras 3A-B muestran que la neutralización de IL-13 previene la colitis inducida con oxazolona. (A) pérdida de peso y (B) mortalidad de ratones con colitis inducida con oxazolona tratados con IL13R $\alpha$ 2-Fc (diamantes) o proteína de control (cuadrados).

Las Figuras 4A-D muestran que la reducción de linfocitos NK1.1 protege a los ratones de la colitis inducida con oxazolona pero no de la colitis inducida con TNBS. Pérdida de peso (A+C) y mortalidad (B+D) después de la inducción de colitis con oxazolona (A+B) o colitis con TNBS (C+D) o inyección de vehículo (etanol; círculos). A los ratones se les inyectó anticuerpo de control (cuadrados) o se redujeron células NK1.1 con PK136 (diamantes).

Las Figuras 5A-B muestran la presentación a antígeno a CD1 y que los células NK-T para J $\alpha$ 281 son esenciales para la inducción de la colitis con oxazolona. (A) Pérdida de peso de ratones después de la inyección intrarrectal de vehículo (círculos) u oxazolona después de inyección i.v. de anticuerpos CD1 bloqueantes (20H2; diamantes) o anticuerpo de control (cuadrados). (B) Pérdida de peso de ratones CD1KO después de la inducción de colitis con oxazolona de ratones CD1KO (diamantes), ratones J $\alpha$ 281KO (círculos) y ratones de tipo silvestre (cuadrados).

La Figura 6 muestra la producción de citocinas en respuesta a  $\alpha$ GalCer. CMLP (panel superior), esplenocitos o células CD4 esplénicas (panel inferior) no estimuladas (no estim.) o estimuladas con anti-CD3 y anti-CD28 soluble (aCD3/28) unido a placas, células L no transfectadas y vehículo (LC+Veh.) o células L transfectadas con CD1 y  $\alpha$ GalCer (LCD1+aGC) 100ng/ml.

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

La presente invención puede comprenderse más fácilmente en relación con la siguiente descripción detallada de realizaciones preferidas de la invención y los Ejemplos incluidos en la misma y con las Figuras y su descripción previa y a continuación.

Antes de describir los procedimientos y las composiciones de la presente invención, debe entenderse que la presente invención no se limita a procedimientos específicos o a sustancias específicas a menos que se especifique de otra manera o a reactivos particulares a menos que se especifique de otra manera, de tal modo que, por supuesto, varía. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es solo con fines descriptivos de realizaciones particulares y no pretende ser limitante.

Como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el” y “la” incluyen referentes plurales a menos que el contexto dictamine claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, la referencia a “una sustancia” incluye una o más sustancias.

En el presente documento los intervalos pueden expresarse como desde “aproximadamente” un valor particular y/o a “aproximadamente” otro valor particular. Cuando dicho intervalo se expresa, otra realización incluye desde el valor particular y/o el otro valor particular. De manera similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso de la palabra precedente “aproximadamente”, se entenderá que el valor particular forma otra realización. Adicionalmente se entenderá que los extremos de cada uno de los intervalos son significativos tanto en relación con el otro extremo e independientemente del otro extremo.

### **Procedimientos de tratamiento y prevención**

La presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento o prevención de la respuesta inflamatoria de colitis en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una sustancia que modula la actividad de IL-13.

Cualquier animal que padezca colitis (por ejemplo, colitis ulcerosa) puede tratarse mediante este procedimiento. Por lo tanto, el sujeto puede ser cualquier mamífero, preferentemente un ser humano, y puede incluir, pero sin limitación, ratones, rata, vaca, cobaya, hámster, conejo, gato, perro, cabra, oveja, mono, caballo y chimpancé.

Como se usa en el presente documento, una sustancia de la presente invención puede incluir, pero sin limitación, un

proteína, un fármaco, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una inmunotoxina, un compuesto químico, un fragmento de proteína y una toxina. Los ejemplos de estas sustancias incluyen, pero sin limitación, anticuerpos anti-IL-13, anticuerpos anti NK (linfocitos T citolíticos naturales), anticuerpos anti-NK1.1, anticuerpos anti-CD1, IL-13R $\alpha$ 2-Fc, IL-13 R $\alpha$ 2, IL-13R $\alpha$ , fragmentos de IL-13 R $\alpha$ 2 y fragmentos de IL-13 R $\alpha$ . Los fragmentos extracelulares de IL-13R $\alpha$ 2 e IL-13R $\alpha$  también se contemplan en la presente invención como sustancias que son eficaces en el tratamiento o prevención de colitis.

La IL-13R $\alpha$  de la presente invención puede ser la IL-13R $\alpha$  de rata o fragmentos de este receptor y puede accederse a la secuencia para este receptor en la base de datos de GenBank mediante el N° de Acceso AY044251. La IL-13R $\alpha$  de la presente invención también puede ser la IL-13R $\alpha$  de ratón o fragmentos de este receptor y puede accederse a la secuencia para este receptor en la base de datos de GenBank mediante el N° de Acceso S80963.

La IL-13R $\alpha$  de la presente invención también puede ser la IL-13R $\alpha$  humana o fragmentos de este receptor y puede accederse a la secuencia para este receptor en la base de datos de GenBank mediante el N° de Acceso U62858.

La IL-13R $\alpha$ 2 de la presente invención también puede ser la IL-13R $\alpha$ 2 humana o fragmentos de este receptor y puede accederse a la secuencia para este receptor en la base de datos de GenBank mediante el N° de Acceso NM\_000640.

La IL-13R $\alpha$ 2 de la presente invención también puede ser la IL-13R $\alpha$ 2 o fragmentos de este receptor y puede accederse a la secuencia para este receptor en la base de datos de GenBank mediante el N° de Acceso U65747.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos contra IL-13 humana (Dolganov, y col. "Coexpression of the interleukin-13 and interleukin-4 genes correlates with their physical linkage in the cytokine gene cluster on human chromosome 5q23-31" Blood 87 (8), 3316-3326 (1996)). Se puede acceder a la secuencia de IL-13 humana en el GenBank mediante el N° de Acceso U31120 y se incorpora en el presente documento en su totalidad mediante esta referencia; Los anticuerpos de la presente invención también pueden ser anticuerpos contra IL-13 de ratón (Brown, y col. "A family of small inducible proteins secreted by leukocytes are members of a new superfamily that includes leukocyte and fibroblast-derived inflammatory agents, growth factors, and indicators of various activation processes" J. Immunol. 142 (2), 679-687 (1989)). Puede accederse a esta secuencia en la base de datos de GenBank mediante el N° de Acceso NM\_008355.

Por "tratamiento" se refiere a que después de la administración de una sustancia de la presente invención a un sujeto se observa y/o se detecta una mejora en la patología, es decir, en la respuesta inflamatoria de la colitis. El tratamiento puede variar desde un cambio positivo en un síntoma o síntomas de la enfermedad a la mejora completa de la respuesta de colitis inflamatoria (por ejemplo, la reducción de la gravedad o intensidad de la enfermedad, modificación de parámetros clínicos indicativos de la afección del sujeto, alivio de molestias o aumento o mejora funcional) como se detecta mediante técnicas conocidas en el campo técnico. Los procedimientos de la presente invención pueden usarse para tratar y establecer la colitis. Un experto en la técnica reconocería que la colitis ulcerosa o la colitis indeterminada se refiere a una afección del colon caracterizada por un estado de inflamación en el que son detectables una o más de las siguientes características histológicas: una inflamación superficial caracterizada por la presencia de pérdida de células epiteliales y ulceración desigual, desgaste pronunciado de células caliciformes productoras de mucina y la reducción de la intensidad de glándulas tubulares. Además, en la lámina propia, se observa un infiltrado mixto de células inflamatorias que consiste en linfocitos y granulocitos (consistiendo los últimos principalmente en neutrófilos y, en menor grado, eosinófilos) asociado con un exudado de células en el lumen intestinal. Además, a nivel de la submucosa puede mostrarse edema marcado con pocas células inflamatorias mientras que en la capa muscular externa un experto en la materia observaría poca o ninguna prueba de inflamación. Véase por ejemplo Boirivnt y col. Journal of Experimental Medicine 188: 1929-1939 (1998). Los síntomas clínicos pueden incluir, pero sin limitación diarrea, prolapso rectal, pérdida de peso, dolor abdominal, deshidratación y esplenomegalia.

Por "prevención" se refiere a que después de la administración de una sustancia de la presente invención a un sujeto, el sujeto no desarrolla los síntomas de colitis (es decir inflamación, diarrea, prolapso rectal, pérdida de peso, dolor abdominal) y no desarrolla colitis.

Como se usa en el presente documento, modulación (por ejemplo, mantenimiento, reducción o inhibición) de la actividad IL-13 se refiere a un cambio tal como una disminución en la producción de IL-13, una disminución de los efectos inductores de colitis por IL-13, una disminución de células productoras de IL-13 o una combinación de los mismos. Una reducción o inhibición de la actividad de IL-13 puede variar desde una disminución de la actividad de IL-13 hasta la mejora completa de la actividad de IL-13. El mantenimiento de la actividad de IL-13 significa un mantenimiento de un nivel de estado de equilibrio estacionario de IL-13 sin aumento o disminución significativos. Un experto en la materia puede usar procedimientos conocidos en la técnica así como los descritos en los Ejemplos en el presente documento para medir y/o controlar la actividad de IL-13.

La presente invención también proporciona un procedimiento de tratamiento o prevención de la respuesta inflamatoria de colitis en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una sustancia que module (por ejemplo mantenga, reduzca o inhiba) la actividad de los células NK-T

El mantenimiento de la actividad de los células NK-T significa un mantenimiento de un nivel de estado de equilibrio estacionario de la actividad de los células NK-T sin aumento o disminución significativos. Como se usa en el presente documento, la reducción o inhibición de la actividad de células NK-T puede ser una disminución del número de linfocitos T citolíticos naturales, una disminución de la activación de linfocitos T citolíticos naturales, una  
 5 disminución de la interacción entre células NK-T y sus respectivos ligandos o cualquier combinación de los mismos. Una reducción puede variar desde una disminución en el número de células NK-T hasta el agotamiento completo de linfocitos T citolíticos naturales. De manera similar, una reducción en la activación de células NK-T puede variar desde una disminución en el número de células NK-T que están activados a la inactivación de todos los linfocitos T citolíticos naturales. Un experto en la materia sabría que sustancia usar para inactivar o agotar a los linfocitos T  
 10 citolíticos naturales. Por ejemplo, si un experto en la materia desease agotar linfocitos T citolíticos naturales, usaría el anticuerpo anti-NK1.1. De manera similar, si se desease la inhibición de la activación de los linfocitos T citolíticos naturales, se usaría un anti-CD1.1. Por lo tanto, como un aspecto de la invención se contemplan anticuerpos que agotan células NK-T así como anticuerpos que impiden la presentación de antígenos.

La presente invención también contempla un procedimiento de tratamiento o prevención de la respuesta inflamatoria de colitis en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una primera sustancia que  
 15 reduzca la actividad de los células NK-T y una cantidad eficaz de una segunda sustancia que reduzca la actividad de IL-13. La primera y segunda sustancia pueden administrarse juntas o por separado al sujeto en una proporción o combinación determinada para que sea eficaz en el tratamiento o prevención de la respuesta inflamatoria de una colitis. La determinación de dicha proporción o cantidad de combinación está dentro del alcance de un experto  
 20 habitual en la materia.

La presente invención también contempla el tratamiento o prevención de la respuesta inflamatoria de colitis mediante la administración a un sujeto de una sustancia que reduzca la actividad IL-13 con otro agente terapéutico. Otros agentes terapéuticos pueden incluir, pero sin limitación, anticuerpos, tales como un anticuerpo anti-IL-4,  
 25 citocinas o agente inmunomoduladores. La invención también contempla el tratamiento o prevención de la respuesta inflamatoria de la colitis mediante la administración en un sujeto de una sustancia que reduzca la actividad de células NK-T con otro agente terapéutico.

Los Ejemplos de estas citocinas y agentes inmunomoduladores que pueden emplearse en los procedimientos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, IVIG, antisuero contra antígenos de membrana de linfocitos (es decir, suero antitímocítico (ATS), globulina antitímocítica (ATG), suero antilinfocítico (ALS), globulina antilinfocítica  
 30 (ALG), anti- CD3, anti-CD4, anti-CD8)), anti-TNF $\alpha$ , anti- IFN $\gamma$ , oligonucleótidos STAT4 antisentido, anti-ICAM1, oligonucleótidos ICAM-1 antisentido, anti-CD40L, anti-CD25 (anti-Etiqueta) e IL-10. De acuerdo con los procedimientos de la presente invención pueden administrarse otras citocinas y/o agentes inmunomoduladores para tratar un episodio agudo de enfermedad o para mantener el estado del sujeto en un estado no inflamatorio.

Para el tratamiento y/o prevención, los procedimientos de la presente invención, incluyendo las terapias de combinación descritas anteriormente, la eficacia de administración como se describe en el presente documento, en  
 35 el tratamiento o prevención de la respuesta inflamatoria de colitis en un sujeto, pueden determinarse por procedimientos de evaluación convencionales de los indicios, síntomas y ensayos particulares de laboratorio objetivos para esta enfermedad como se conoce en la técnica. Por ejemplo, 1) se demuestra que se reduce una frecuencia o gravedad de reaparición en un sujeto 2) se demuestra que la progresión de la enfermedad se estabiliza  
 40 o 3) la necesidad de usar otras medicaciones inmunosupresoras disminuye basándose en una comparación con un grupo de control apropiado y en el conocimiento de la progresión normal de la enfermedad en la población general o el individuo particular, después un tratamiento particular o un régimen de prevención se considerará eficaz.

La eficacia de terapia de combinación con cualquiera de los anticuerpos, medicaciones inmunosupresoras o agentes inmunomoduladores y sustancias que reduzcan la actividad de IL-13 en la prevención de la respuesta inflamatoria  
 45 de la colitis puede determinarse evaluando indicios, síntomas convencionales y ensayos de laboratorio objetivos, como conocerá un experto en la materia con el tiempo. La determinación de quien esta en riesgo de desarrollar la colitis se realizaría en base al conocimiento actual de los factores de riesgo conocidos para una enfermedad particular conocida por un médico en este campo, tal como particularmente sólidos antecedentes familiares de la enfermedad.

Como se ha mencionado anteriormente, la sustancia de la presente invención puede ser un anticuerpo. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" incluye, pero sin limitación, inmunoglobulina completa (es decir, un anticuerpo intacto) de cualquier clase. Los anticuerpos naturales son normalmente glucoproteínas heterotetraméricas, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Típicamente, cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, aunque que el  
 50 número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también posee puentes disulfuro intracadena regularmente separados. Cada cadena pesada posee en un extremo un dominio variable (V(H)) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V(L)) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se piensa que los restos aminoácidos en particular  
 60 forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena pesada y ligera. Las cadenas ligeras de anticuerpos

de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno o dos tipos claramente distintos, denominados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), basándose en la secuencia de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas humanas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG-1, IgG-2, IgG-3 e IgG-4; IgA-1 e IgA-2. Un experto en la materia reconocería las clases equiparables en ratón. Los dominios constantes de cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulina se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente.

En el presente documento, el término "variable" se usa para describir determinadas partes de los dominios variables que difieren en secuencia entre los anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, normalmente la variabilidad no se distribuye de manera uniforme dentro de los dominios variables de anticuerpos. Esta se concentra típicamente en tres segmentos denominados regiones determinantes de la complementariedad (RDC) o regiones hipervariables tanto en los dominios variables de cadena ligera como de cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan flanqueantes (RF). Cada uno de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprenden cuatro regiones RF, adoptando principalmente una configuración de lámina  $\beta$ , conectada por tres CDR, que forman bucles de conexión y en algunos casos formando parte de la estructura de lámina  $\beta$ . Las CDR de cada cadena pueden mantenerse juntas en estrecha proximidad por las regiones RF y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat E. A. y col., "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987)). Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como, la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo o fragmentos" de los mismos" incluye anticuerpos quiméricos y anticuerpos híbridos, con especificidades antigénicas o epitópicas duales o múltiples y fragmentos, tales como F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fab, scFv y similares, incluyendo fragmentos híbridos. Por lo tanto, se proporcionan fragmentos de anticuerpos que conservan la capacidad de unirse a sus antígenos específicos. Por ejemplo, dentro del significado de la expresión "anticuerpo o fragmento de los mismos" se incluyen fragmentos de anticuerpos que conservan actividad de unión por IL-13, CD1, CD1d, V $\alpha$ 14, V $\alpha$ 14J $\alpha$ 281, V $\alpha$ 24, V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18, IL-13R $\alpha$  o IL-13R $\alpha$ 2. Dichos anticuerpos y fragmentos pueden fabricarse por técnicas conocidas en el campo técnico y pueden explorarse para determinar la especificidad y la actividad de acuerdo con los procedimientos expuestos en los Ejemplos y en los procedimientos generales para la producción de anticuerpos y exploración de anticuerpos para determinar la especificidad y la actividad (Véase Harlow y Lane. Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, (1988)).

Dentro del significado de "anticuerpo o fragmentos de los mismos" también se incluyen conjugados de fragmentos de anticuerpos y proteínas de unión a antígeno (anticuerpos monocatenarios) como se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 4.704.692.

Opcionalmente, los anticuerpos se generan en otras especies y se "humanizan" para la administración a seres humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F (ab')<sub>2</sub>, scFv u otras subsecuencias de anticuerpos de unión a antígeno) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que restos procedentes de una región determinante de la complementariedad (RDC) del receptor se sustituyen por restos de una RDC de especies no humanas (anticuerpo donante) tales como ratón, rata o conejo que poseen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos flanqueantes Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por restos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o secuencias flanqueantes. En general, los anticuerpos humanizados comprenderán sustancialmente todos de al menos uno y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas de las regiones RF son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá de manera óptima al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana (Jones y col., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann y col., Nature, 332: 323-327 (1988); y Presta, Curry Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992)).

En la técnica se conocen bien procedimientos para la humanización de anticuerpos no humanos. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos aminoacídicos introducidos en el mismo procedente de una fuente que es no-humana. Estos restos aminoacídicos no-humanos son denominados frecuentemente restos "importados", que típicamente se extraen de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones y col., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann y col., Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen y col., Science, 239: 1534-1536 (1988)), sustituyendo las RDC o secuencias de RDC de roedores por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567), en los que se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia

correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la RDC y posiblemente algunos restos de la RF se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

5 La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para su uso en la fabricación de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el procedimiento "más adecuado", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se explora contra toda la biblioteca de secuencias de dominio variable humano. Después, la secuencia humana más parecida a la de roedor se acepta como la región flanqueante (RF) para el anticuerpo humanizado (Sims y col., J. Immunol., 151: 2296 (1993); Chothia y col., J. Mol. Biol., 196: 901 (1987)). Otro procedimiento usa una región flanqueante particular de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligera o pesada. Para varios anticuerpos humanizados diferentes puede usarse la misma región flanqueante (Carter y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285 (1992); Presta y col., J. Immunol., 151: 2623 (1993)).

15 Además es importante que los anticuerpos estén humanizados manteniendo una alta afinidad por el antígeno u otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales se encuentran normalmente disponibles y son conocidos por los expertos en la materia. Existen programas informáticos disponibles que ilustran y presentan posibles estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis de la posible función de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influye en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los restos FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de la secuencia consenso e importadora para conseguir las características deseadas del anticuerpo, tales como afinidad por el antígeno (o antígenos) diana aumentada. En general, los restos de la RDC participan directa y mas sustancialmente en ejercer influencia sobre la unión al antígeno (véase el documento WO 94/04679, publicado el 3 de marzo de 1994).

25 Pueden usarse animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que, después de la inmunización, son capaces de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (U(H)) en ratones de línea germinal mutante y quiméricos da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la serie génica de inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones de línea germinal mutante dará como resultado la producción de anticuerpos humanos después de la exposición al antígeno (véase, por ejemplo, Jakobovits y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551-255 (1993); Jakobovits y col., Nature, 362: 255-258 (1993); Bruggemann y col., Year in Immunol., 7:33 (1993)). Los anticuerpos humanos también pueden producirse en fagotecas de presentación (Hoogenboom y col., J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks y col., J. Mol. Biol., 222: 581 (1991)). Los procedimientos de Cote y col. y de Boerner y col. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner y col., J. Immunol., 147(1): 86-95 (1991)).

30 La presente invención también proporciona una célula de hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal de la invención. La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos salvo posibles mutaciones de origen natural que puedan estar presentes en menores cantidades. Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo particular, aunque el resto de la cadena (o cadenas) es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad deseada (Véase, la Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567 y Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)).

40 Los anticuerpos monoclonales de la invención pueden prepararse usando procedimientos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, Nature, 256: 495 (1975) o Harlow y Lane. Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, (1988). En un procedimiento de hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, se inmuniza típicamente con un agente inmunizante para producir linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Preferentemente, el agente inmunizante comprende IL-13, CD1, CD1d, V $\alpha$ 14, V $\alpha$ 14J $\alpha$ 281, V $\alpha$ 24, V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18, IL-13R $\alpha$  o IL-13R $\alpha$ 2 o un fragmento de los mismos. Tradicionalmente, la generación de anticuerpos monoclonales ha dependido de la disponibilidad proteína o péptidos purificados para su uso como inmunógeno. Más recientemente se han usado inmunizaciones basadas en ADN para provocar fuertes respuestas inmunitarias y generar anticuerpos monoclonales. En esta estrategia, se usa la inmunización basada en ADN, en la que el ADN que codifica una parte de IL-13, CD1, CD1d, V $\alpha$ 14, V $\alpha$ 14J $\alpha$ 281, V $\alpha$ 24, V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18, IL-13R $\alpha$  o IL-13R $\alpha$ 2 que se expresa como una proteína de fusión con IgG1 humana se inyecta en el animal huésped de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica (por ejemplo, Kilpatrick KE, y col. Gene gun delivered DNA-based immunizations mediate rapid production of murine monoclonal antibodies to the Flt-3 receptor. Hybridoma. 1998

Dec;17(6): 569-76; Kilpatrick KE y col. High-affinity monoclonal antibodies to PED/PEA-15 generated using 5 microg of DNA. Hybridoma. agosto 2000; 19(4): 297-302) y como se describe en los ejemplos.

Una estrategia alternativa para la inmunización con proteína purificada o con ADN es usar antígenos expresados en baculovirus. Las ventajas de este sistema incluyen facilidad de generación, elevados niveles de expresión y modificaciones postraduccionales que son muy similares a las observadas en sistemas de mamíferos. El uso de este sistema implica la expresión de dominios de anticuerpos IL-13, CD1, CD1d, V $\alpha$ 14, V $\alpha$ 14J $\alpha$ 281, V $\alpha$ 24, V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18, IL-13R $\alpha$  o IL-13R $\alpha$ 2 como proteínas de fusión. El antígeno se produce por inserción de un fragmento génico en fase entre la secuencia de señal y el dominio de proteína madura de la secuencia de nucleótidos del anticuerpo IL-13, CD1, CD1d, V $\alpha$ 14, V $\alpha$ 14J $\alpha$ 281, V $\alpha$ 24, V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18, IL-13R $\alpha$  o IL-13R $\alpha$ 2. Esto da como resultado la presentación de proteínas extrañas sobre la superficie del virión. Este procedimiento permite la inmunización con virus completo, eliminando la necesidad de purificar antígenos diana.

Generalmente, en los procedimientos de producción de anticuerpos monoclonales, si se desean células de origen humano se usan linfocitos de sangre periférica ("LSP") o si se desean fuentes de mamíferos se usan células esplénicas o células de nódulos linfáticos. Los linfocitos se fusionan después con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice Academic Press, (1986) págs. 59-103). Las líneas celulares inmortalizadas normalmente son células de mamífero transformadas, que incluyen células de mieloma de origen roedor, bovino, equino y humano. Normalmente, se emplean líneas de células de mieloma de rata o de ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que contenga preferentemente una o más sustancias que inhiban el crecimiento o la supervivencia de células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), cuyas sustancias impiden el crecimiento de células carentes de HGPRT. Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son las que se fusionan eficazmente, mantienen estable el nivel de expresión elevado del anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferidas son líneas de mieloma murinas, que pueden obtenerse, por ejemplo, del Centro de Distribución de Células del Instituto Salk, San Diego, California y de la Colección de Cultivos Tipo Americana de Rockville, Md. Para la producción de anticuerpos monoclonales humanos también se han descrito líneas de células de mieloma humano y de heteromieloma humano-ratón (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur y col., "Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications" Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) págs. 51-63). El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma puede después ensayarse para determinar la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra IL-13, CD1, CD1d, V $\alpha$ 14, V $\alpha$ 14J $\alpha$ 281, V $\alpha$ 24, V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18, IL-13R $\alpha$  o IL-13R $\alpha$ 2. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Dichas técnicas y ensayos se conocen en la técnica y se describen adicionalmente más adelante en los Ejemplos o en el documento Harlow y Lane Antibodies, A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, (1988).

Después de identificar las células de hibridoma deseadas, los clones pueden subclonarse por dilución limitante o por procedimientos de separación de células activadas por fluorescencia FACS y se cultivan por procedimientos convencionales. Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, Medio de Eagle Modificado por Dulbecco y medio RPMI-1640. Como alternativa, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como ascitis en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden aislarse o purificarse del medio de cultivo o del fluido de ascitis por procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, cromatografía de proteína A-Sefarosa, proteína G, hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía por afinidad.

Los anticuerpos monoclonales también pueden fabricarse por procedimientos de ADN recombinante, tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la presente invención sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede insertarse en vectores de expresión, que después se transfectan en células huéspedes tales como células COS de simio, células de ovario de hámster Chino (CHO), células de plasmacitoma o células de mieloma que de otro modo no producen la proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huéspedes recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante por los dominios constantes de cadena pesada y ligera en lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567) o por unión covalente a toda la secuencia codificante de inmunoglobulina o a parte de la secuencia codificante para un polipéptido que no es inmunoglobulina. Opcionalmente, dicho polipéptido que no es inmunoglobulina se sustituye por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención o se sustituye por los dominios variables de un sitio de combinación al antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprenda un sitio de

combinación al antígeno que tenga especificidad por IL-13, CD1, CD1d, V $\alpha$ 14, V $\alpha$ 14J $\alpha$ 281, V $\alpha$ 24, V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18, IL-13R $\alpha$  o IL-13R $\alpha$ 2 y otro sitio de combinación al antígeno que tenga especificidad para un antígeno diferente.

Los procedimientos *in vitro* también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente fragmentos Fab, puede conseguirse usando procedimientos rutinarios conocidos en la técnica. Por ejemplo, la digestión puede realizarse usando papaína. Los ejemplos de digestión con papaína se describen en el documento WO 94/29348 publicado el 22 de diciembre de 1994, en la Patente de Estados Unidos N° 4.342.566 y en Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, (1988). La digestión de anticuerpos con papaína produce típicamente dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos Fab, cada uno con un solo sitio de unión a antígeno y un fragmento Fc residual. El tratamiento con pepsina produce un fragmento, denominado fragmento F(ab')<sub>2</sub>, que posee dos sitios de combinación a antígeno y que además puede entrecruzar antígenos.

Los fragmentos Fab producidos en la digestión de anticuerpos también pueden contener los dominios constantes de la cadena ligera y el primer dominio constante de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' se diferencian de los fragmentos Fab por la adición de pocos restos en el término carboxilo del dominio de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. El fragmento F(ab')<sub>2</sub> es un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab' unidos por un puente disulfuro a la región bisagra. En el presente documento, se denomina Fab'-SH, a Fab' cuando el resto (o restos) de cisteína de los dominios constantes contiene un grupo tiol libre. Originalmente, los fragmentos de anticuerpo se produjeron como pares de fragmentos Fab' que poseían cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

También se proporciona un paratopo o fragmento del anticuerpo aislado inmunogénicamente específico. Un epítipo específico inmunogénico del anticuerpo puede aislarse del anticuerpo completo por modificación química o mecánica de la molécula. Los fragmentos purificados así obtenidos se ensayan para determinar su inmunogenicidad y especificidad por los procedimientos indicados en la presente memoria. Opcionalmente, los paratopos inmunorreactivos del anticuerpo se sintetizan directamente. Un fragmento inmunorreactivo se define como una secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente de dos a cinco aminoácidos consecutivos derivados de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo.

Un procedimiento de producción de proteínas que comprende los anticuerpos de la presente invención es unir dos o más péptidos o polipéptidos juntos por técnicas de química de proteínas. Por ejemplo, los péptidos o polipéptidos pueden sintetizarse químicamente usando equipo de laboratorio normalmente disponible usando química Fmoc (9-fluorenil-metiloxycarbonilo) o Boc (*tert*-butiloxycarbonilo) (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). Un experto en la materia puede apreciar fácilmente que un péptido o polipéptido correspondiente al anticuerpo de la presente invención, por ejemplo, puede sintetizarse mediante reacciones químicas convencionales. Por ejemplo, un péptido polipéptido puede sintetizarse y no escindir de su resina de síntesis mientras que el otro fragmento de un anticuerpo puede sintetizarse y posteriormente escindir de la resina, por lo que se expone a un grupo terminal que se bloquea funcionalmente sobre el otro fragmento. Mediante reacciones de condensación peptídicas, estos dos fragmentos pueden unirse covalentemente mediante un enlace peptídico a su extremo carboxilo y amino, respectivamente, para formar un anticuerpo o un fragmento del mismo. (Grant. *Synthetic Peptides: A User Guide*. W. H. Freeman y Co., N. Y. (1992); Bodansky y Trost., Ed. (1993) *Principles of Peptide Synthesis*. Springer-Verlag Inc., NY. De manera alternativa, el péptido o polipéptido se sintetiza independiente *in vivo* como se ha descrito anteriormente. Una vez aislado, estos péptidos o polipéptidos independientes pueden unirse para formar un anticuerpo o fragmento del mismo mediante reacciones de condensación peptídicas similares.

Por ejemplo, el ligamiento enzimático de fragmentos peptídicos clonados o sintéticos permite que se unan fragmentos peptídicos relativamente cortos para producir fragmentos peptídicos más largos, polipéptidos o dominios de proteína completa (Abrahmsen y col., *Biochemistry*, 30: 4151 (1991)). De manera alternativa, el ligamiento químico natural de péptidos sintéticos puede utilizarse para construir sintéticamente péptidos o polipéptidos grandes de fragmentos peptídicos más cortos. Este procedimiento consiste en una reacción química de dos etapas (Dawson y col. *Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation*. *Science*, 266: 776-779 (1994)). La primera etapa es la reacción quimioselectiva de un péptido-alfa-tioéster sintético desprotegido con otro segmento peptídico desprotegido que contiene un resto de cisteína amino-terminal para proporcionar un intermedio unido a tioéster como el producto covalente inicial. Sin cambios en las condiciones de reacción, este intermedio experimenta una reacción intramolecular rápida, espontánea para formar un péptido natural unido al sitio de ligamiento. La aplicación de este procedimiento de ligamiento químico natural a la síntesis total de una molécula de proteína se ilustra mediante la preparación de interleucina 8 (IL-8) humana (Baggiolini y col. (1992) *FEBS Lett.* 307: 97-101; Clark-Lewis y col., *J. Biol. Chem.*, 269: 16075 (1994); Clark-Lewis y col., *Biochemistry*, 30: 3128 (1991); Rajarathnam y col., *Biochemistry* 33: 6623-30 (1994)).

Como alternativa, los segmentos peptídicos desprotegidos se unen químicamente donde el enlace formado entre los segmentos peptídicos como resultado del ligamiento químico es un enlace no natural (no peptídico) (Schmolzer, M y col. *Science*, 256: 221 (1992)). Esta técnica se ha usado para sintetizar análogos de dominios de proteínas así como grandes cantidades de proteínas relativamente puras con actividad biológica completa (deLisle Milton y col., *Techniques in Protein Chemistry IV*. Academic Press, Nueva York, págs. 257-267 (1992)).

La invención también proporciona fragmentos de anticuerpos que poseen bioactividad. Los fragmentos polipeptídicos de la presente invención pueden ser proteínas recombinantes obtenidas por clonación de ácidos nucleicos que codifican el polipéptido en un sistema de expresión capaz de producir dos fragmentos polipeptídicos de los mismos, tal como un sistema de expresión basado en adenovirus o en baculovirus. Por ejemplo, el dominio activo de un anticuerpo puede determinarse a partir de un hibridoma específico que puede producir un efecto biológico asociado con la interacción del anticuerpo con IL-13, CD1, CD1d, V $\alpha$ 14, V $\alpha$ 14J $\alpha$ 2S1, V $\alpha$ 24, V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18, IL-13R $\alpha$  o IL-13R $\alpha$ 2. Por ejemplo, pueden deleccionarse aminoácidos encontrados que no contribuyen ni a la actividad ni a la especificidad de unión o afinidad del anticuerpo sin perder la actividad respectiva. Por ejemplo, en diversas realizaciones, los aminoácidos amino o carboxilo terminales se eliminan secuencialmente de la molécula que no es de inmunoglobulina original o modificada o de la molécula de inmunoglobulina y la actividad respectiva se ensaya en uno de los muchos ensayos disponibles. En otro ejemplo, un fragmento de un anticuerpo comprende anticuerpo modificado en el que al menos un aminoácido se ha sustituido por el aminoácido de origen natural en una posición específica, y una parte de cualquiera de los aminoácidos amino terminal o carboxilo terminal o incluso una región interna del anticuerpo, se ha reemplazado por un fragmento polipeptídico u otro resto, tal como biotina, que puede facilitarse en la purificación del anticuerpo modificado. Por ejemplo, un anticuerpo modificado puede fusionarse a una proteína de unión a maltosa, mediante cualquier química peptídica o clonando los ácidos nucleicos respectivos que codifican los dos fragmentos polipeptídicos en un vector de expresión de manera que la expresión de la región codificante de cómo resultado un polipéptido híbrido. El polipéptido híbrido puede purificarse por afinidad pasándole sobre una columna de afinidad de amilosa y después el receptor del anticuerpo modificado puede separarse de la región de unión a maltosa por escisión del polipéptido híbrido con el factor Xa específico de proteasa. (Véase, por ejemplo, New England Biolabs Product Catalog, 1996, pág. 164.). También se encuentran disponibles procedimientos de purificación similares para el aislamiento de proteínas híbridas de células eucariotas.

Los fragmentos, unidos o no a otras secuencias, incluyen inserciones, delecciones, sustituciones, u otras modificaciones de regiones particulares seleccionadas o restos aminoácidos específicos, siempre que la actividad del fragmento no esté significativamente modificada o afectada en comparación con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo no modificado. Estas modificaciones pueden proporcionar alguna propiedad adicional, tal como eliminar o añadir aminoácidos capaces de formar enlaces disulfuro, para aumentar su biolongevidad, modificar sus características secretoras, etc. En cualquier caso, el fragmento debe poseer una propiedad bioactiva, tal como actividad de unión, regulación de unión en el dominio de unión. Las regiones funcionales o activas del anticuerpo pueden identificarse por mutagénesis de una región específica de la proteína, seguido por la expresión y ensayo del polipéptido expresado. Dichos procedimientos son fácilmente evidentes para un profesional experto en la técnica y puede incluir mutagénesis específica de sitio del ácido nucleico que codifica el antígeno. (Zoller y col. Nucl. Acids Res. 10: 6487-500 (1982).

Para seleccionar anticuerpos que se unan selectivamente a una proteína, variante o fragmento particular pueden usarse diversos formatos de inmunoensayo. Por ejemplo, de manera rutinaria, para seleccionar anticuerpos que inmunorreactan selectivamente con una proteína, variante de proteína o sus fragmentos se usan inmunoensayos ELISA en fase sólida. Véase Harlow y Lane. (Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, (1958)), para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo que podrían usarse para determinar la unión selectiva. La afinidad de unión de un anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, por análisis Scatchard de Munson y col., (Anal. Biochem., 107: 220 (1980).

También se proporciona un kit con reactivos para anticuerpos que comprende envases del anticuerpo monoclonal o fragmentos del mismo de la invención y uno o más reactivos para detectar la unión del anticuerpo o fragmento del mismo a la molécula receptora IL-13, CD1, CD1d, V $\alpha$ 14, V $\alpha$ 14J $\alpha$ 2S1, V $\alpha$ 24, V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18, IL-13R $\alpha$  o IL-13R $\alpha$ 2. Los reactivos pueden incluir, por ejemplo, marcadores fluorescentes, marcadores enzimáticos u otros marcadores. Los reactivos también pueden incluir anticuerpos secundarios o terciarios o reactivos para reacciones enzimáticas en las que las reacciones enzimáticas producen un producto que puede visualizarse.

### Administración de Anticuerpos

Los anticuerpos de la invención descritos en el presente documento se administran preferentemente a un sujeto en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En Remington: The Science and Practice of Pharmacy ((19<sup>a</sup> ed.) ed. A. R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA 1995) se describen vehículos adecuados y sus formulaciones. Típicamente, en la formulación se usa una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable para hacer que la formulación sea isotónica. Son ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables los que incluyen, pero sin limitación, solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. El pH de la solución es preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 8 y más preferentemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5. Otros vehículos incluyen preparaciones de liberación prolongada tales como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos con forma de, por ejemplo, películas, liposomas o micropartículas. Será evidente para los expertos en la materia que determinados vehículos puedan ser más preferibles dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración y de la concentración del anticuerpo a administrar.

Los anticuerpos pueden administrarse al sujeto, al paciente o a la célula por inyección (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular), por vía intrarrectal o por otros procedimientos tales como infusión que

garantizan su liberación en la corriente sanguínea de una forma eficaz. Se prefiere la inyección local o intravenosa.

Las dosificaciones y los programas para la administración de anticuerpos eficaces puede determinarse empíricamente y la realización de dichas determinaciones se incluye en la experiencia de la materia. Los expertos en la materia comprenderán que la dosificación de los anticuerpos que deben administrarse variará dependiendo, por ejemplo, del sujeto que recibirá el anticuerpo, de la vía de administración, del tipo particular de anticuerpo usado y de otros fármacos que se administren. La orientación en cuanto a la dosis de selección apropiada para los anticuerpos se encuentra en la bibliografía sobre usos terapéuticos de anticuerpos, por ejemplo, Handbook of Monoclonal Antibodies, Ferrone y col., eds., Noyes Publications, Park Ridge, N. J., (1985) cap. 22 y págs. 303-357; Smith y col., Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Haber y col., eds., Raven Press, Nueva York (1977) págs. 365-389. Una dosificación diaria típica del anticuerpo usado en solitario podría variar de aproximadamente 1 µg/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal o más por día, dependiendo de los factores mencionados anteriormente.

Después de la administración de una sustancia para el tratamiento, inhibición o prevención de inflamación de colitis, la eficacia de la sustancia terapéutica puede evaluarse de diversas maneras bien conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, un experto habitual en la materia comprenderá que una sustancia de la invención es eficaz en el tratamiento o inhibición de la inflamación de una colitis establecida en un sujeto observando que la sustancia reduce la inflamación o impide un aumento adicional de la inflamación. La inflamación puede medirse por procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, usando biopsias de tejidos para evaluar el daño tisular o ensayos con anticuerpos para detectar la presencia de citocinas inflamatorias en una muestra (por ejemplo, fluidos corporales, pero sin limitación, sangre) procedente de un sujeto o paciente, o midiendo los niveles de citocina en el paciente. La eficacia del tratamiento también puede determinarse midiendo el número de linfocitos T-citolíticos en el sujeto (por ejemplo en el colon o en sangre periférica) con inflamación de colitis. Un tratamiento que inhiba un aumento inicial o posterior de linfocitos T-citolíticos o niveles de IL-13 en un sujeto o paciente con inflamación de una colitis establecida o que de cómo resultado una disminución en el número de linfocitos T-citolíticos o niveles de IL-13 en un sujeto o paciente con inflamación de una colitis establecida es un tratamiento eficaz.

Las sustancias de la invención pueden administrarse profilácticamente a pacientes o a sujetos que están en riesgo de padecer enfermedad intestinal inflamatoria o a los que se les acaba de diagnosticar enfermedad intestinal inflamatoria. En sujetos a los que se acaba de diagnosticar inflamación intestinal inflamatoria pero que aún no presentan una colitis establecida o la respuesta inflamatoria de una colitis establecida (medida por biopsia u otros ensayos para detectar la inflamación debida a colitis) en sangre u otro fluido corporal, el tratamiento eficaz con una sustancia de la invención inhibe parcial o completamente la aparición de los síntomas de la colitis y/o la colitis.

#### **Estrategias para la administración de ácidos nucleicos**

Las sustancias de la presente invención, que incluyen anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la invención, también pueden administrarse *in vivo* y/o *ex vivo* a pacientes o a sujetos como una preparación de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) que codifique una sustancia, tal como un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, de manera que las células propias del paciente o del sujeto capten el ácido nucleico y produzcan y secreten las sustancias codificadas, tales como un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

En los procedimientos descritos anteriormente que incluyen la administración y captación de ADN exógeno en las células de un sujeto (es decir, transducción o transfección génica), los ácidos nucleicos de la presente invención pueden estar en forma de ADN o ARN desnudo o los ácidos nucleicos pueden estar en un vector para la administración de los ácidos nucleicos a las células, por lo que el fragmento de ADN que codifica el anticuerpo está bajo la regulación transcripcional de un promotor, como entendería bien un experto habitual en la técnica. El vector puede ser una preparación disponible en el mercado, tal como un vector de adenovirus (Quantum Biotechnologies, Inc. (Laval, Quebec, Canadá). La administración del ácido nucleico o del vector a las células puede realizarse mediante una diversidad de mecanismos. Como un ejemplo, la administración puede ser mediante un liposoma, usando preparaciones de liposomas disponibles en el mercado, tales como, LIPOFECTIN, LIPOFECTAMINA (GIBCO-BRL, Inc., Gaithersburg, MD), SUPERFECT (Qiagen, Inc. Hilden, Alemania) y TRANSFECTAM (Promega Biotec, Inc., Madison, WI), así como otros liposomas desarrollados de acuerdo con procedimientos convencionales en la técnica. Además, el ácido nucleico o vector de la presente invención puede administrarse *in vivo* por electroporación, cuya tecnología está disponible en Genetronics, Inc. (San Diego, CA) así como mediante una máquina de SONOPORACIÓN (ImaRx Pharmaceutical Corp., Tucson, AZ).

Como un ejemplo, la administración del vector puede realizarse mediante un sistema viral, tal como un sistema de vector retroviral que puede integrar un genoma retroviral recombinante (véase, por ejemplo, Pastan y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 4486, 1988; Miller y col., Mol. Cell. Biol. 6: 2895, 1986). Después, el retrovirus recombinante puede usarse para infectar y por lo tanto administrar los ácidos nucleicos de células infectadas que codifican un anticuerpo ampliamente neutralizante (o fragmentos activos de los mismos) de la invención. El procedimiento exacto para introducir el ácido nucleico modificado en células de mamíferos no se limita, por supuesto, al uso de vectores retrovirales. Existen otras técnicas ampliamente disponibles para este procedimiento que incluye el uso de vectores adenovirales (Mitani y col., Hum. Gene Ther. 5: 941-948, 1994), vectores virales adenoasociados (VAA) (Goodman y col., Blood 84: 1492-1500, 1994), vectores lentivirales (Naidini y col., Science 272: 263-267, 1996) y vectores retrovirales pseudotipificados (Agrawal y col., Exper. Hematol, 24: 738-747, 1996). También pueden usarse técnicas

de transducción física, tales como administración de liposomas y mecanismos de endocitosis y otros mediados por receptores (véase, por ejemplo, Schwartzberger y col., Blood 87: 472-478, 1996) por nombrar algunos ejemplos. La presente invención puede usarse junto con cualquiera de estos u otros procedimientos de transferencia de genes normalmente usados.

- 5 Como un ejemplo, si el ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención se administra a las células de un sujeto en un vector de adenovirus, la dosificación para la administración del adenovirus a seres humanos puede variar de aproximadamente  $10^7$  a  $10^9$  unidades formadoras de placas (ufp) por inyección pero puede ser tan elevada como  $10^{12}$  ufp por inyección (Crystal, Hum. Gene Ther. 8: 985-1001, 1997; Alvarez y Curiel, Hum. Gene Ther. 8: 597-613, 1997). Un sujeto puede recibir una sola inyección o, si fueran necesarias inyecciones adicionales, estas  
10 pueden repetirse a intervalos de seis meses (u otros intervalos de tiempo apropiados, según determine el experto médico) durante un periodo indefinido y/o hasta que se haya establecido la eficacia del tratamiento.

- La administración parenteral del ácido nucleico o vector de la presente invención, si se usa, se caracteriza generalmente por inyección. Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, tanto como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para solución de suspensión en líquido antes de inyección o como  
15 emulsiones. Una estrategia revisada más recientemente para la administración parenteral implica el uso de un sistema de liberación lento o prolongado de manera que se mantenga una dosificación constante. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 3.610.795, que se incorpora por referencia en el presente documento. Como consulta adicional sobre formulaciones adecuadas y diversas vías de administración de compuestos terapéuticos, véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (19ª ed.) ed. A. R. Gennaro,  
20 Mack Publishing Company, Easton, PA 1995.

#### **Vehículos Farmacéuticamente Aceptables**

- Las sustancias de la presente invención, incluyendo anticuerpos, pueden usarse terapéuticamente en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. "Farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material que no es biológicamente indeseable o de otra manera, es decir, el material puede administrarse a un sujeto, junto con la  
25 sustancia, sin causar ningún efecto biológico indeseable o interaccionar de una manera perjudicial con cualquiera de los otros componentes de la composición farmacéutica que lo contiene. El vehículo se seleccionaría naturalmente para minimizar cualquier degradación del principio activo y para minimizar cualquier efecto secundario adverso en el sujeto, y sería bien conocido por un experto en la materia.

- Los expertos en la materia conocen bien vehículos farmacéuticos. Estos serían más típicamente vehículos convencionales para la administración de fármacos a seres humanos, incluyendo soluciones tales como agua estéril, solución salina, soluciones tamponadas a pH fisiológico. Las composiciones pueden administrarse por vía intramuscular o por vía subcutánea. Otros compuestos se administrarán de acuerdo con procedimientos convencionales usados por los expertos en la materia.

- Las composiciones farmacéuticas pueden incluir vehículos, espesantes, diluyentes, tampones, conservantes, agentes tensioactivos y similares junto con la molécula de elección. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir uno o más principios activos tales como agentes antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, analgésicos y similares.

- La composición farmacéutica puede administrarse de diversas maneras dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y del área a tratar. La administración puede realizarse por vía tópica (incluyendo la vía rectal e intranasal), por vía oral, por inhalación o por vía parenteral, por ejemplo por goteo intravenoso, inyección subcutánea, intraperitoneal o intramuscular. Las sustancias descritas pueden administrarse por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intracavital o transdérmica.

- Para la administración parenteral, las preparaciones incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Son ejemplos de disolventes no acuosos propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como etil oleato. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lactato o aceites no volátiles. Los vehículos intravenosos incluyen fluidos y reabastecedores de nutrientes, reabastecedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes u otros aditivos tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes y gases inertes y similares.

- Para la administración tópica, las formulaciones pueden incluir pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizaciones, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y similares.

- 55 Para la administración oral, las composiciones incluyen polvos o gránulos, suspensiones o soluciones en agua o en medios no acuosos, cápsulas, bolsitas o comprimidos. Puede desearse espesantes, saporíferos, diluyentes, emulsionantes, ayudantes de dispersión o aglutinantes.

5 Algunas de las composiciones pueden administrarse potencialmente como una sal de adición de ácidos o bases farmacéuticamente aceptable, formada por reacción con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido tiocianico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico y ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico y ácido fumárico o por reacción con una base inorgánica tal como hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio y bases orgánicas tales como mono-, di-, trialkil y aril aminas y etanolaminas sustituidas.

### Procedimientos de Exploración

10 La presente invención también proporciona un procedimiento para explorar una sustancia para determinar su eficacia reduciendo la respuesta inflamatoria de la colitis modulando la actividad de IL-13 que comprende: a) obtener un animal que tenga colitis; b) administrar la sustancia a un animal y someter al animal a ensayo para determinar un efecto sobre la actividad de IL-13 que de cómo resultado la reducción de la respuesta inflamatoria de la colitis, identificando de esta manera una sustancia eficaz reduciendo la respuesta inflamatoria de la colitis modulando la actividad de IL-13.

15 La capacidad de una sustancia para reducir el efecto de IL-13 en la inducción de la colitis puede determinarse evaluando las manifestaciones histológicas y clínicas, como se expone anteriormente, del animal con colitis antes y después de la administración de la sustancia de interés y cuantificando la cantidad de reducción de la inflamación.

20 El animal en el que se produce la colitis puede ser cualquier mamífero y puede incluir, pero sin limitación, ratón, rata, cobaya, hámster, conejo, gato, perro, cabra, mono y chimpancé. La colitis puede producirse en el animal mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, la colitis puede producirse introduciendo en el colon del animal una cantidad eficaz de un reactivo hapteno. El reactivo hapteno puede ser, pero sin limitación, oxazolona (4-etoximetilen-2-fenil-2-oxazolin-5-ona).

25 La presente invención también proporciona un procedimiento para explorar una sustancia para determinar su eficacia reduciendo la respuesta inflamatoria de la colitis modulando la actividad de los células NK-T que comprende: a) obtener un animal que tenga colitis; b) administrar la sustancia a un animal y c) someter al animal a ensayo para determinar un efecto sobre la actividad de los linfocitos T-citolíticos naturales que dé como resultado la reducción de la respuesta inflamatoria de la colitis, identificando de esta manera una sustancia eficaz en reduciendo la respuesta inflamatoria de la colitis modulando la actividad de los linfocitos T-citolíticos naturales.

30 La capacidad de una sustancia para reducir el efecto de los células NK-T en la inducción de la colitis puede determinarse evaluando las manifestaciones histológicas y clínicas, como se expone anteriormente, del animal con colitis antes y después de la administración de la sustancia de interés y cuantificando la cantidad de reducción de la inflamación. Un experto en la técnica también puede cuantificar el número células NK-T por procedimientos convencionales en la técnica y los descritos en la presente memoria para determinar si la sustancia reduce el número de linfocitos T citolíticos naturales, como se determina en células de la lámina propia o MSP.

35 El animal en el que se produce la colitis puede ser cualquier mamífero y puede incluir, pero sin limitación, ratón, rata, cobaya, hámster, conejo, gato, perro, cabra, mono y chimpancé. La colitis puede producirse en el animal mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, la colitis puede producirse introduciendo en el colon del animal una cantidad eficaz de un reactivo hapteno. El reactivo hapteno puede ser, pero sin limitación, oxazolona (4-etoximetilen-2-fenil-2-oxazolin-5-ona).

40 La presente invención también proporciona un procedimiento para explorar una sustancia eficaz en la prevención de la respuesta inflamatoria de la colitis modulando la actividad de IL-13 que comprende: a) administrar la sustancia a un animal susceptible a colitis b) someter al animal a tratamiento que inducirá a una respuesta inflamatoria y c) ensayar las células de tejido inflamatorio del animal para determinar una cantidad de secreción de IL-13, mediante la cual una disminución o ausencia de aumento de la cantidad de IL-13 en las células de tejido inflamatorio del animal en comparación con un aumento de la cantidad de IL-13 en un animal de control con colitis, en ausencia de la sustancia, se identifica una sustancia que es eficaz en la prevención de la respuesta inflamatoria de colitis modulando la actividad de IL-13.

50 Los procedimientos para medir la cantidad de IL-13 en el tejido inflamatorio incluyen, pero sin limitación, análisis ELISA, PCR, FACS, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa y ELISPOT, transferencias de Northern, transferencias de Southern y transferencias de Western.

55 La presente invención también proporciona un procedimiento para explorar una sustancia eficaz en la prevención de la respuesta de colitis inflamatoria modulando la actividad de linfocitos T citolíticos que comprende: a) administrar la sustancia a un animal susceptible a colitis; b) someter al animal a tratamiento que inducirá una respuesta inflamatoria y c) someter al animal a ensayo para determinar un efecto sobre la actividad de linfocitos T citolíticos, mediante la cual una disminución o ausencia de aumento en cuanto a la actividad de linfocitos T citolíticos en las células de tejido inflamatorio del animal en comparación con un aumento en cuanto a la actividad de linfocitos T citolíticos en un animal de control con colitis, en ausencia de la sustancia, se identifica una sustancia que es eficaz en la prevención de la respuesta inflamatoria de colitis modulando la actividad de linfocitos T citolíticos.

Para cuantificar linfocitos T citolíticos en tejidos inflamatorios, un experto en la materia puede usar procedimientos convencionales en la técnica así como los descritos en los Ejemplos.

### Usos Terapéuticos

Las sustancias de la presente invención también pueden administrarse en cantidades o concentraciones eficaces. Una concentración o cantidad eficaz de una sustancia es una que da como resultado el tratamiento o la prevención de la respuesta inflamatoria de la colitis. Un experto en la materia sabría como determinar una concentración o cantidad eficaz de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica, así como se proporciona en el presente documento. Un experto en la materia puede usar ensayos *in vitro* para optimizar la dosificación *in vivo* de una sustancia particular, incluyendo la concentración y evolución de la administración.

- Los intervalos de dosificación para la administración de las sustancias son lo suficientemente amplios como para producir el efecto deseado en el que influyen los síntomas del trastorno. La dosificación no debe ser tan grande como para causar efectos secundarios adversos, tales como reacciones cruzadas, reacciones anafilácticas y similares no deseadas. Generalmente, la dosificación variará con la edad, afección, sexo y grado de la enfermedad en el paciente y puede determinarla un experto en la técnica. En caso de cualquier contraindicación, el médico particular puede ajustar la dosificación. La dosificación puede variar y puede administrarse en una o más administración de dosis diarias, durante uno o varios días.

Por ejemplo, para evaluar la eficacia del tratamiento en seres humanos con un trastorno caracterizado por colitis, tal como, por ejemplo, colitis ulcerosa, con una sustancia que module la actividad de IL-13, pueden realizarse los siguientes estudios. Para el control del trastorno, pueden seleccionarse pacientes con inflamación activa del colon y/o del íleon terminal cuya terapia médica convencional ha fracasado, que puede incluir prednisona y/u otros inmunomoduladores conocidos en la técnica (por vía parenteral u oral). La eficacia del fármaco puede controlarse mediante colonoscopia. Los pacientes pueden asignarse al azar para dos protocolos diferentes. En un protocolo, los sujetos pueden continuar con la medicación inicial y en el segundo protocolo, los sujetos pueden reducir su medicación después de recibir la sustancia que modula la actividad de IL-13.

En una realización, el tratamiento puede consistir en una sola dosificación de 1 mg a 20 mg/kg de peso corporal de una sustancia que modula la actividad de IL-13 y/o la actividad de linfocitos T citolíticos naturales. En un ejemplo, se infunde un anticuerpo contra IL-13 durante un periodo de dos horas o se infunde una dosificación semanal de 1 mg a 20 mg/kg de peso corporal de anticuerpos contra IL13 cada vez durante un periodo de dos horas hasta la disminución de los síntomas de colitis. Durante el periodo de infusión de dos horas, la presión sanguínea, el pulso y la temperatura de los sujetos pueden controlarse antes y a intervalos de 30 minutos. Los sujetos pueden proporcionar una evaluación de laboratorio consistente en un recuento sanguíneo completo (RSC) con diferencial, recuento plaquetario, perfil químico SMA-18, velocidad de sedimentación globular (VSG) y ensayo de proteína C reactiva en 1) el momento de la infusión del anti-IL-13; 2) 24 horas después de la infusión; 3) 72 horas después de la infusión; 4) dos semanas después de la última infusión; 5) cuatro semanas después de la última infusión; (6) seis semanas después de la última infusión y 7) ocho semanas después de la última infusión. De manera similar, de acuerdo con el mismo protocolo, puede administrarse un anticuerpo que modula la actividad de los linfocitos T citolíticos naturales.

Los sujetos también pueden someterse a colonoscopia rutinaria con video-supervisión en el momento de la infusión de una sustancia que modula la actividad de IL-13 y/o la actividad de las células NK-T y de nuevo a las dos, cuatro, seis y ocho semanas después de la última infusión. Adicionalmente, las muestras de suero procedente de los sujetos pueden ensayarse por ELISA para determinar los niveles de actividad de IL-13 y/o de actividad de las células NK-T para controlar la eficacia del fármaco. Del mismo modo, pueden cultivarse muestras de biopsia de tejidos obtenidas durante la colonoscopia para purificar y aislar células de la lámina propia y someterlas a ensayo también. Las MSP purificadas también pueden aislarse, cultivarse y someterse a ensayo.

### 45 Composiciones identificadas por exploración con composiciones descritas / química combinatoria /diseño farmacológico asistido por ordenador

Las composiciones descritas, tales como IL-13, CD1, CD1d,  $V\alpha 14$ ,  $V\alpha 14J\alpha 2S1$ ,  $V\alpha 24$ ,  $V\alpha 24J\alpha 18$ , IL-13R $\alpha$  o IL-13R $\alpha 2$  o fragmentos de las mismas, pueden usarse como dianas para cualquier técnica de modelado molecular para identificar la estructura de las composiciones descritas o para identificar posibles moléculas o reales, tales como moléculas pequeñas, que interactúan de un modo deseado con las composiciones descritas.

Se entiende que cuando las composiciones descritas se usan en técnicas de modelado, se identificarán moléculas, tales como moléculas macromoleculares que tengan propiedades particulares deseadas tales como inhibición o estimulación de la función de la molécula diana. También se describen las moléculas identificadas y aisladas cuando se usan las composiciones descritas, tales como IL-13, CD1, CD1d,  $V\alpha 14$ ,  $V\alpha 14J\alpha 2S1$ ,  $V\alpha 24$ ,  $V\alpha 24J\alpha 18$ , IL-13R $\alpha$  o IL-13R $\alpha 2$ . Por lo tanto, los productos producidos usando las estrategias de modelado molecular que implican las composiciones descritas, tales como, IL-13, CD1, CD1d,  $V\alpha 14$ ,  $V\alpha 14J\alpha 2S1$ ,  $V\alpha 24$ ,  $V\alpha 24J\alpha 18$ , IL-13R $\alpha$  o IL-13R $\alpha 2$ , también se consideran descritos en el presente documento.

Por lo tanto, un modo para aislar moléculas que se unan a una molécula de elección es mediante diseño lógico. Esto se consigue mediante información estructural y modelado por ordenador. La tecnología de modelado por ordenador permite la visualización de la estructura atómica tridimensional de una molécula seleccionada y el diseño lógico de nuevos compuestos que interaccionarán con la molécula. La construcción tridimensional depende típicamente de datos procedentes de análisis de cristalografía de rayos x o formación de imágenes por RMN de la molécula seleccionada. La dinámica molecular requiere datos de campo de fuerza. Los sistemas gráficos por ordenador permiten predecir como se unirá un nuevo compuesto a la molécula diana y permiten la manipulación experimental de las estructuras del compuesto y de la molécula diana para determinar una perfecta especificidad de unión. La predicción de lo que será la interacción compuesto - molécula cuando se produzcan pequeños cambios en uno o ambos requiere programación informática de mecánica molecular y ordenadores informáticamente intensivos, normalmente acoplados con interfaces por menús, de fácil manejo entre el programa de diseño molecular y el usuario.

Son ejemplos de sistemas de modelado molecular los programas CHARMM y QUANTA, Polygen Corporation, Waltham, MA. CHARMM realiza la minimización de energía y funciones de dinámica molecular. QUANTA realiza la construcción, modelado gráfico y análisis de la estructura molecular. QUANTA permite la construcción, modificación, visualización y análisis interactivos del comportamiento de las moléculas entre sí.

Diversos artículos revisan el modelado por ordenador de fármacos interactivos con proteínas específicas, tales como Rotivinen, y col., 1988 Acta Pharmaceutica Fennica 97, 159-166; Ripka, New Scientist 54-57 (16 de junio, 1988); McKinaly y Rossmann, 1989 Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29, 111-122; Perry y Davies, QSAR: Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design págs. 189-193 (Alan R. Liss, Inc. 1989); Lewis y Dean, 1989 Proc. R. Soc. Lond. 236, 125-140 y 141-162; y con respecto a una enzima modelo para componentes de ácido nucleico, Askew, y col., 1989 J. Am. Chem. Soc. 111, 1082-1090. Se encuentran disponibles otros programas por ordenador que exploran y representan gráficamente productos químicos de compañías tales como BioDesign, Inc., Pasadena, CA., Allelix, Inc, Mississauga, Ontario, Canadá, y Hypercube, Inc., Cambridge, Ontario. Aunque estos se diseñan principalmente para la aplicación hacia fármacos específicos para proteínas particulares, estos pueden adaptarse para el diseño de moléculas que interaccionan específicamente con regiones de ADN o ARN específicas, una vez que se identifica esta región.

Al margen de lo anteriormente descrito con referencia al diseño y generación de compuestos que podrían modificar la unión, también podrían explorarse bibliotecas de compuestos conocidos, que incluyen productos naturales o productos químicos sintéticos y materiales biológicamente activos, incluyendo proteínas, para determinar compuestos que modifican la especificidad de unión a IL-13 o cualquier otra composición descrita en el presente documento.

#### Composiciones con funciones similares

Se entiende que las composiciones descritas en el presente documento tienen determinadas funciones, tales como la unión a IL-13, CD1, CD1d,  $V\alpha 14$ ,  $V\alpha 14J\alpha 2S1$ ,  $V\alpha 24$ ,  $V\alpha 24J\alpha 18$ , IL-13R $\alpha$  o IL-13R $\alpha 2$ . En el presente documento se describen determinados requisitos estructurales para la realización de las funciones descritas y se entiende que existe una diversidad de estructuras que pueden realizar la misma función las cuales están relacionadas con las estructuras descritas y que estas estructuras conseguirán finalmente el mismo resultado, por ejemplo inhibición de la producción, secreción o acción de los células NK-T o de IL-13.

Los siguientes ejemplos se indican para proporcionar a los expertos habituales en la materia una divulgación y descripción completas de cómo se preparan y evalúan los compuestos, composiciones, productos, dispositivos y/o procedimientos reivindicados en el presente documento.

Se han realizado esfuerzos para garantizar precisión con respecto a datos numéricos (por ejemplo cantidades, temperatura, etc.) pero deberían tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones. A menos que se indique de otra manera, las partes son partes en peso, la temperatura es en °C o es a temperatura ambiente, y la presión es o es casi atmosférica.

#### Ejemplos

En la presente invención, se usó un modelo de ratón de colitis inducida con oxazolona para estudiar la producción de citocinas Th2. En el modelo de colitis inducida con oxazolona para Th2, la colitis se indujo por la administración intrarrectal del agente haptizante oxazolona en un vehículo de etanol. En esta colitis, los efectos tóxicos iniciales del agente de inducción conduce a la inundación de la lámina propia con antígenos antibacterianos y por tanto a la inducción de una respuesta inmunitaria que conduce a posterior inflamación. La producción de citocinas Th2 conduce a esto último ya que la inflamación se caracteriza por un aumento de la secreción de IL-4 e IL-5 y la inflamación puede mejorarse por la administración de anti-IL-4 (Boirivant y col., 1998).

La presente invención proporciona el sorprendente resultado de que la colitis inducida con oxazolona está mediada por células NK-T que pueden producir grandes cantidades de citocinas Th2 cuando se estimulan por anti-CD3 o  $\alpha$ GalCer. Inicialmente, esto consiste en la secreción de IL-4, que rápidamente reemplaza la secreción de IL-13. Esta respuesta de IL-13 se origina a partir de los células NK-T que responden a la presentación a antígenos mediada por

CD1 y parece ser un componente clave de la inflamación, ya que la neutralización de IL-13 impide el desarrollo de colitis inducida con oxazolona. Dado el parecido de la colitis inducida con oxazolona en ratones con la colitis ulcerosa en seres humanos, estos datos indican que en seres humanos sería eficaz un tratamiento similar de la enfermedad inflamatoria.

## 5 Protocolos de Tratamiento en Ratones e *in vivo*

Se obtuvieron ratones macho C57B1/10 de un criadero mantenido por el National Cancer Institute (NCI, Bethesda, MD) y se enjaularon en condiciones sin patógenos específicos (SPE). En todos los experimentos se usaron ratones de 5 a 7 semanas de edad. Los ratones KO B6x129Sv-CD1 (con CD1 desactivado) (se recibieron de Bxley/Balk (Cui y col., 1997; Smiley y col., 1997), los ratones KO C57B1/6-J $\alpha$ 281 (con J $\alpha$ 281 desactivado) fueron una generosa donación del Dr. Taniguchi (Cui y col., 1997) y se criaron en una instalación para animales en el hospital de Brigham and Women, Harvard Medical School, Boston, MA. La oxazolona (4-Etoximetilen-2-Fenil-2-Oxazolona-5-Ona) se obtuvo en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Para pre-sensibilizar a los ratones se rasuró un campo de 2x2 cm de la piel abdominal y se aplicaron 200  $\mu$ l de una solución al 3% (p/v) en etanol al 100%. Cinco días después de la pre-sensibilización los ratones se volvieron a exponer por vía intrarrectal con 150  $\mu$ l de oxazolona al 1% en etanol al 50% o solamente etanol al 50% (es decir vehículo) con anestesia general con isoflurano (Baxter, Deerfield, IL). La inyección intrarrectal se administró con un catéter umbilical de poliuretano (Sherwood, St. Louis, MO). La neutralización de IL-13 *in vivo* se realizó con IL-13R $\alpha$ 2-Fc. Los ratones recibieron 5 x 200  $\mu$ g de proteína de control o IL-13R $\alpha$ 2-FcN comenzando el día antes de la pre-sensibilización i.v. y después cada dos días i.p. El agotamiento de células NK1.1+ se consiguió inyectando 250  $\mu$ g de anticuerpos monoclonales anti-NK1.1 de ratón (clon PK136) i.v. 48 horas antes y después de la sensibilización. Los ratones de control recibieron IgG2a de ratón. Los análisis por FACS de esplenocitos de animales tratados mostraron que las células citolíticas naturales así como las células NK-T estaban completamente agotadas. La presentación a antígenos por moléculas CD1 se bloqueó *in vivo* con anti CD1.1 de ratón (clon 20H2, donación de A. Bendelac). A los ratones se les inyectó 1 mg de anticuerpo cada 2 días.

## Histología

Cinco días después de la inducción de la colitis se realizó la eutanasia de los ratones. Los colonos se extirparon y los segmentos se fijaron en formalina (Fisher, Fair Lawn, NJ). Después de incluir en parafina se cortaron secciones de 5  $\mu$ m y se tiñeron con Hematoxilina/Eosina (Lerner, New Haven, CT).

## Aislamiento de Células y Producción de Citocinas

Se aislaron esplenocitos (SPC), células de nódulos linfáticos mesentéricos (CNLM) o células de la lámina propia los días 2 ó 7 después de la inducción de la colitis. Las células se aislaron como se describe con detalle en Current Protocols of Immunology (Scheiffele, 2002). En resumen, después de eliminar células epiteliales se aislaron CMLP por incubación de tiras de colon en HBSS/ EDTA 2,5 mM. Las células nucleares se eliminaron por digestión de los tejidos en medio ISCOVES complementado con FCS al 10%, colagenasa 200 U/ml (Roche, Indianapolis, IN), DNAsa 10  $\mu$ g/ml (Roche) y gentamicina 1  $\mu$ g/ml (BioWhittaker, Walkersville, MD). Finalmente, se separaron los leucocitos de las células epiteliales por centrifugación en un gradiente PERCOLL (Amersham, Piscataway, NJ) de 33% y 66%. Las células de los NLM y los esplenocitos se aislaron triturando el tejido en una placa de Petri y filtrando la suspensión de células a través de una malla de 40  $\mu$ m. Las células esplénicas se trataron con tampón de lisis ACK para la lisis de los eritrocitos (Biosource, Camarillo, CA). Inicialmente las células CD3 se aislaron con columnas de selección de linfocitos T de ratón (R&D, Minneapolis, MN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células CD4 purificadas se seleccionaron positivamente con perlas para CD4 y columnas mini MACS (Miltenyi, Auburn, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se cultivaron en RPM1640 complementado con FCS al 10%, HEPES 20 mM, NCTC al 5%, Glutamina 2mM, Penicilina/Estreptomicina 50  $\mu$ g/ml, Gentamicina 50  $\mu$ g/ml, 2-mercaptoetanol 50  $\mu$ M e IL-2 50 U rhu. Los linfocitos T se estimularon *in vitro* con anti-CD3 unido a placa (10  $\mu$ g/ml 2C11, Pharmingen, San Diego, CA) y anti-CD28 soluble (1  $\mu$ g/ml del clon 37,51, Pharmingen). Para estimular linfocitos con  $\alpha$ GalCer, como células presentadoras de antígenos, se usó una línea celular de fibroblasto (L-929) transfectada con CD1 de ratón. La CD1 transfectada ("LCD1") o no transfectada ("LC") eran un gentil obsequio del Dr W. Paul (Chen y Paul, 1997). Las células L se trataron durante 1,5 h con Mitomicina C y se sembraron a  $1 \times 10^5$  células/ml. Se añadió  $\alpha$ Galactosil-Ceramida ( $\alpha$ GalCer; Kirin, Tokyo, Japón) o vehículo a 100 ng/ml. La concentración de linfocitos era generalmente de  $1 \times 10^6$  células/ml. Después de 48 horas de cultivo, los sobrenadantes se recogieron y se conservaron a -20 °C hasta análisis posterior. La IL-4 e IL-5 se midieron con equipos ELISA OptEIA Pharmingen. La IL-13 se midió con un kit Quantikine M ELISA de R&D (Minneapolis, MN).

## Análisis por FACS

Las células se tiñeron con anticuerpos contra CD3 (2C11), CD4 (RM4-5), NK1.1 (PK136), Ly49C (5E6), Ly6C (AL-21) y DX5 después de la incubación con FcBlock (2.4G2) (todo de BD Pharmingen). La tinción superficial se analizó sobre un escáner de FACS (Becton-Dickinson, Mansfield, MA). Se calcularon cantidades relativas con el programa informático CellQuest después de seleccionar linfocitos vivos en el diagrama de dispersión.

### **La presensibilización epicutánea y re-exposición intrarrectal con oxazolona conduce a colitis progresiva crónica inducida con oxazolona asociada con la producción de citocinas Th2.**

Para obtener una respuesta inflamatoria crónica de larga duración en el modelo de ratón de colitis inducida con oxazolona, los ratones se presensibilizaron con oxazolona al 3% mediante pintura en la piel 5 días antes de la exposición rectal y después se les inyectó por vía intrarrectal oxazolona al 1% para inducir colitis. Como se muestra en la Figura 1A, solamente desarrollan colitis y pérdida de peso progresiva los ratones presensibilizados, mientras que los animales sin tratamiento previo no desarrollaron ninguna inflamación. Además, como se muestran en la Fig. 1B, la colitis inducida en este caso condujo a una debilidad progresiva crónica y a pérdida de peso de manera que después de 7-10 días la mayoría de los animales habían perdido un 40% de su peso corporal inicial y se estaban muriendo. El examen histológico del colon los días 7-10 mostró un edema masivo en la pared intestinal e infiltración por leucocitos. Las capas superficiales de la mucosa mostraron infiltraciones densas con pequeños granulocitos polinucleares y ulceraciones grandes interrumpiendo la capa de eritrocitos que estaba presente. Como se muestra en la Fig. 1D+E, esta fotografía histopatológica es similar a la observada en la colitis ulcerosa en seres humanos lo que sugiere que un mecanismo patológico similar contribuye a daño tisular en ambas inflamaciones. Finalmente, como se muestra en la Fig. 2A, células mononucleares aisladas de la lámina propia (CMLP), de nódulos linfáticos mesentéricos (CNLM) o de bazo (SPC) y después estimuladas con anti-CD3/anti-CD28 *in vitro* produjeron grandes cantidades de citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) pero solamente bajos niveles de IFN- $\gamma$ . Por el contrario CMLP aisladas de ratones con colitis inducida con TNBS produjeron niveles no detectables de IL-4 e IL-5 y solamente bajos niveles de IL-13, pero cantidades muy altas de TNF $\alpha$ .

### **La producción de IL-13 en la colitis inducida con oxazolona aumenta durante el transcurso de la inflamación y es esencial para inducción de la colitis**

La producción de IL-4 por CMLP aisladas a diferentes momentos durante el transcurso de la colitis inducida con oxazolona disminuyó gradualmente. En cambio, la producción de IL-13 por CMLP (así como CNLM o CM hepáticas) durante el mismo intervalo de tiempo aumentó (Fig. 2B). Este fenómeno se había observado en otros modelos animales mediados por células Th2 (Minty y col., 1997; Urban y col., 1998). Para establecer una función patógena para IL-13 en la colitis inducida con oxazolona, la IL-13 se neutralizó por administración *in vivo* de IL-13R $\alpha$ 2 fusionada a la parte Fc de la IgG1 humana (IL-13R $\alpha$ 2-Fc) en el momento de la administración intra-rectal con oxazolona. La cadena  $\alpha$ 2 del receptor de IL-13 tiene una afinidad 100 veces superior por IL-13 que la cadena  $\alpha$ 1, pero solamente la última transmite una señal intracelular después del acoplamiento. La proteína de fusión IL-13R $\alpha$ 2-Fc se une a IL-13 y se ha demostrado que neutraliza la bioactividad de IL-13 *in vivo* (Donaldson y col., 1998). Como se muestra en la Fig. 3, los ratones tratados con IL-13R $\alpha$ 2-Fc se protegían de la inducción de colitis con oxazolona: después de una pérdida de peso transitoria inicial similar a la observada solo con etanol, recuperaron su peso corporal inicial el día 3 y el día 5 la histología colónica no podía diferenciarse de la de los ratones a los que se les había proporcionado solo etanol.

### **Las células positivas a NK1.1 son esenciales para la inducción de colitis con oxazolona**

Como se ha mencionado anteriormente, las células mononucleares aisladas de ratones con colitis inducida con oxazolona producen cantidades aumentadas de IL-13 *in vitro* cuando se estimulan con anti-CD3 y anti-CD28. Sin embargo, cuando estas células mononucleares se purificaron mediante una columna de selección negativa para enriquecer células positivas a CD3, esta estimulación condujo a una producción de IL-13 enormemente disminuida (no mostrada). Dado que la columna de selección contiene perlas de vidrio revestidas con anti-IgG de ratón, esta contiene células que expresan receptores de Fc (CD16 o CD32) y se revisten con inmunoglobulinas; por lo tanto es posible que la producción de IL-13 por CMLP estimuladas con anti-CD3 en colitis inducida con oxazolona necesite una célula positiva al receptor de Fc. Además de mastocitos y linfocitos B, CD16 expresa células NK-T y células citolíticas (Koyasu, 1994) y puede producir IL-13 (Terabe y col., 2000). Para investigar la implicación de cualquiera (y más probablemente) de los dos últimos tipos de células los ratones recibieron inyecciones repetidas de anticuerpo anti-NK1.1 monoclonal para agotar las células NK1.1 (PK136) antes de la exposición con oxazolona. Dicho tratamiento agotó todas las células citolíticas y los linfocitos T citolíticos naturales, según se determina por tinción de esplenocitos DX5 y NK1.1. Como se muestra en la Fig 4A+B, se observó que los ratones empobrecidos no desarrollaron pérdida de peso o pruebas macroscópicas/microscópicas de inflamación colónica y no manifestaron producción aumentada de citocina Th2 después de la exposición intrarrectal con oxazolona.

En estudios posteriores para determinar si esta función patógena para las células positivas a NK1.1 es específica de la colitis inducida con oxazolona, se compararon ratones C57B1/10 con reducción de NK1.1 con ratones C57B1/10 no tratados en cuanto a su susceptibilidad con respecto a la colitis inducida con TNBS, un modelo de colitis mediada por Th1 parecido a la enfermedad de Crohn en seres humanos. Como se muestra en la Fig 4C+D, el agotamiento de células NK1.1+ no afecta de manera significativa a la pérdida de peso o mortalidad de ratones con colitis inducida por TNBS y de manera notable, hubo una tendencia a una mayor pérdida de peso en ratones empobrecidos. Estos resultados sugieren que las células portadoras de NK1.1 en la mucosa desempeñan, en cualquier caso, una función inhibitoria para la inducción de una inflamación mediada por Th1 en la colitis inducida por TNBS, un efecto previamente observado en otros modelos de inflamaciones intestinales mediadas por Th1 (Saubermann y col., 2000).

### La presentación de antígenos por CD1 es necesaria para la inducción de colitis con oxazolona.

Mientras que los estudios anteriores muestran que la colitis con oxazolona está mediada por células positivas a NK1.1 estos no proporcionan información sobre si las últimas células son células citolíticas o linfocitos T citolíticos naturales, ya que las NK1.1 están presentes en estos dos tipos de células. Para tratar este tema, se examinó si la colitis inducida con oxazolona se veía afectada por el bloqueo de la presentación de antígenos por moléculas CD1 que influye en la activación de células NK-T pero no en la activación de células citolíticas. Esto se consiguió por administración de un anticuerpo anti-CD1 monoclonal que se había observado que bloqueaba CD1 *in vivo* sin empobrecimiento de células NK-T y sin afectar la presentación a antígeno por el CMH de clase II (Park y col., 1998). Como se muestra en la Figura 5, la administración de este anticuerpo en el momento de la administración intrarrectal con oxazolona previene el desarrollo de la colitis inducida con oxazolona.

Como se muestra en la Figura 5B, estos resultados se confirmaron con estudios de ratones KO (del inglés Knock Out, desactivado) - CD1, en los que se observó que la administración intrarrectal de oxazolona a ratones presensibilizados no desarrolla colitis ni tampoco respuesta colónica Th2. A pesar de la ausencia de células NK-T los ratones con CD1 desactivado habían demostrado que eran completamente capaces de crear respuestas Th2 (Smiley y col., 1997). Por lo tanto, este resultado no puede atribuirse a ningún fallo intrínseco de la desactivación de CD1 para crear una respuesta Th2.

Finalmente se observó que ratones con  $J\alpha 281$  desactivado eran resistentes a la inducción de colitis con oxazolona (Figura 5B). Aunque la mayoría de las células NK-T sin CD1 usan el  $V\alpha 14J\alpha 281$  TCR canónico, algunos resultados sugieren la existencia de células NK-T con otros TCR. Estos células NK-T "atípicos" están presentes en ratones con  $J\alpha 281$  desactivado, pero se ha demostrado que es insuficiente para inducir una respuesta inflamatoria. Considerados en su conjunto, los datos de los ratones tratados con anticuerpos y desactivados muestran que la colitis inducida con oxazolona es dependiente de la inducción de linfocitos T por antígenos restringidos a CD-1 y que los linfocitos T son células NK1.1+ $J\alpha 2281$ +CD16+CD4+.

### Los células NK-T se expanden durante la colitis inducida con oxazolona

En estudios adicionales se determinó si los células NK-T se infiltraban o no en la lámina propia de ratones con colitis inducida con oxazolona. Sin embargo, este objetivo se hace difícil por el hecho de que mientras que NK1.1 es un marcador frecuente de linfocitos T citolíticos naturales, los linfocitos T con función de células NK-T también se han identificado en la población negativa a NK1.1. Además, la mayoría de los marcadores de células NK-T dependen de los niveles de activación celular. Por lo tanto, los células NK-T pierden su expresión de NK1.1 después de la activación (Chen y Paul, 1997) y otro marcador de células citolíticas naturales/linfocitos T citolíticos naturales, Ly49C, se regular positivamente en linfocitos T citolíticos naturales. Además de la activación, los células NK-T de diferentes tejidos coexpresan diferentes marcadores sustitutos de la función de células citolíticas naturales junto con el TCR. Teniendo en cuenta estas limitaciones, se observó que durante el transcurso de la colitis inducida con oxazolona el número total de linfocitos se expandía significativamente en la lámina propia (- de 10 veces), hígado (~6 veces), nódulos linfáticos mesentéricos (~50 veces) y bazo (-2 veces). Además, en la lámina propia y en el hígado el número relativo de células NK-T se expande en relación con otras poblaciones de células. Por lo tanto, en la lámina propia de ratones no tratados el 7% (NK1.1) o el 0,4% (Ly49C) de los linfocitos T coexpresan un marcador de linfocitos T citotóxicos naturales. Después de la inducción de colitis con oxazolona el 21% de linfocitos T infiltrados son positivos a NK1.1 y el 34% son positivos a Ly49C. En el hígado, en el que puede encontrarse el mayor porcentaje de linfocitos T citolíticos naturales, la expresión de NK1.1 en células positivas a CD3 aumenta del 9,9% al 48% de células, mientras que la expresión de Ly49C es baja. Por razones desconocidas, los células NK-T están ausentes de los nódulos linfáticos mesentéricos incluso después de la inducción de la colitis: en este lugar, puede identificarse menos del 1% de las células como linfocitos T citolíticos naturales. Finalmente, en el bazo de ratones no tratados el 31% de las células positivas a CD3 son NK1.1+ y después de la inducción de la colitis con oxazolona el 5,1% se hacen positivas a NK1.1, mientras que el número de células Ly49C+ aumenta del 0,6% al 28%. Para resumir estos hallazgos, los linfocitos T con marcadores sustitutos de función de linfocitos T citotóxicos naturales se expanden en la lámina propia, hígado y bazo.

### Los células NK-T CD4+ producen IL-13 en respuesta a la presentación de antígenos de CD1

Finalmente, para investigar la producción de citocinas de las CMLP y SPC en respuesta al antígeno presentado por CD1, estas células se estimularon con  $\alpha$ GalCer, un glucolípido sintético que se había observado que activaba la mayoría de las líneas de células NK-T de una manera dependiente de CD1 (Kawano y col., 1997). Los linfocitos T y los linfocitos citolíticos restringidos al CMH de clase II no se ven afectados por  $\alpha$ GalCer; por lo tanto la estimulación con  $\alpha$ GalCer representa un modo para evaluar la activación de células NK-T en mezclas de células no separadas. Como se muestra en la Figura 6, cuando se estimularon con  $\alpha$ GalCer las CMLP o los SPC de ratones, con colitis inducida con oxazolona, estos produjeron grandes cantidades de citocina Th2, incluyendo cantidades muy elevadas de IL-13. Además, células CD4 positivas aisladas por MACS de CMLP o SPC también respondieron a  $\alpha$ GalCer con una producción muy elevada de IL-13, lo que indica que la mayoría de las células CD4+ en las poblaciones de células de ratones con colitis inducida con oxazolona son células NK-T restringidos a CD1.

**Estudios Comparativos: Enfermedad de Crohn y colitis Ulcerosa**

En estudios de comparación de pacientes con enfermedad de Crohn con pacientes con colitis ulcerosa, se observó la producción de IL-13 aumentada de células de la lámina propia de pacientes con colitis ulcerosa en comparación con pacientes con enfermedad de Crohn. Los datos de FACS que comparan los dos grupos también muestran un número aumentado de células NK-T en la sangre periférica y en la lámina propia de pacientes con colitis ulcerosa en comparación con pacientes con enfermedad de Crohn.

**Bibliografía**

- Balk, S. P., Bleicher, P. A., y Terhorst, C. (1989). Isolation and characterization of a cDNA and gene coding for a fourth CD1 molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 252-256.
- 10 Bendelac, A. (1995). Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymo-cytes. *J Exp Med* 182, 2091-2096.
- Bleicher, P. A., Balk, S. P., Hagen, S. J., Blumberg, R. S., Flotte, T. J., and Terhorst, C. (1990). Expression of murine CD1 on gastrointestinal epithelium. *Science* 250, 679-682.
- 15 Blumberg, R. S., Terhorst, C., Bleicher, P., McDermott, F. V., Allan, C. H., Landau, S. B., Trier, J. S., y Balk, S. P. (1991). Expression of a nonpolymorphic MHC class I-like molecule, CD1D, by human intestinal epithelial cells. *J Immunol* 147, 2518-2524.
- Boirivant, M., Fuss, I. J., Chu, A., y Strober, W. (1998). Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *J Exp Med* 188, 1929-1939.
- Brown, M. A., y Hural, J. (1997). Functions of IL-4 and control of its expression. *Crit Rev Immunol* 17, 1-32.
- 20 Ceponis, P. J., Botelho, F., Richards, C. D., y McKay, D. M. (2000). Interleukins 4 and 13 increase intestinal epithelial permeability by a phosphatidylinositol 3-kinase pathway. Lack of evidence for STAT 6 involvement. *J Biol Chem* 275, 29132-29137.
- Chen, H., and Paul, W. E. (1997). Cultured NK1.1+ CD4+ T cells produce large amounts of IL-4 and IFN-gamma upon activation by anti-CD3 or CD1. *J Immunol* 159, 2240-2249.
- 25 Cui, J., Shin, T., Kawano, T., Sato, H., Kondo, E., Taura, I., Kaneko, Y., Koseki, H., Kanno, M., y Taniguchi, M. (1997). Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* 278, 1623-1626.
- Donaldson, D. D., Whitters, M. J., Fitz, L. J., Neben, T. Y., Finnerty, H., Henderson, S. L., O'Hara, R. M., Jr., Beier, D. R., Turner, K. J., Wood, C. R., y Collins, M. (1998). The murine IL-13 receptor alpha 2: molecular cloning, characterization, and comparison with murine IL-13 receptor alpha 1. *J Immunol* 161, 2317-2324.
- 30 Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T. R., Howard, M., Moore, K. W., y O'Garra, A. (1991). IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 146, 3444-3451.
- Fort, M. M., Cheung, J., Yen, D., Li, J., Zurawski, S. M., Lo, S., Menon, S., Clifford, T., Hunte, B., Lesley, R., y col. (2001). IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity* 15, 985-995.
- 35 Fuss, I. J., Neurath, M., Boirivant, M., Klein, J. S., de la Motte, C., Strong, S. A., Focchi, C., and Strober, W. (1996). Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* 157, 1261-1270.
- 40 Gumperz, J. E., Roy, C., Makowska, A., Lum, D., Sugita, M., Podrebarac, T., Koezuka, Y., Porcelli, S. A., Cardell, S., Brenner, M. B., y Behar, S. M. (2000). Murine CD1d-restricted T cell recognition of cellular lipids. *Immunity* 12, 211-221.
- Hayakawa, K., Lin, B. T., y Hardy, R. R. (1992). Murine thymic CD4+ T cell subsets: a subset (Thy0) that secretes diverse cytokines and overexpresses the V beta 8 T cell receptor gene family. *J Exp Med* 176, 269-274.
- 45 Ishikawa, H., Hisaeda, H., Taniguchi, M., Nakayama, T., Sakai, T., Maekawa, Y., Nakano, Y., Zhang, M., Zhang, T., Nishitani, M., y col. (2000). CD4(+) V(alpha)14 NKT cells play a crucial role in an early stage of protective immunity against infection with *Leishmania major*. *Int Immunol* 12, 1267-1274.
- Kaneko, Y., Harada, M., Kawano, T., Yamashita, M., Shibata, Y., Gejyo, F., Nakayama, T., y Taniguchi, M. (2000). Augmentation of Valpha14 NKT cell-mediated cytotoxicity by interleukin 4 in an autocrine mechanism resulting in the development of concanavalin-A-induced hepatitis. *J Exp Med* 191, 105-114.
- 50 Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Taura, I., Kaneko, Y., Motoki, K., Ueno, H., Nakagawa, R., Sato, H., Kondo, E., y col. (1997). CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides.

Science 278, 1626-1629.

Koyasu, S. (1994). CD3+CD16+NK1.1+B220+ large granular lymphocytes arise from both alpha-beta TCR+CD4-CD8- and gamma-delta TCR+CD4-CD8-cells. *J Exp Med* 179, 1957-1972.

5 Kumar, H., Belperron, A., Barthold, S. W., y Bockenstedt, L. K. (2000). Cutting edge: CD1d deficiency impairs murine host defense against the spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *J Immunol* 165, 4797-4801.

Lantz, O., y Bendelac, A. (1994). An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. *J Exp Med* 180, 1097-1106.

10 Lee, P. T., Benlagha, K., Teyton, L, y Bendelac, A. (2002). Distinct functional lineages of human V (alpha)24 natural killer T cells. *J Exp Med* 195, 637-641.

Minty, A., Asselin, S., Bensussan, A., Shire, D., Vita, N., Vyakarnam, A., Wijdenes, J., Ferrara, P., y Caput, D. (1997). The related cytokines interleukin-13 and interleukin-4 are distinguished by differential production and differential effects on T lymphocytes. *Eur Cytokine Netw* 8, 203-213.

15 Miyamoto, K., Miyake, S., y Yamamura, T. (2001). A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature* 413, 531-534.

Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., y Bhan, A. K. (1999). The critical role of interleukin 4 but not interferon gamma in the pathogenesis of colitis in T-cell receptor alpha mutant mice. *Gastroenterology* 116,320-326.

Moore, K. W., O'Garra, A., de Waal Malefyt, R., Vieira, P., y Mosmann, T. R. (1993). Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 11, 165-190.

20 Neurath, M. F., Fuss, I., Kelsall, B. L., Stuber, E., y Strober, W. (1995). Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med* 182, 1281-1290.

Okamoto, S. y col. (1999). A synthetic mimetic of CD4 is able to suppress disease in a rodent model of immune colitis. *Eur. J. Immunol.* 29, 355-366.

25 Park, S. H., Roark, J. H., y Bendelac, A. (1998). Tissue-specific recognition of mouse CD1 molecules. *J Immunol* 160, 3128-3134.

Parronchi, P., Romagnani, P., Annunziato, F., Sam-pognaro, S., Becchio, A., Giannarini, L., Maggi, E., Pupilli, C., Tonelli, F., y Romagnani, S. (1997). Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol* 150, 823-832.

30 Roark, J. H., Park, S. H., Jayawardena, J., Kavita, U., Shannon, M., y Bendelac, A. (1998). CD1.1 expression by mouse antigen-presenting cells and marginal zone B cells. *J Immunol* 160, 3121-3127. Sandborn, W. y Targan, S. R. (2002), biologic Therapy of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 122(6), 1592-1608.

Sartor, R. B. (1995). Current concepts of the etiology and pathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterol Clin North Am* 24, 475-507.

35 Saubermann, L. J., Beck, P., De Jong, Y. P., Pitman, R. S., Ryan, M. S., Kim, H. S., Exley, M., Snapper, S., Balk, S. P., Hagen, S. J., y col. (2000). Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide in the presence of CD1d provides protection against colitis in mice. *Gastroenterology* 119, 119-128.

Scheiffele, F., Fuss, I. (2002). Induction of TNBS colitis in mice, Vol 15.19, John Wiley & Sons, Inc.).

Smiley, S. T., Kaplan, M. H., y Grusby, M. J. (1997). Immunoglobulin E production in the absence of interleukin-4-secreting CDI-dependent cells. *Science* 275, 977-979.

40 Sonoda, K. H., Exley, M., Snapper, S., Balk, S. P., y Stein-Streilein, J. (1999). CD1-reactive natural killer T cells are required for development of systemic tolerance through an immune-privileged site. *J Exp Med* 190, 1215-1226.

Spada, F. M., Koezuka, Y., y Porcelli, S. A. (1998). CD 1d-restricted recognition of synthetic glycolipid antigens by human natural killer T cells. *J Exp Med* 188, 1529-1534.

45 Strober, S., Cheng, L., Zeng, D., Palathumpat, R., Dejbalkhsh-Jones, S., Huie, P., y Sibley, R. (1996). Double negative (CD4-CD8- alpha beta+) T cells which promote tolerance induction and regulate autoimmunity. *Immunol Rev* 149, 217-230.

Takeda, K., Hayakawa, Y., Van Kaer, L., Matsuda, H., Yagita, H., y Okumura, K. (2000). Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5498-5503.

Terabe, M., Matsui, S., Noben-Trauth, N., Chen, H., Watson, C., Donaldson, D. D., Carbone, D. P., Paul, W. E., y Berzofsky, J. A. (2000). NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat Immunol* 1, 515-520.

5 Urban, J. F., Jr., Noben-Trauth, N., Donaldson, D. D., Madden, K. B., Morris, S. C., Collins, M., y Finkelman, F. D. (1998). IL-13, IL-4Ralpha, and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunity* 8,255-264.

Vezy, V., Olson, S., y Lefrancois, L. (2000). Expression of intestine-specific antigen reveals novel pathways of CD8 T cell tolerance induction. *Immunity* 12, 505-514.

10 Wills-Karp, M., Luyimbazi, J., Xu, X., Schofield, B., Neben, T. Y., Karp, C. L., y Donaldson, D. D. (1998). Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 282, 2258-2261.

Yoshimoto, T., y Paul, W. E. (1994). CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. *J Exp Med* 179,1285-1295.

Zurawski, G., y de Vries, J. E. (1994), Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on mono-cytes and B cells, but not on T cells. *Immunol Today* 15, 19-26.

15

## REIVINDICACIONES

1. El uso de un anticuerpo anti-V $\alpha$ 14J $\alpha$ 281, un anticuerpo anti-V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18 o un anticuerpo anti-NK1.1 que inhibe la activación de células NK-T y que reduce el número de células NK-T en el sujeto para preparar un medicamento para el tratamiento o prevención de la colitis ulcerosa en un sujeto.
- 5 2. El uso de un anticuerpo que inhibe la presentación del antígeno a los células NK-T y que se une específicamente a CD1 para preparar un medicamento para el tratamiento o prevención de la colitis ulcerosa en un sujeto.
3. El uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que el sujeto es un ratón.
4. El uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que el sujeto es un ser humano.
5. El uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que la colitis ulcerosa es una colitis inducida con oxazolona.
- 10 6. El uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que el anticuerpo se une específicamente a V $\alpha$ 14 J $\alpha$ 281.
7. El uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que el anticuerpo se une específicamente a V $\alpha$ 14 J $\alpha$ 281.
8. El uso de una sustancia que inhibe la actividad de IL-13 para preparar un medicamento para el tratamiento o prevención de una colitis ulcerosa en un sujeto, en el que la sustancia es un anticuerpo que se une a IL-13R, un anticuerpo que se une a IL-13R $\alpha$  o a IL13R $\alpha$ 2-Fc.
- 15 9. El uso de la reivindicación 8 en el que el sujeto es un ratón.
10. El uso de la reivindicación 8 en el que el sujeto es un ser humano.
11. El uso de la reivindicación 8, en el que la colitis está causada por un trastorno intestinal inflamatorio.
12. El uso de la reivindicación 8, en el que la colitis es una colitis inducida con oxazolona.
13. El uso de la reivindicación 8, en el que la sustancia es IL13R $\alpha$ 2-Fc.
- 20 14. El uso de la reivindicación 8, en el que la sustancia que inhibe la actividad de IL-13 es un anticuerpo que se une específicamente a IL-13.
15. El uso de la reivindicación 8, en el que la sustancia que inhibe la actividad de IL-13 es un anticuerpo que se une específicamente a IL-13R $\alpha$ .
- 25 16. Un procedimiento para la exploración de una sustancia eficaz en la prevención de la respuesta inflamatoria de la colitis por modulación de la actividad de IL-13 que comprende:
  - (a) administrar la sustancia a un animal no humano susceptible a colitis;
  - (b) someter al animal a tratamiento que inducirá una respuesta inflamatoria; y
  - (c) ensayar las células de los tejidos inflamatorios del animal para determinar una cantidad de secreción de IL-13, mediante lo cual una disminución o una ausencia de aumento de la cantidad de IL-13 en las células inflamatorias de tejido del animal en comparación con un aumento de la cantidad de IL-13 de un animal de control que presenta una colitis en ausencia de la sustancia identifica una sustancia que es eficaz para prevenir la respuesta inflamatoria de la colitis por modulación de la actividad de IL-13.
- 30 17. Un procedimiento para la exploración de una sustancia eficaz en la prevención de la respuesta inflamatoria de la colitis por modulación del número de linfocitos T citolíticos naturales, cuyo procedimiento comprende:
  - 35 (a) administrar la sustancia a un animal no humano susceptible a colitis;
  - (b) someter al animal a tratamiento que inducirá una respuesta inflamatoria; y
  - (c) someter al animal a ensayo para determinar un efecto sobre el número de células NK-T o la capacidad de unirse a CD1 e inhibir la presentación del antígeno a los linfocitos T citolíticos naturales, mediante lo cual una disminución o una ausencia de aumento del número de células NK-T en las células inflamatorias del tejido del animal en comparación con un aumento del número de células NK-T en un animal de control que presenta una colitis en ausencia de la sustancia, identifica una sustancia que es eficaz para prevenir la respuesta inflamatoria de la colitis por modulación del miembro de linfocitos T citolíticos naturales.
  - 40

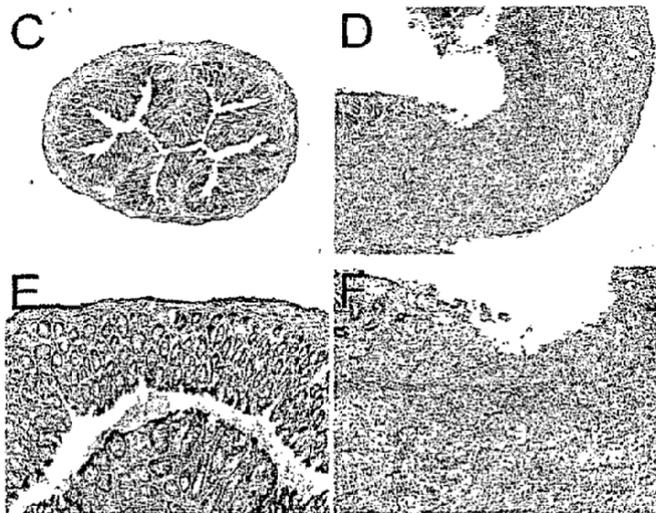
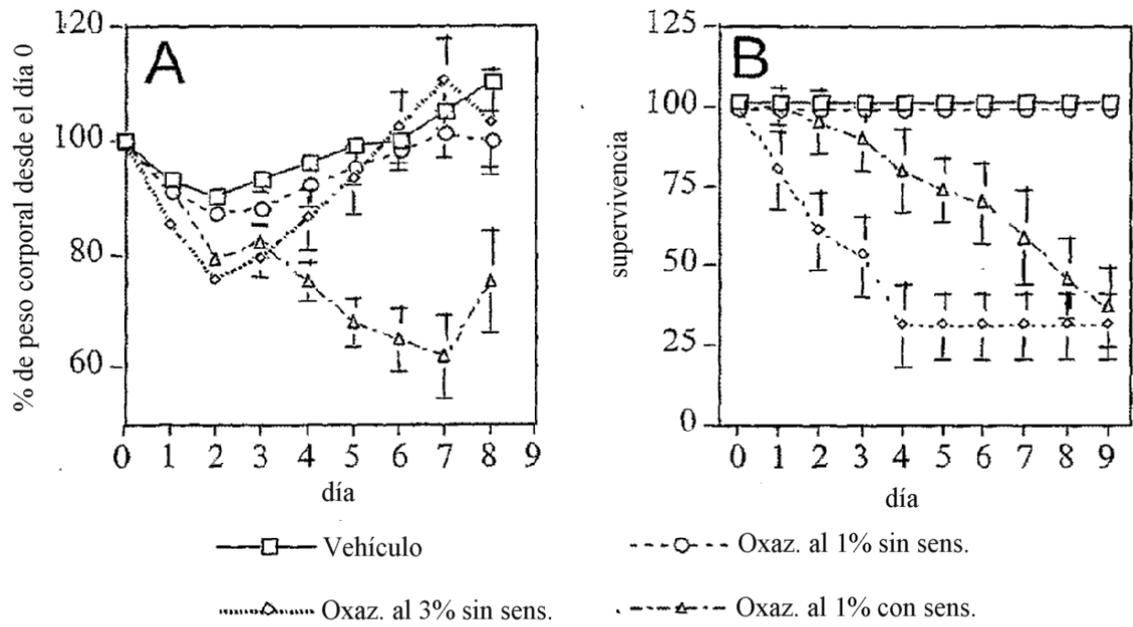


FIGURA 1

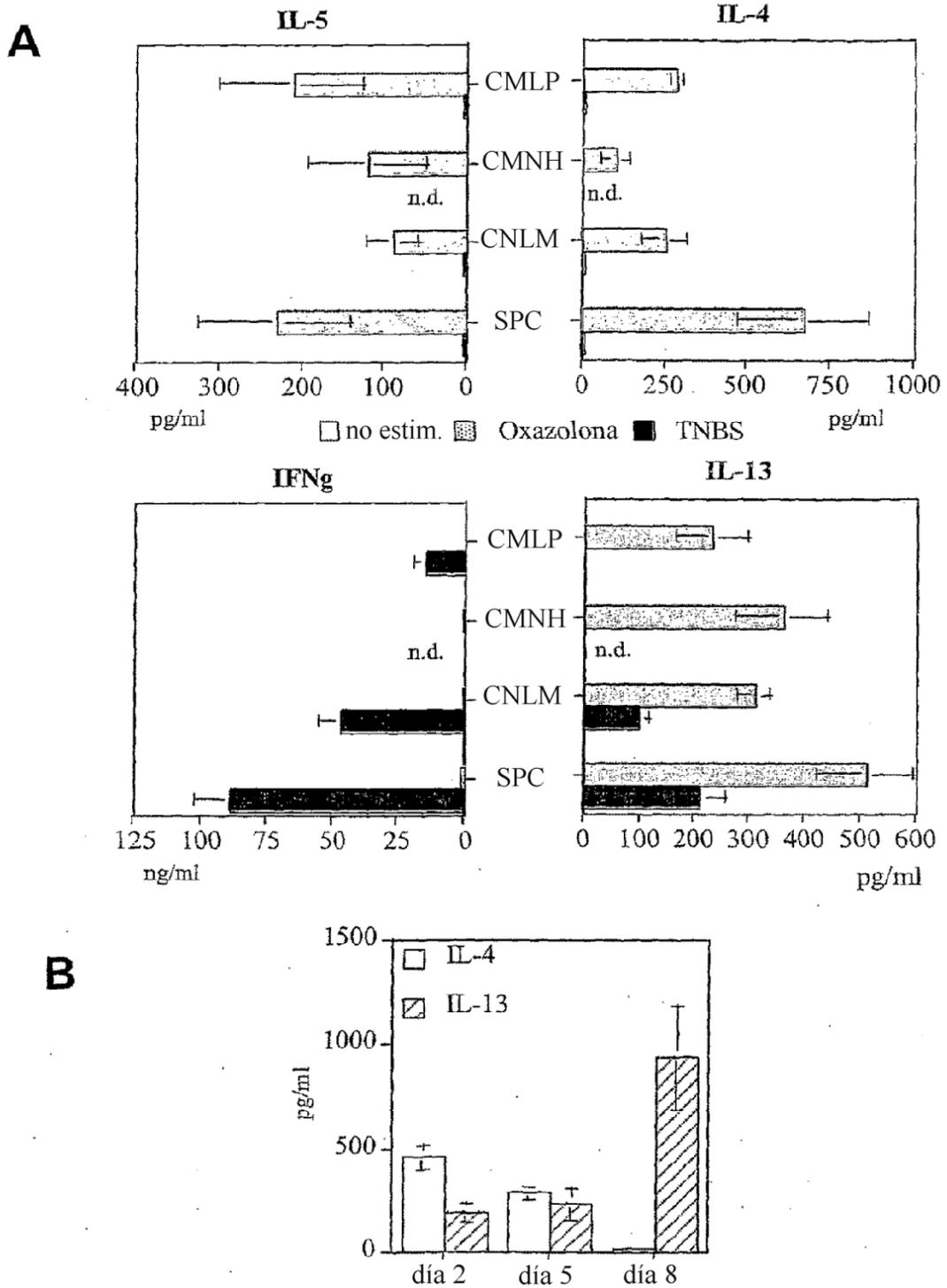


FIGURA 2

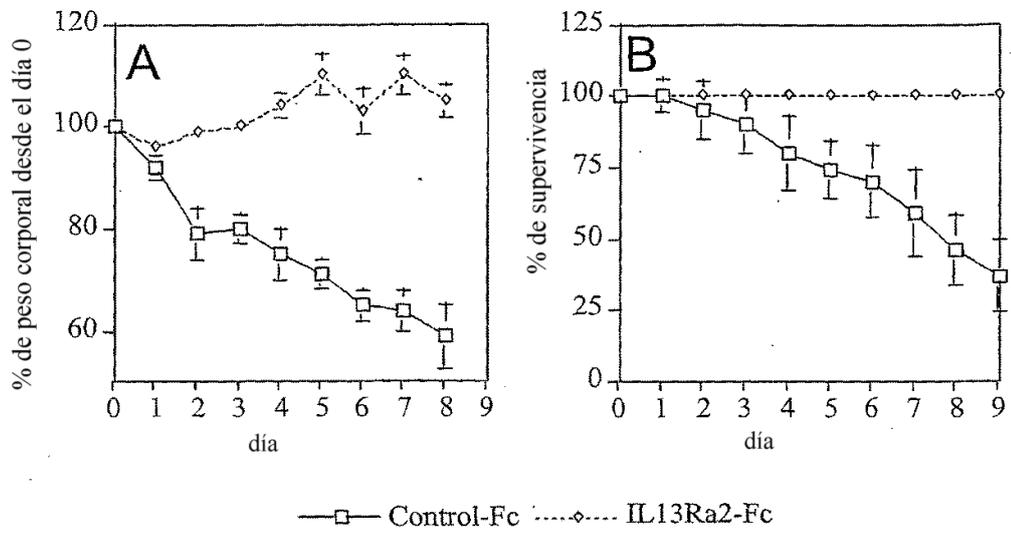


FIGURA 3

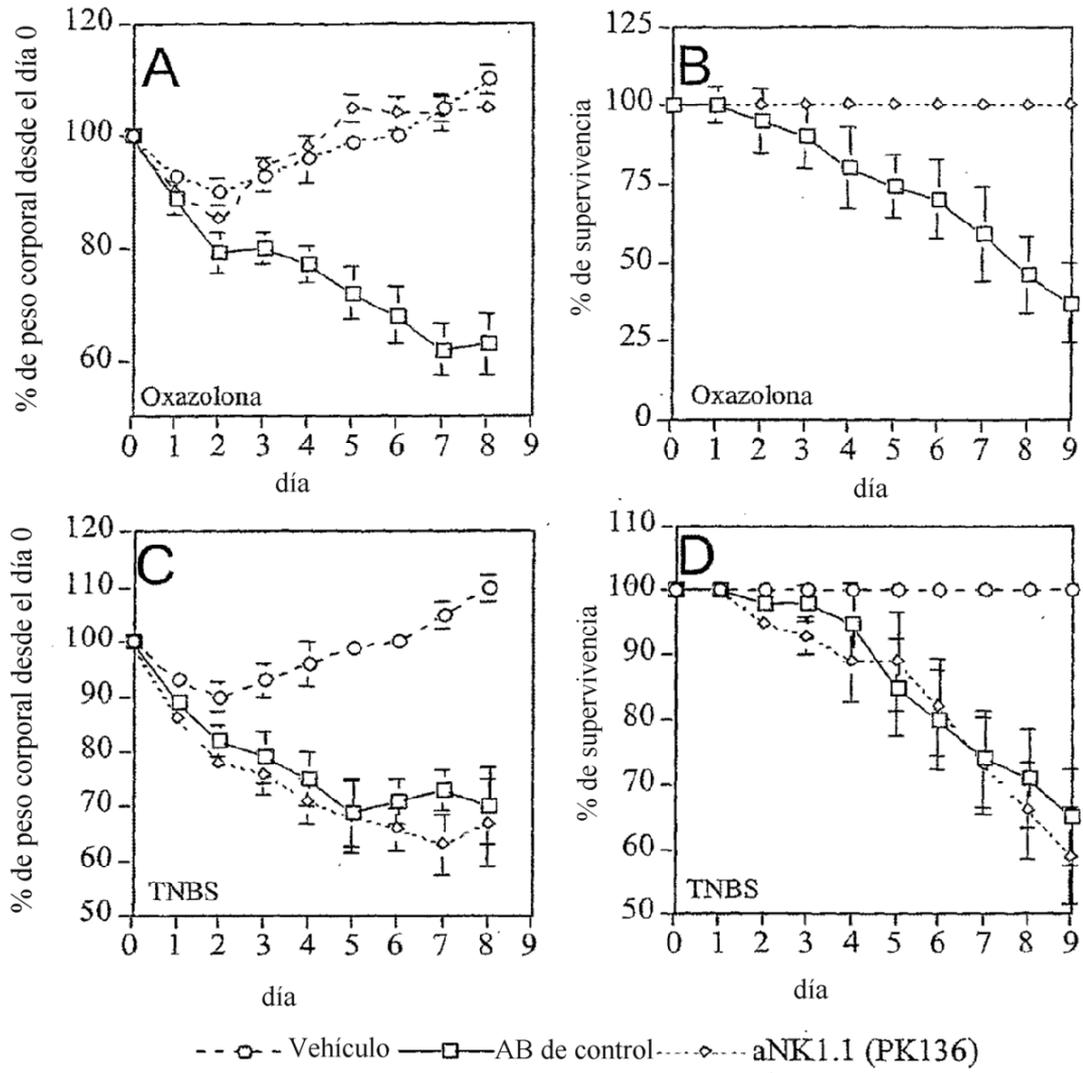


FIGURA 4

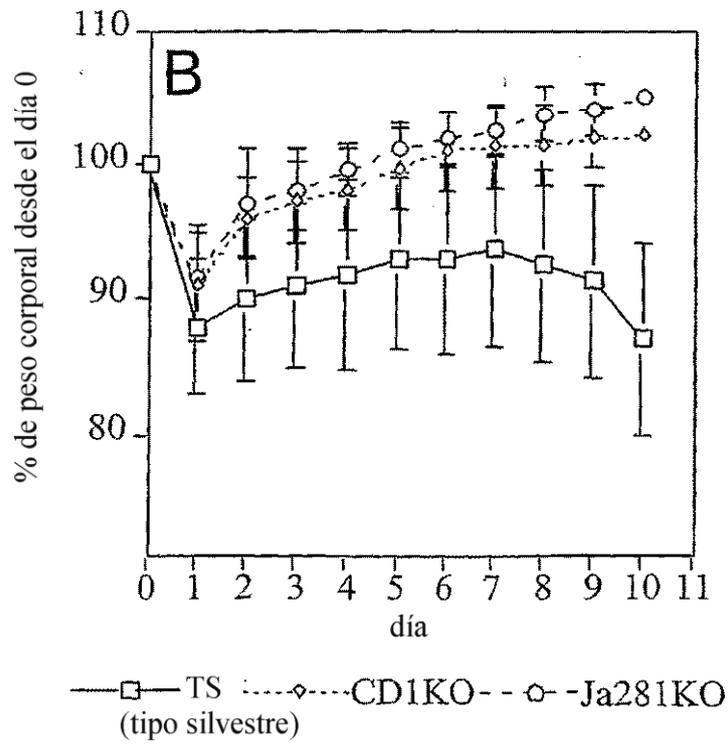
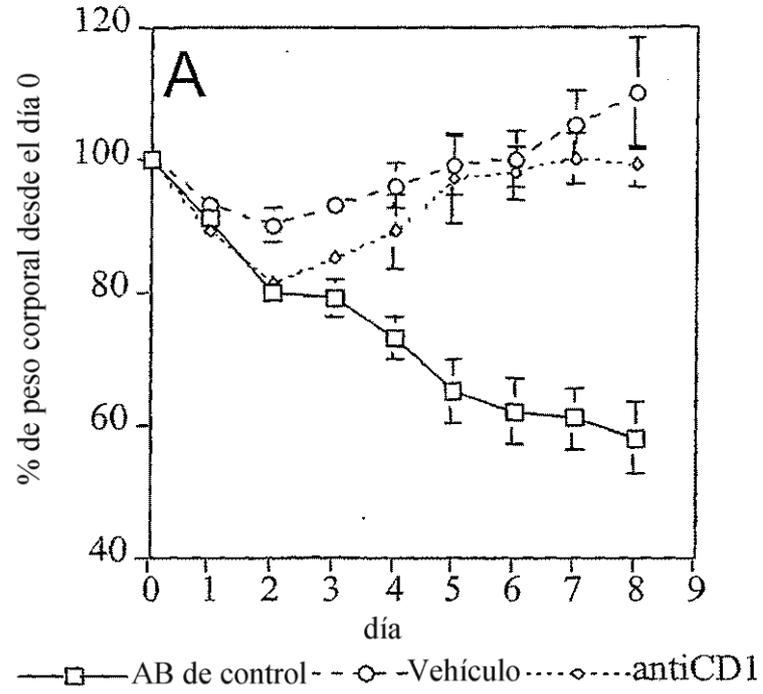


FIGURA 5

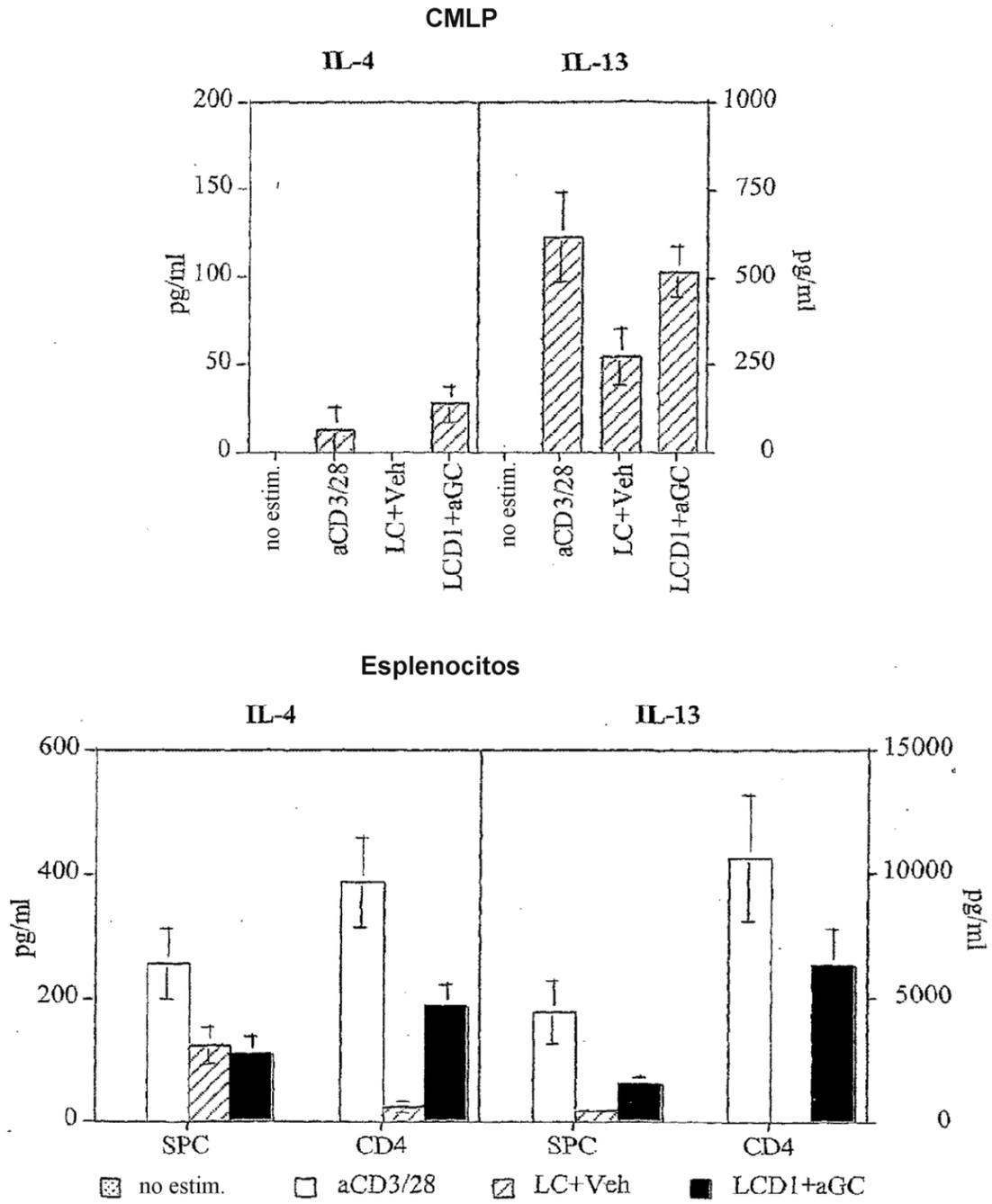


FIGURA 6