



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 962**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01) **A61P 37/08** (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) **C12N 15/79** (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01) **C12N 5/10** (2006.01)
C12N 5/20 (2006.01) **C12N 1/21** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06706157 .2**

96 Fecha de presentación : **02.01.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1836226**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.09.2007**

54

Título: **Anticuerpos frente al receptor alfa-1 de la IL-13 y usos de los mismos.**

30

Prioridad: **03.01.2005 EP 05000003**
03.02.2005 EP 05002229

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.10.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.10.2011

73

Titular/es: **F. Hoffmann-La Roche AG.**
Grenzacherstrasse, 124
4070 Basel, CH

72

Inventor/es: **Endl, Josef;**
Fuentes, Maria;
Graus, Yvo;
Grossmann, Adelbert;
Neumann, Sebastian;
Parren, Paul;
Rebers, Frank;
Regula, Joerg;
Schumacher, Ralf;
Seeber, Stefan;
Stracke, Jan;
Stubenrauch, Kay-Gunnar;
Van de Winkel, Jan;
Van Vugt, Martine y
Verecken-Verploegen, Sandra

74

Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 366 962 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos frente al receptor alfa-1 de la IL-13 y usos de los mismos

- 5 La presente invención se refiere a anticuerpos humanos frente al receptor alfa-1 de la IL-13 (IL-13R α (alfa)1), los métodos para su producción y sus usos.

Antecedentes de la invención

- 10 La IL-13 es un péptido monomérico secretado y producido básicamente por las células Th2, pudiendo también ser producido por los mastocitos y las células T asesinas. Las funciones biológicas de la IL-13 incluyen la regulación de la producción de IgE y la modulación del desarrollo de los Th2. La IL-13 se une a un receptor complejo que consiste en una cadena alfa-1 receptora de IL-13 (IL-13R α 1) y una cadena alfa receptora de IL-4 (IL-4R α). La unión de la IL-13 dispara una serie de transducciones de señal mediadas principalmente por la STAT6. La IL-13 se une con baja afinidad al IL-13R α 1 aislado y no se une al IL-4R α 1. Por el contrario, la IL-4 se une al IL-4R α aislado y no se une al IL-13R α 1 aislado. Se ha descrito otro receptor para la IL-13, el IL-13R α 2. La IL-13 se une a este receptor con alta afinidad. Es probable que este receptor actúe como señuelo.

- 20 La sobreexpresión inducible de IL-13 en ratones transgénicos genera un fenotipo que comparte muchas características con los pacientes asmáticos. Éstos muestran metaplasia del mucus e inflamación rica en macrófagos, linfocitos y eosinófilos, regulación positiva de proteasas como la MMP-9, -12, -13, -2 y -14, cathepsina B, H, K y S, presentando también fibrosis subepitelial. Los ratones con el gen para la IL-13 anulado (knockout) muestran una reducción significativa en la producción de citocinas tipo Th2 debido a la disminución del desarrollo de los Th2. Estos ratones no desarrollan hiperreactividad de las vías respiratorias (airway hyperreactivity, AHR) a pesar de la presencia de inflamación con eosinófilos. La AHR se recupera mediante la administración de IL-13, indicando que la IL-13 es necesaria y suficiente para la inducción de AHR en ratón. Otras funciones biológicas importantes de la IL-13 en relación con el asma incluyen la inducción de metaplasia y producción de mucus de las células caliciformes. Actúa directamente sobre las células epiteliales de las vías respiratorias, fibroblastos y células del músculo liso, induciendo diferentes programas transcripcionales en cada uno de estos tipos celulares. Cabe destacar que la IL-13 disminuye la respuesta α -adrenérgica en las células del músculo liso, contribuyendo a un estrechamiento de las vías respiratorias. El polimorfismo del promotor de la IL-13 se asocia con un aumento del riesgo de asma alérgica. Los polimorfismos en el gen de la IL-13 se asocian con altos niveles de IgE en suero. Los polimorfismos de un único nucleótido en la secuencia intergénica entre los genes de la IL-4 y de la IL-13 se asocian con asma atópica.

- 35 Los antagonistas de la IL-13 han sido utilizados en modelos animales. Por ejemplo, se ha demostrado que una proteína de fusión soluble IL-13R α 2-IgGFc consigue revertir la AHR inducida por ovoalbúmina en ratón y reducir el número de células productoras de mucus. La reversión se obtuvo incluso cuando el tratamiento se administra tras un completo desarrollo del fenotipo. Además, el tratamiento de ratones con una molécula de fusión entre IL-13 y una citotoxina resultaba en una reducción de todas las características de la enfermedad de las vías respiratorias propias de una inflamación alérgica crónica inducida con hongos. En conclusión, la IL-13 es una mediadora clave en el disparo de la respuesta alérgica.

- 45 El IL-13R α 1 es un miembro de la superfamilia de receptores de la hematopoyetina (familia de receptores de citocinas tipo 1) y fue identificado y descrito por Obiri N. I., et al., J. Biol. Chem., 270 (1995) 8797-8804) y en la WO 96/29417. Es una proteína de 427 aminoácidos incluyendo la secuencia señal. Las secuencias de DNA y proteína se describen en la WO 97/15663 y en la SwissProt N $^{\circ}$ P78552. La IL-13R α 1 es una proteína glicosilada que se une a la IL-13 con una baja afinidad, pero, cuando se une con IL-4R α formando un heterodímero, se une a la IL-13 con alta afinidad. Este complejo también es receptor para la IL-4.

- 50 Los anticuerpos frente al IL-13R α 1 están descritos en WO 96/29417, WO 97/15663, WO 03/080675, Graber P., et al., Eur. J. Immunol., 28 (1998) 4286-4298; Poudrier J., et al., J. Immunol., 163 (1999) 1153-1161; Poudrier J., et al., Eur. J. Immunol., 30 (2000) 3157-3164; Aikawa M., et al., Cytokine, 13 (2001) 75-84. Los anticuerpos frente al IL-13R α se pueden obtener comercialmente de R&D Systems Inc. USA. La EP 449851 se refiere a anticuerpos de rata que se unen a la IL-13 α . El problema que resuelve el presente invento es proporcionar anticuerpos alternativos frente a la IL-13 α con una afinidad muy alta a la IL-13 α .

Resumen de la invención

- 60 El invento comprende un anticuerpo que se une al IL-13R α 1 y que inhibe la IL-13, caracterizado por que la secuencia de aminoácidos de la parte variable de la cadena pesada CDR3, se selecciona a partir del grupo de secuencias de la cadena pesada CDR3 compuesto por las Secuencias con N $^{\circ}$ ID: 1, 3, 5 o 7 con lo que dicho anticuerpo se obtiene partir de líneas celulares de hibridoma DSM ACC2709, DSM ACC2710, DSM ACC2711 o DSM ACC2712.

El anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo humano.

El anticuerpo se caracteriza preferiblemente por una afinidad de unión a IL-13R α 1 de 10^{-9} M (K_D) o menor, preferentemente de 10^{-9} a 10^{-13} M.

5 De preferencia el anticuerpo se caracteriza porque la secuencia de aminoácido de cadena pesada variable CDR3 de dicho anticuerpo se elige del grupo constituido por las secuencias de cadena pesada CDR3 de con n^o de ED de Sec: 1, 3, 5, 7 o 9 y comprende como región variable de cadena pesada con n^o de ED de Sec: 1 y como región variable de cadena ligera con n^o de ID de Sec: 2, como región variable de cadena pesada con n^o de ID de Sec: 3, y como
10 región variable de cadena ligera con n^o de ID de Sec: 4, como región variable de cadena pesada con n^o de ID de Sec: 5 y como región variable de cadena ligera con n^o de ID de Sec: 6, como región variable de cadena pesada con n^o de ID de Sec: 7 y como región variable de cadena ligera con n^o de ID de Sec: 8 o como región variable de cadena pesada con n^o de ID de Sec: 9 y como región variable de cadena ligera con n^o de ID de Sec: 10.

15 Las secuencias para los CDR pueden determinarse de acuerdo con la definición estándar de Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Sobre esta base, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las secuencias con N^o de ID: 1-8 tiene las siguientes secuencias:

20 Los CDR de cadena pesada: CDR1 (aa 31-35) de N^o ID SEC: 1, 3, 5, 7, 9, CDR2 (aa 50-66) de N^o ID SEC: 1, 3, 5, 7, 9, CDR3 (aa 99-108) de N^o ID SEC: 1, 3, 9, CDR3 (aa 99-107) de N^o ID SEC: 5, CDR3 (aa 99-112) de N^o ID SEC: 7;

25 Los CDR de cadena ligera: CDR1 (aa 24-34) de N^o ID SEC: 2, 4, 6, 10, CDR1 (aa 24-35) de N^o ID SEC: 8, CDR2 (aa 50-56) de N^o ID SEC: 2, 4, 6, 10, CDR2 (aa 51-57) de N^o ID SEC:8 y CDR3 (aa 89-97) de N^o ID SEC: 2, 4, 6, 10, CDR3 (aa 90-97) de N^o ID SEC: 8.

30 El anticuerpo se caracteriza preferentemente por contener como región variable de la cadena pesada la SEC con N^o ID: 1 y como región variable de la cadena ligera la SEC con N^o ID: 2, como región variable de la cadena pesada la SEC con N^o ID: 3 y como región variable de la cadena ligera la SEC con N^o ID: 4, como región variable de la cadena pesada la SEC con N^o ID: 5 y como región variable de la cadena ligera la SEC con N^o ID: 6, como región variable de la cadena pesada la SEC con N^o ID: 7 y como región variable de la cadena ligera la SEC con N^o ID: 8 o como región variable de la cadena pesada la SEC con N^o ID: 9 y como región variable de la cadena ligera la SEC con N^o ID: 10.

35 El anticuerpo se caracteriza preferentemente por contener
a) como región variable de la cadena pesada la SEC con N^o ID: 1, como región variable de la cadena ligera la SEC con N^o ID: 2, como región constante de la cadena ligera κ la SEC con N^o ID: 11 y como región constante de la cadena pesada γ 1 la SEC con N^o ID: 12, opcionalmente con las mutaciones L234A y L235A o D265A y N297A,

40 b) como región variable de la cadena pesada la SEC con N^o ID: 3, como región variable de la cadena ligera la SEC con N^o ID: 4, como región constante de la cadena ligera κ la SEC con N^o ID: 11 y como región constante de la cadena pesada γ 1 la SEC con N^o ID: 12 opcionalmente con las mutaciones L234A y L235A o D265A y N297A,

45 c) como región variable de la cadena pesada la SEC con N^o ID: 5, como región variable de la cadena ligera la SEC con N^o ID: 6, como región constante de la cadena ligera κ la SEC con N^o ID: 11 y como región constante de la cadena pesada γ 1 la SEC con N^o ID: 12 opcionalmente con las mutaciones L234A y L235A o D265A y N297A,

50 d) como región variable de la cadena pesada la SEC con N^o ID: 7, como región variable de la cadena ligera la SEC con N^o ID: 8, como región constante de la cadena ligera κ la SEC con N^o ID: 11 y como región constante de la cadena pesada γ 1 la SEC con N^o ID: 12 opcionalmente con las mutaciones L234A y L235A o D265A y N297A, o

55 e) como región variable de la cadena pesada la SEC con N^o ID: 9, como región variable de la cadena ligera la SEC con N^o ID: 10, como región constante de la cadena ligera κ la SEC con N^o ID: 11 y como región constante de la cadena pesada γ 1 la SEC con N^o ID: 12 opcionalmente con las mutaciones L234A y L235A o D265A y N297A,

60 El anticuerpo se caracteriza preferentemente por su unión a IL-13R α 1 en competición con los anticuerpos LC5002-002, LC5002-003, LC5002-005, LC5002-007 y/o LC5002-018. El anticuerpo se caracteriza preferentemente por incluir como regiones variables las regiones variables de LC5002-002, LC5002-003, LC5002-005, LC5002-007 o LC5002-018. Las regiones variables de estos anticuerpos son las que se muestran en la SEC con N^o ID: 1-10. En el estado del arte existen unas regiones constantes muy útiles y bien caracterizadas. En las SEC con ID N^o: 11-12 se muestran algunas de ellas.

El anticuerpo es preferentemente monoclonal o producido de forma recombinante.

En una realización preferente de la invención el anticuerpo es un anticuerpo humano con alteración de clase.

En una realización preferida de la presente invención el anticuerpo contiene una cadena pesada humana $\gamma 1$ que incluye:

- a) la secuencia de aminoácidos Pro₂₃₃Val₂₃₄Ala₂₃₅ con delección de la Gly₂₃₆ y/o la secuencia de aminoácidos Gly₃₂₇Leu₃₂₈Pro₃₂₉Ser₃₃₀Ser₃₃₁
- b) la secuencia de aminoácidos Ala₂₃₄Ala₂₃₅ o
- c) los aminoácidos Ala₂₆₅ y Ala₂₉₇.

Preferentemente, de acuerdo con la invención, el anticuerpo inhibe la fosforilación de la Stat-6 inducida por IL-13 con un valor de CI_{50} de 6nM o menor, inhibe también la producción de eotaxina inducida por IL-13 con un valor de CI_{50} de 20nM o menor y/o inhibe la proliferación celular inducida por IL-13 o IL-4, preferentemente de células TF-1 (ATCC CRL 2003) con un valor de CI_{50} de 10nM o menor (IL-13) y 60nM o menor (IL-4). La fosforilación de Stat-6, producción de eotaxina e inducción de proliferación celular se determinan de acuerdo con los ejemplos 6 al 8.

El anticuerpo, de acuerdo con la invención, no se une al IL-13R $\alpha 1$ desnaturalizado (K_D de unión de 10^{-6} M o mayor). El anticuerpo se caracteriza preferentemente por no mostrar reacción cruzada substancial con IL-13R $\alpha 2$ y IL-4R α (K_D de unión de 10^{-6} M o mayor).

La invención proporciona también líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales antagonistas frente al IL-13R $\alpha 1$.

Las líneas celulares de hibridoma preferidas de acuerdo con la invención (hu-MAB<h-IL-13R alfa>LC.5002-002 (DSM ACC2709), hu-MAB<h IL-13R alfa>LC.5002-003 (DSM ACC2710), hu-MAB<h IL-13R alfa>LC.5002-005 (DSM ACC2711), hu-MAB<h IL-13R alfa>LC.5002-007 (DSM ACC2712)) fueron depositadas en el 13-01-2005 en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Alemania.

La invención proporciona además los ácidos nucleicos codificantes para los polipéptidos que conforman los anticuerpo, vectores de expresión incluyendo dichos ácidos nucleicos y células huésped para la producción recombinante de dichos anticuerpos. La invención también proporciona métodos para la producción recombinante de dichos anticuerpos.

Otra realización del invento es un ácido nucleico que codifica un anticuerpo que se une al IL-13R $\alpha 1$ y que inhibe la IL-13 que comprende como región variable de la cadena pesada a la región con N^o de ID SEC: 1 y como región variable de la cadena ligera a la de N^o de SEC: 2, como región variable de la cadena pesada a la región con N^o de ID SEC: 3 y como región variable de la cadena ligera a la de N^o de SEC: 4, como región variable de la cadena pesada a la región con N^o de ID SEC: 5 y como región variable de la cadena ligera a la de ID de SEC N^o: 6, como región variable de la cadena pesada a la región con ID de SEC N^o: 7 y como región variable de la cadena ligera a la de ID de SEC N^o: 8 o como región variable de la cadena pesada a la región con N^o de ID SEC: 9 y como región variable de la cadena ligera a la de ID de SEC N^o:10.

Los anticuerpos, de acuerdo con la presente invención, se han demostrado beneficiosos para pacientes con necesidad de terapia corticosteroide. Dichos anticuerpos poseen nuevas e innovadoras propiedades que benefician al paciente que sufre asma o enfermedad alérgica.

La invención incluye además el uso del anticuerpo sujeto de la invención para el tratamiento del asma y para la fabricación de compuestos farmacéuticos de acuerdo con la invención. Además, la invención incluye un método para la fabricación de un compuesto farmacéutico de acuerdo con la invención.

La invención también incluye un compuesto farmacéutico que contiene el anticuerpo sujeto de invención con una dosis farmacéutica efectiva, junto con un tampón y/o adyuvante opcional, útil para la formulación de los anticuerpos para finalidades farmacéuticas.

La invención también proporciona compuestos farmacéuticos que incluyen dichos anticuerpos en un vehículo aceptable farmacéuticamente. En una realización, la composición farmacéutica puede ser incluida en un artículo manufacturado o en un kit.

La invención incluye también un vector que contiene un ácido nucleico el cual es capaz de ser expresado en una célula huésped eucariota o procarionta.

La invención también incluye una célula huésped procarionta o eucariota conteniendo el vector de acuerdo con la invención.

La invención también incluye un método para la producción recombinante del anticuerpo humano sujeto de la

invención, caracterizado por la expresión de un ácido nucleico de acuerdo con la invención en una célula huésped procariota o eucariota y la recuperación de dicho anticuerpo de la célula citada. La invención también comprende el anticuerpo obtenible mediante dicho método recombinante.

- 5 La invención también comprende un método para la preparación de un compuesto farmacéutico caracterizado por seleccionar un anticuerpo frente a IL-13R α 1 a partir de una pluralidad de anticuerpos frente a IL-13R α 1 en relación con tal ensayo sin dicho anticuerpo, produciendo el citado anticuerpo mediante expresión recombinante, recuperando dicho anticuerpo y combinándolo con un tampón y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable. El anticuerpo tendrá preferentemente una o más de las propiedades mencionadas más arriba.

10

Descripción detallada de la invención

15 Los términos "IL-13R α 1, IL-13R α 1 murino, IL-13, IL-13R α 2 e IL-4R α " y sus dominios están bien definidos en el estado actual del arte y definidos por ejemplo en SwissProt P78552, O09030, P35225, Q14627 y P24394. Si no se indica lo contrario, los términos "IL-13R α 1, IL-13, IL-13R α 2 e IL-4R α " denotan por lo tanto los polipéptidos humanos IL-13R α 1, IL-13, IL-13R α 2 e IL-4R α .

20 El término "anticuerpo humano", tal y como se usa a partir de aquí, incluye a los anticuerpos que poseen regiones constantes (dominios) que pueden ser asignados a secuencias de inmunoglobulinas pertenecientes a líneas germinales humanas definidas debido a su alta similitud de secuencias o a su identidad con tales secuencias de líneas germinales. Los anticuerpos humanos resultan bien conocidos en el estado del arte (van Dijk, M.A., y van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374). Los anticuerpos humanos pueden producirse también en animales transgénicos (ej. ratones) que son capaces, tras ser inmunizados, de producir un repertorio completo o una selección de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. La transferencia de la serie de genes de la inmunoglobulina de la línea germinal humana a la línea germinal de ratones resulta en la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno (véase por ej., Jakobovits, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., et al., Nature 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., et al., Year Immunol. 7 (1993) 33-40). Los anticuerpos humanos pueden producirse también en bibliotecas de "phage display" (Hoogenboom, H.R., y Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388; Marks, J.D., et al., J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597). Las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. Están también disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); y Boerner, P., et al., J. Immunol. 147 (1991) 86-95). Dentro de la definición de anticuerpo humano se incluyen diferentes formas, preferiblemente la de anticuerpos monoclonales, comprendiendo pero no estando limitado a anticuerpos completos, fragmentos de anticuerpo, anticuerpos con alteración de clase y anticuerpos modificados genéticamente (anticuerpos mutantes o variantes) mientras se mantengan las propiedades características de la invención. Especialmente preferidos son los anticuerpos recombinantes humanos. El término "anticuerpo monoclonal", tal y como se utiliza en adelante, se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo, todas ellas con una composición de aminoácidos substancialmente idéntica.

40 El término "anticuerpo recombinante humano", tal y como se usa a partir de aquí, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que son preparados, expresados, creados o aislados mediante métodos recombinantes, tales como los anticuerpos aislados a partir de células huésped tales como NSO o CHO o a partir de animales (ej: ratón) que son transgénicos para los genes de la inmunoglobulina humana o los anticuerpos expresados utilizando un vector de expresión recombinante transfectedo en la citada célula huésped. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen una región constantes y variables en disposición reorganizada. Los anticuerpos recombinantes humanos de acuerdo con la invención han sido sujetos a una hipermutación somática in vivo. Por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que pueden asignarse a unas determinadas secuencias VH y VL de líneas germinales humanas, pero que pueden no existir de forma natural dentro del repertorio in vivo de las líneas germinales humanas.

50 El término "anticuerpo con alteración de clase" se refiere a un anticuerpo monoclonal, preferiblemente un anticuerpo humano, que comprende una región variable, la región de unión, que proviene de una fuente de línea germinal y al menos una porción de una región constante que corresponde a una región constante de una fuente de línea germinal diferente, preparada normalmente mediante técnicas de DNA recombinante. Tales anticuerpos con alteración de clase no se encuentran de manera natural y por tanto no se pueden obtener de manera directa a partir de ratones xenoinplantados. Las formas de anticuerpos con alteración de clase incluidas en la presente invención son aquellas en las cuales la región constante presenta diferencias respecto a la secuencia silvestre de la región constante, dando como resultado un anticuerpo con propiedades diferentes de acuerdo con la invención, especialmente en relación con la unión a C1q y/o al receptor Fc (FcR), ya sea por cambio o mutación del Fc. Los anticuerpos con alteración de clase son el producto de expresión de genes para inmunoglobulina que incluyen fragmentos de DNA codificantes para las regiones variables de la inmunoglobulina y fragmentos de DNA codificantes para las regiones constantes de la inmunoglobulina. Los métodos para la producción de los anticuerpos con alteración de clase implican técnicas convencionales de DNA recombinante y transfección génica, bien conocidas en el estado del arte (véase, ej: Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855;

60

Patentes Estadounidenses números 5.202.238 y 5.204.244).

La "región variable" (región variable de la cadena ligera (VL), región variable de la cadena pesada (VH)) tal y como se aplica de aquí en adelante, se refiere a la parte de cada par de cadenas ligera y pesada que está directamente implicada en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de las cadenas ligera y pesada humanas tiene la misma estructura general y cada dominio está formado por cuatro regiones marco (FR) cuyas secuencias están ampliamente conservadas, conectadas entre si por tres "regiones hipervariables" (o regiones determinantes de la complementariedad, CDRs). Las regiones marco adoptan una conformación de hoja β y los CDR pueden formar lazos de conexión entre la estructura de lámina beta. Las CDR de cada cadena se mantienen en una estructura tridimensional mediante las regiones marco y forman, en conjunto con las CDR de la otra cadena, el lugar de unión al antígeno. Las regiones CDR3 de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, preferentemente la CDR3 de la cadena pesada, juegan un papel particularmente importante en la especificidad y afinidad de unión de los anticuerpos en concordancia con la invención y por lo tanto constituyen también objeto de la invención.

Los términos "región hipervariable" o "porción de unión al antígeno de un anticuerpo" tal y como se utilizan a partir de aquí, hacen referencia a los residuos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende los residuos de aminoácido de las "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". Las regiones "marco" o regiones "FR" son aquellas regiones de dominio variable aparte de los residuos de la región hipervariable tal y como han sido definidas. Por lo tanto, las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo comprenden, desde el extremo N al C, los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, y FR4. Las regiones CDR y FR están determinadas de acuerdo con las definiciones estándar dadas por Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

Los "dominios constantes" no están implicados de manera directa en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero poseen varias funciones efectoras. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos o inmunoglobulinas se dividen en las clases: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas clases pueden ser a su vez subdivididas en subclases (isotipos), por ej: IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, IgA1 y IgA2. Las regiones constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas son las llamadas μ , δ , γ , α , y ϵ . Los anticuerpos correspondientes a la invención son preferentemente del tipo IgG1.

La parte Fc de un anticuerpo está implicada directamente en la activación del complemento, unión a C1q, activación de C3 y unión a receptor de Fc. La unión a C1q viene mediada por unos lugares de unión definidos en la parte Fc. Dichos lugares de unión son conocidos en el estado del arte actual y definidos por ej. en Lukas, T.J., et al., *J. Immunol.* 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R., y Cebra, J.J., *Mol. Immunol.* 16 (1979) 907-917; Burton, D.R., et al., *Nature* 288 (1980) 338-344; Thommesen, J.E., et al., *Mol. Immunol.* 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E., et al., *J. Immunol.* 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M., et al., *J. Virol.* 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., et al., *Immunology* 86 (1995) 319-324; y EP 0 307 434. Tales lugares de unión son por ej: L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numerados de acuerdo con el índice EU de Kabat, ver más abajo). Los anticuerpos de las subclases IgG1, IgG2 e IgG3 suelen tener acción activadora del complemento, unión a C1q y activación de C3, mientras que los anticuerpos IgG4 no activan el sistema del complemento, no se unen a Cq1 y no activan a C3. El término "fragmento Fc derivado de origen humano", tal y como se emplea de aquí en adelante, define un fragmento Fc que preferiblemente tiene una secuencia aminoácídica correspondiente al fragmento Fc de un anticuerpo humano de la subclase IgG1, modificado de tal manera que no se puede detectar unión a c1q, activación de C3 y/o unión a Fc, o la unión está disminuida al menos en un 50%, preferiblemente en un 70%, en comparación al anticuerpo IgG1 humano. El término "parte Fc de un anticuerpo" es bien conocido para el especialista formado, siendo definido en base a la digestión con papaína de los anticuerpos. Los anticuerpos correspondientes a la invención contienen una parte Fc, preferiblemente con una secuencia de aminoácidos de una parte Fc derivada a partir de un origen humano y preferiblemente todas las demás partes de las regiones constantes humanas. Preferiblemente la parte Fc es una parte Fc humana mutada a partir de la subclase IgG1. De preferencia prioritaria son las partes Fc que incluyen una región constante $\gamma 1$ de la cadena pesada (un ejemplo se muestra en la SEC con N° de ID: 11) con mutaciones L234A y L235A o D265A y N297A (WO99/51642).

Las cadenas constantes humanas ej. las cadenas pesadas $\gamma 1$ están descritas en detalle por Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), y por Brüggemann, M., et al., *J. Exp. Med.* 166 (1987) 1351-1361; Love, T.W., et al., *Methods Enzymol.* 178 (1989) 515-527. Los dominios constantes preferidos en la invención no tienen unión a complemento. La "región variable" (región variable de la cadena ligera (VL), región variable de la cadena pesada (VH)) tal y como se utiliza de aquí en adelante denota cada uno del par de cadenas ligeras y pesadas que están implicadas directamente en la unión del anticuerpo al antígeno

El término ácido nucleico o molécula de ácido nucleico, tal y como se utiliza de aquí en adelante, pretende incluir todas las moléculas de DNA y RNA. Una molécula de ácido nucleico puede ser monohebra o doble hebra, pero preferiblemente es DNA de doble hebra.

Un ácido nucleico está "ligado operativamente" cuando se sitúa en relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el DNA para una presecuencia o señal de secreción está ligado operativamente al DNA para un polipéptido si es expresado en forma de preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está ligado operativamente a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia; o un lugar de unión para ribosoma está ligado operativamente a una secuencia codificante si se posiciona de manera que facilita la traducción. Generalmente, "ligado operativamente" hace referencia a que las secuencias de DNA ligadas están en cis y, en el caso de una señal de secreción, de forma contigua y en pauta de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen por que estar contiguos ni en pauta de lectura. Esta conexión operativa puede conseguirse por ligación mediante los lugares de restricción adecuados. Si tales lugares no existen, se utilizan los adaptadores de oligonucleótido necesarios de acuerdo con práctica común.

Tal y como se usa a partir de aquí, las expresiones "célula", "línea celular", y "cultivo celular" pueden aplicarse de manera indistinta y todas ellas incluyen la progenie. Por lo tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula sujeto primaria y los cultivos de allí derivados sin importar el número de transferencias. Se entiende también que toda la progenie no debe ser idéntica en su contenido de DNA, debido a mutaciones inducidas o inadvertidas. Toda la progenie variante que tiene la misma función o actividad biológica definida para la célula transformante original queda incluida. Donde se apliquen designaciones diferentes se pondrá en evidencia a partir del contexto.

El término "unión a IL-13R α 1" tal y como será utilizado a partir de aquí se refiere a la unión del anticuerpo a IL-13R α 1 en un ensayo in vitro, preferiblemente en un ensayo de unión en el cual el anticuerpo se une a una superficie y la unión a IL-13R α 1 se mide mediante resonancia Plasmática de Superficie (SPR). La unión está definida por una afinidad de unión (K_D) de 10^{-8} M o menor, preferentemente 10^{-13} a 10^{-9} M. "Sin unión" implica una K_D de 10^{-6} M o mayor. Los anticuerpos referentes a la invención se unen al dominio extracelular de la IL-13R α 1 humana y preferiblemente también al IL-13R α 1 de ratón.

La unión a IL-13R α 1 puede determinarse utilizando el ensayo BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden). La afinidad de la unión está definida por los términos k_a (tasa constante para la asociación del anticuerpo a partir del complejo antígeno/anticuerpo), k_d (tasa de disociación), y K_D (k_d/k_a).

La unión de IL-13 a IL-13R α 1 es inhibida por los anticuerpos correspondientes a la invención. La inhibición se mide en términos de CI_{50} en un ELISA de unión de IL-13 al heterodímero IL-13R α 1/IL-4R α . Para llevar a cabo dicho ensayo el IL-13R α 1 se inmoviliza y se añaden la IL-13 y el IL-4R α . Los valores de CI_{50} de los anticuerpos de acuerdo con la invención para la unión de IL-13 a IL-13R α 1 no son mayores de 6nM. Los valores de IC_{50} se miden como valores de la media o promedio de al menos tres medidas independientes. Es posible que los valores individuales de CI_{50} estén fuera del rango.

Los anticuerpos sujeto de la invención muestran preferiblemente una unión a los mismos epítomos del IL-13R α 1 que los anticuerpos seleccionados del grupo consistente en los anticuerpos LC5002-002, LC5002-003, LC5002-005, LC5002-007 o LC5002-018 o su unión a IL-13R α 1 está inhibida por impedimentos estéricos por la unión de estos anticuerpos. La inhibición de la unión puede detectarse mediante un ensayo de SPR utilizando un anticuerpo inmovilizado seleccionado a partir del grupo que incluye a los anticuerpos LC5002-002, LC5002-003, LC5002-005, LC5002-007 o LC5002-018 y IL-13R α 1 a una concentración de 20-50nM, estando el anticuerpo a detectar a una concentración de 100nM. Una reducción de señal del 50% o mayor demuestra competición por parte del anticuerpo frente a un anticuerpo seleccionado del grupo de anticuerpos que incluye a LC5002-002, LC5002-003, LC5002-005, LC5002-007 o LC5002-018. El término "epítopo" se refiere a un determinante proteico capaz de unión específica frente a un anticuerpo. Un epítopo suele consistir en agrupamientos de moléculas químicamente activos, de cadenas laterales de aminoácidos o azúcares y normalmente poseen unas características de estructura tridimensional específicas, así como una carga definida. Los epítomos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión a los primeros pero no a los últimos se pierde en presencia de agentes desnaturizantes. La invención incluye también un anticuerpo humano que se une a IL-13R α 1 inhibiendo la bioactividad de IL-13, caracterizado por una afinidad de 10^{-9} M (K_D) o menor, preferentemente de 10^{-9} a 10^{-13} M para la unión a IL-13R α 1 y por una afinidad de 10^{-7} M (K_D) o menor, preferentemente de 10^{-8} a 10^{-9} M para la unión a la IL-13R α 1 de ratón.

En una realización preferida de la invención, los anticuerpos de acuerdo con la invención son caracterizados más a fondo por tener una o más de las características seleccionadas a partir del grupo de parámetros de unión k_a , k_d y K_D , uniéndose al mismo epítopo al cual se une un anticuerpo seleccionado a partir del grupo compuesto por los anticuerpos LC5002-002, LC5002-003, LC5002-005, LC5002-007 o LC5002-018.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención se producen de manera preferente por métodos recombinantes. Tales métodos son conocidos ampliamente en el estado del arte e incluyen expresión de proteínas en células eucariotas y procariotas con el aislamiento subsecuente del polipéptido de anticuerpo y normalmente una purificación hasta obtener una pureza aceptable desde el punto de vista farmacológico. Para la expresión de la proteína, los ácidos nucleicos codificantes para las cadenas ligera y pesada o fragmentos de las mismas, se insertan en vectores de expresión mediante métodos estándar. La expresión se lleva a cabo en las células huésped adecuadas, eucariotas o

procariotas, como las células CHO, NSO, SP/2, HEK293, COS, levadura o E.coli, siendo recuperado el anticuerpo a partir de las células (sobrenadante o tras una lisis celular).

5 La producción recombinante de anticuerpos es bien conocida en el actual estado del arte, estando descrita por ejemplo, en artículos de revisión como los de Makrides, S.C., *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202; Geisse, S., et al., *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-161; Werner, R.G., *Drug Res.* 48 (1998) 870-880.

10 Los anticuerpos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular o en forma parcialmente o sustancialmente purificada. La purificación se lleva a cabo para eliminar otros componentes celulares u otros contaminantes, por ej: otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándar, que incluyen el tratamiento con álcali y SDS, el bandeo con CsCl, la cromatografía en columna electroforesis en gel de agarosa y otros métodos bien conocidos en el estado del arte. Ver Ausubel, F., et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

15 La expresión en células NSO está descrita por Barnes, L.M., et al., *Cytotechnology* 32 (2000) 109-123; y Barnes, L.M., et al., *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270. La expresión transitoria está descrita entre otros por Durocher, Y., et al., *Nucl. Acids. Res.* 30 (2002) E9. La clonación de dominios variables está descrita por Orlandi, R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; y por Norderhaug, L., et al., *J. Immunol. Methods* 204 (1997) 77-87. Un sistema de expresión transitoria preferido (HEK 293) es el descrito por Schlaeger, E.-J., y Christensen, K., en *Cytotechnology* 30 (1999) 71-83 y por Schlaeger, E.-J., en *J. Immunol. Methods* 194 (1996) 191-199.

25 Las secuencias de control adecuadas para procariotas incluyen típicamente un promotor, opcionalmente una secuencia operadora y un lugar de unión para el ribosoma. Las células eucariotas se conocen por utilizar promotores, potenciadores y señales de poliadenilación.

30 Los anticuerpos monoclonales son separados de forma adecuada del medio de cultivo mediante protocolos convencionales de purificación de inmunoglobulinas, tales como, por ejemplo, proteína A unida a sefarosa, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. El DNA o RNA codificante para los anticuerpos monoclonales se puede aislar y secuenciar de manera efectiva utilizando los métodos convencionales. Las células de hibridoma pueden servir como fuente de dicho DNA y RNA. Una vez aislado, el DNA puede ser insertado en vectores de expresión, que son transfectados a continuación en células huésped tales como las CHO, HEK293, o de mieloma que de otra manera no producirían inmunoglobulinas, para obtener así la síntesis de los anticuerpos monoclonales recombinantes.

40 Los anticuerpos de acuerdo con la invención incluyen, además, a aquellos que presenten "modificaciones conservativas en la secuencia", modificaciones de aminoácidos o de nucleótidos que no afectan o alteran a las características del anticuerpo de acuerdo con la invención, mencionadas más arriba. Pueden introducirse modificaciones mediante técnicas estándar conocidas en el estado del arte, tales como la mutagénesis dirigida y la mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen aquellas en las que el residuo de aminoácido es sustituido por otro residuo aminoácido con una cadena lateral similar. Las familias de aminoácidos con cadenas laterales similares han sido definidas en el estado del arte. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo glicina, asparragina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales con ramificaciones beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por tanto, un residuo aminoácido con predicción de no ser esencial en un anticuerpo humano anti IL-13R α 1 puede ser sustituido preferentemente por otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadena lateral.

55 Las sustituciones de aminoácido pueden llevarse a término mediante mutagénesis basada en modelos moleculares tal y como describe Riechmann, L., et al., *Nature* 332 (1988) 323-327 y Queen, C., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 10029-10033.

60 Las secuencias de aminoácidos variantes de los anticuerpos humanos frente a IL-13R α 1 se preparan mediante la introducción del cambio de nucleótido apropiado en el DNA codificante para el anticuerpo, o por síntesis peptídica. Tales modificaciones pueden llevarse a cabo, sin embargo, sólo dentro de un margen muy limitado como el que se describe más arriba. Por ejemplo, las modificaciones no deben alterar las características del anticuerpo mencionadas más arriba, tales como el isotipo de IgG y la unión al epítipo, pero pueden mejorar el rendimiento de la producción recombinante, la estabilidad de la proteína o facilitar su purificación.

65 Cualquier residuo de cisteína que no esté implicado en mantener la conformación adecuada del anticuerpo anti-IL-13R α 1, puede ser también sustituido, generalmente con una serina para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar la formación de puentes de azufre aberrantes. De forma complementaria se podrían añadir puentes

de azufre mediados por cisteínas al anticuerpo para mejorar así su estabilidad (en especial cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo como el fragmento Fv).

Otro tipo de variante de aminoácidos en el anticuerpo consistiría en la alteración del patrón original de glicosilación. Por alteración se entiende la delección de uno o más grupos carbohidrato presentes en el anticuerpo, y/o la adición de uno o más lugares de glicosilación que no estuviesen presentes en el anticuerpo originalmente. La glicosilación de los anticuerpos se suele hacer generalmente a través de la unión del grupo carbohidrato al grupo amino de la cadena lateral de la asparragina. Los tripéptidos de secuencia asparragina-X-serina y asparragina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto la prolina, resultan secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del grupo carbohidrato a la cadena lateral de la asparragina. Por tanto, la presencia de cualquiera de esos tripéptidos en un polipéptido crea un lugar potencial de glicosilación. La adición de dianas de glicosilación a un anticuerpo se puede conseguir mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos de manera que pase a contener una o más de las arriba mencionadas secuencias tripépticas (para los lugares de N-glicosilación).

Las moléculas de ácido nucleico codificantes para anticuerpos anti-IL-13R α 1 con secuencias de aminoácidos variantes se preparan mediante una diversidad de métodos conocidos en el estado del arte. Estos métodos incluyen, aunque no se limitan a, la extracción a partir de la fuente natural (para el caso de las variantes de aminoácidos que se generen de forma natural) o la preparación por mutagénesis dirigida o mediada por oligonucleótido, mutagénesis por PCR o por mutagénesis por casete de una versión variante o no variante del anticuerpo anti-13R α 1 preparado con anterioridad.

Otro tipo de modificación covalente es la que implica el enlace al anticuerpo por vía química o enzimática de grupos glucosídicos. Estos procedimientos presentan la ventaja de no requerir la producción del anticuerpo en una célula huésped que tenga la capacidad de glicosilar ya sea por vía N- u O-. Dependiendo del tipo de acoplamiento utilizados, el azúcar/es puede ser unido (a) a un residuo de arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de la cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de la serina, treonina o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos tales como serían el triptófano, la fenilalanina o la tirosina, o (f) al grupo amida de la glutamina. Estos métodos están descritos en WO 87/05330, y en Aplin, J.D., y Wriston, J.C. Jr., CRC Crit. Rev. Biochem. (1981) 259-306.

La eliminación de cualquiera de los grupos carbohidrato presentes en el anticuerpo se puede conseguir por métodos enzimáticos o químicos. La deglicosilación química puede conseguirse por la exposición del anticuerpo a ácido trifluorometanosulfónico, o a compuestos equivalentes. Este tratamiento da como resultado la separación de la mayor parte de los azúcares excepto los de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando el anticuerpo intacto, la deglicosilación química esta descrita por Sojahn, H.T., y Bahl, O.P., Arch. Biochem. Biophys. 259 (1987) 52-57 y por Edge, A.S., et al. Anal. Biochem. 118 (1981) 131-137. La separación enzimática de los grupos carbohidrato de los anticuerpos puede conseguirse mediante el uso de una gran variedad de endo- y exoglicosilasas, tal y como está descrito por Thotakura, N.R., y Bahl, O.P., Meth. Enzymol. 138 (1987) 350-359.

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo consiste en la unión al anticuerpo a cualquiera de toda una variedad de polímeros de carácter no proteico, como puede ser el polietilenglicol, el polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera establecida en las patentes Estadounidenses con los números 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337.

En otro aspecto diferente, la invención proporciona células B aisladas a partir de animales transgénicos, por ejemplo un ratón transgénico, que expresa los anticuerpos humanos anti-IL-13R α 1 de acuerdo con la invención. Preferiblemente, las células B aisladas se obtienen a partir de animales transgénicos no humanos, por ejemplo el ratón, que hayan sido inmunizado con una preparación purificada o enriquecida de antígeno IL-13R α 1 y/o células que expresen el IL-13R α 1. De preferencia, el animal transgénico no humano, por ejemplo el ratón, tiene un genoma que incluye el transgen codificante para la cadena pesada humana y el transgen para la cadena ligera humana, codificando la totalidad o una parte de un anticuerpo de la invención. Las células B aisladas son a continuación inmortalizadas para proveer una fuente (un hibridoma) de anticuerpos humanos anti-IL-13R α 1. En consecuencia, la presente invención también provee un hibridoma con la capacidad de producir anticuerpos monoclonales humanos de acuerdo con la invención. En una de las realizaciones, el hibridoma incluye una célula B obtenida a partir de un animal transgénico no humano, por ejemplo un ratón transgénico, que posee un genoma que incluye un transgen codificante para la cadena pesada humana y el transgen para la cadena ligera humana, codificando la totalidad o una parte de un anticuerpo de la invención, fusionada con una célula inmortalizada.

En una realización particular, el animal transgénico no humano es un ratón transgénico que posee un genoma con un transgen codificante para la cadena pesada humana y el transgen para la cadena ligera humana, codificando la totalidad o una parte de un anticuerpo de la invención. El animal transgénico no humano puede ser inmunizado con una preparación purificada o enriquecida de antígeno IL-13R α 1 y/o células que expresen el IL-13R α 1. De preferencia, el animal transgénico no humano, por ejemplo el ratón transgénico, será capaz de producir anticuerpos monoclonales humanos del isotipo IgG1 frente al IL-13R α 1.

Los anticuerpos monoclonales humanos de acuerdo con la invención pueden obtenerse mediante la inmunización de un animal transgénico no humano, por ejemplo un ratón transgénico, que posea un genoma con un transgen codificante para la cadena pesada humana y el transgen para la cadena ligera humana, codificando la totalidad o una parte de un anticuerpo de la invención, con una preparación purificada o enriquecida de antígeno IL-13R α 1 y/o células que expresen el IL-13R α 1. A continuación se obtienen las células B del animal (por ejemplo células B de bazo) y se fusionan con células de mieloma para conseguir células de hibridoma inmortales que secreten anticuerpos monoclonales humanos frente al IL-13R α 1.

En una realización preferida, los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra IL-13R α 1 pueden ser generados, utilizando para ello ratones transgénicos portadores de partes del sistema inmunitario humano en lugar del propio del ratón. Esos ratones transgénicos, designados a partir de aquí como "ratones huMab", contienen miniloci para genes de las inmunoglobulinas humanas no reorganizados, incluyendo los genes para las regiones constantes de las cadenas pesadas (μ e γ) y ligera κ , junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci para las cadenas μ y κ endógenas (Lonberg, N., et al., *Nature* 368 (1994) 856-859). De forma correspondiente, estos ratones presentarán una reducción de la expresión de las IgM o K de ratón, y como respuesta a la inmunización, los transgenes introducidos para las cadenas pesada y ligera humanas sufrirán intercambio de clase y mutaciones somáticas para generar anticuerpos monoclonales humanos IgG de alta afinidad (Lonberg, N., et al., *Nature* 368 (1994) 856-859; revisado en Lonberg, N., *Handbook of Experimental Pharmacology* 113 (1994) 49-101; Lonberg, N., y Huszar, D., *Intern. Rev. Immunol.* 25 (1995) 65-93; y Harding, F., y Lonberg, N., *Ann. N. Acad. Sci.* 764 (1995) 536-546). La preparación de HuMab en ratones está descrita por Taylor, L., et al., *Nucleic Acids Research* 20 (1992) 6287-6295; Chen, J., et al., *International Immunology* 5 (1993) 647-656; Tuailon, N., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90 (1993) 3720-3724; Choi, T.K., et al., *Nature Genetics* 4 (1993) 117-123; Chen, J., et al., *EMBO J.* 12 (1993) 821-830; Tuailon, N., et al., *Immunol.* 152 (1994) 2912-2920; Lonberg, N., et al., *Nature* 368 (1994) 856-859; Lonberg, N., *Handbook of Experimental Pharmacology* 113 (1994) 49-101; Taylor, L., et al., *Int. Immunol.* 6 (1994) 579-591; Lonberg, N., y Huszar, D., *Intern. Rev. Immunol.* 25 (1995) 65-93; Harding, F., y Lonberg, N., *Ann. N. Acad. Sci.* 764 (1995) 536-546; Fishwild, D.M., et al., *Nat. Biotechnol.* 14 (1996) 845-851. Para más información véanse las patentes Estadounidense número 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; 5.545.807; 5.770.429; WO 98/24884; WO 94/25585; WO 93/1227; WO 92/22645; y WO 92/03918.

Para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos frente a IL-13R α 1, los ratones HuMab pueden ser inmunizados con una preparación de antígeno IL-13R α 1 purificado o enriquecido y/o células que expresen IL-13R α 1 de acuerdo con el método general, tal y como está descrito por Lonberg, N., et al., *Nature* 368 (1994) 856-859; Fishwild, D.M., et al., *Nat. Biotechnol.* 14 (1996) 845-851 y WO 98/24884. Preferiblemente, los ratones tendrán de 6 a 16 semanas de edad en el momento de la primera inmunización. Por ejemplo, una preparación purificada o enriquecida del antígeno IL-13R α 1 (por ejemplo, purificado a partir de células que expresen IL-13R α 1) puede ser utilizada para inmunizar los ratones HuMab intraperitonealmente. Si resultase que las inmunizaciones utilizando una preparación purificada o enriquecida del antígeno IL-13R α 1 no diesen como resultado la producción de anticuerpos, los ratones pueden ser también inmunizados con células que expresen IL-13R α 1, por ejemplo una línea celular tumoral, que pudiera inducir respuesta inmunitaria. La experiencia acumulada utilizando diferentes antígenos ha demostrado que los ratones transgénicos HuMab responden mejor cuando la inmunización inicial se hace por vía intraperitoneal utilizando antígeno con adyuvante completo de Freund, seguida de inmunizaciones semanales alternando la vía intraperitoneal con la subcutánea con antígeno en adyuvante incompleto de Freund. La respuesta inmunitaria puede ser monitorizada a lo largo del protocolo de inmunización utilizando muestras de plasma obtenidas por sangrados retroorbitales. El plasma puede ser analizado por ELISA, y los ratones con títulos suficientes de inmunoglobulinas humanas anti-IL-13R α 1 pueden utilizarse para la inmortalización de las células B correspondientes. Los ratones pueden ser reinoculados con antígeno por vía intravenosa de 3 a 4 días antes del sacrificio y extracción del bazo y nódulos linfáticos. Cabe esperar que sea necesario llegar a realizar de 2 a 3 fusiones para cada antígeno. Varios ratones serán inmunizados para cada antígeno. Por ejemplo, se puede inmunizar un total de 5 a 12 ratones HuMab de las cepas HCo7 y HCo12.

Los ratones HCo7 tienen una disrupción JKD en los genes para su cadena ligera endógena (κ) (tal como está descrito en Chen, J., et al., *EMBO J.* 12 (1993) 821-830), una disrupción CMD en sus genes endógenos para la cadena pesada (tal y como está descrito en el ejemplo 1 del WO 01/14424), un transgen humano KCo5 para la cadena ligera κ (según lo descrito en Fishwild, D.M., et al., *Nat. Biotechnol.* 14 (1996) 845-851), y un transgen HCo7 para la cadena pesada humana (según lo descrito en la patente Estadounidense N $^{\circ}$ 5.770.429).

Los ratones HCo12 tienen una disrupción JKD en los genes para su cadena ligera endógena (κ) (tal como está descrito en Chen, J., et al., *EMBO J.* 12 (1993) 821-830), una disrupción CMD en sus genes endógenos para la cadena pesada (tal y como está descrito en el ejemplo 1 del WO 01/14424), un transgen humano KCo5 para la cadena ligera κ (según lo descrito en Fishwild, D.M., et al., *Nat. Biotechnol.* 14 (1996) 845-851), y un transgen HCo12 para la cadena pesada humana (según lo descrito en el Ejemplo 2 del WO 01/14424).

Los linfocitos de ratón pueden ser aislados y fusionados con líneas celulares de mieloma para producir hibridomas utilizando protocolos estándar basados en el uso de PEG. Los hibridomas resultantes son rastreados para

comprobar la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, suspensiones celulares de linfocitos obtenidos de bazo o nódulo linfático a partir de ratones inmunizados son fusionadas con una sexta parte de células de mieloma de ratón no secretoras SP 2/0 (ATCC, CRL 1581) con PEG al 50%. Las células se plaquean a una densidad aproximada de 2×10^5 en microplacas de fondo plano, incubándose durante unas dos semanas en medio selectivo.

Los pocillos individuales son rastreados por ELISA para detectar los anticuerpos IgM e IgG frente a IL-13R α 1. Una vez se ha producido el suficiente crecimiento del hibridoma, es analizado el medio, normalmente después de 10 a 14 días. Los hibridomas que secreten anticuerpos son plaqueados de nuevo y caracterizados otra vez, si siguen siendo positivos para anticuerpos humanos monoclonales del tipo IgG frente a IL-13R α 1, pueden ser subclonados un mínimo de dos veces por dilución limitante. Los subclones estables se cultivan in vitro para obtener medio con producción de anticuerpos para su caracterización.

Debido a que las secuencias CDR son las responsables de las interacciones entre el antígeno y el anticuerpo, es posible expresar anticuerpos recombinantes de acuerdo con la invención mediante la construcción de vectores de expresión que incluyan las secuencias CDR de acuerdo con la invención dentro de secuencias marco para un anticuerpo humano diferente. (véase por ejemplo, Riechmann, L., et al., Nature 332 (1998) 323-327; Jones, P., et al., Nature 321 (1986) 522-525; y Queen, C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86 (1989)10029-10033). Tales secuencias marco pueden ser obtenidas a partir de las bases de datos públicas de DNA que incluyen las secuencias de los genes de las líneas germinales codificantes para anticuerpos humanos. Estas secuencias de líneas germinales se diferenciarán de las secuencias génicas maduras debido que no incluirán regiones variables reorganizadas, que se forman mediante la unión V (D) J durante la maduración de las células B. Las secuencias génicas de las líneas germinales presentan también diferencias puntuales respecto a las secuencias del repertorio secundario de anticuerpos de alta afinidad distribuidas de manera uniforme a lo largo de la región variable.

La invención incluye preferentemente un fragmento de ácido nucleico codificante para un polipéptido con capacidad de unirse al IL-13R α 1, donde dicho polipéptido inhibe la unión de la IL-13 al IL-13R α 1, seleccionado a partir del grupo que incluye

- a) una cadena pesada de anticuerpo que incluya una de las CDR de cadena pesada con N° de ID SEC: 1, 3, 5, 7 o 9;
- b) una cadena ligera de anticuerpo que incluya una de las CDR de cadena ligera con N° de ID SEC: 2, 4, 6, 8 o 10.

Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera así reconstruidas, se combinan con las secuencias de un promotor, de iniciación de traducción, región constante, 3' no traducida, de poliadenilación y de terminación de la transcripción para formar el constructo en el vector de expresión. Los constructos de expresión para las cadenas pesada y ligera pueden ser combinados en un único vector de expresión, transfectarse conjuntamente, de manera consecutiva o de manera separada a las células huésped que son a continuación fusionadas para conseguir una única célula huésped que exprese ambas cadenas.

Como resultado, la invención proporciona un método para la producción de un anticuerpo humano recombinante de acuerdo con la invención, incluyendo la expresión de un ácido nucleico codificante para

- a) una cadena pesada de anticuerpo que incluya una de las CDR de cadena pesada con N° de ID SEC: 1, 3, 5, 7 o 9;
- b) una cadena ligera de anticuerpo que incluya una de las CDR de cadena ligera con N° de ID SEC: 2, 4, 6, 8 o 10.

Asimismo la invención también incluye el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención para la detección del IL-13R α 1 in vitro, preferentemente por medio de un ensayo inmunológico que determine la unión entre IL-13R α 1 de una muestra y el anticuerpo de acuerdo con la invención.

Por otro lado, la presente invención provee una composición, por ejemplo una composición farmacéutica, incluyendo uno o una combinación de anticuerpos monoclonales humanos, o la parte correspondiente de unión a antígeno, de la presente invención, formulado junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Tal y como se utiliza a partir de aquí, el término "vehículo farmacéutico aceptable" incluye a todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes y similares que sean fisiológicamente compatibles. De preferencia, el vehículo será adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por inyección o infusión).

El término "sal aceptable farmacéuticamente" hace referencia a una sal que retenga la actividad biológica deseada del anticuerpo sin provocar ningún efecto toxicológico indeseado (véase por ejemplo Berge, S.M., et al., J. Pharm. Sci. 66 (1977) 1-19). Tales sales están incluidas en la invención. Ejemplos de tales sales incluyen las de naturaleza ácida y las de naturaleza básica. Las ácidas incluyen a aquellas derivadas a partir de sales inorgánicas no tóxicas, como serían las sales de hidrócloruro.

Un compuesto de la presente invención puede ser administrado por medio de una variedad de métodos conocidos en el estado del arte. Tal como será evidente para el técnico especialista, la ruta y/o modo de administración variará dependiendo de cuales sean los resultados esperados.

5 Para administrar un compuesto de la invención a través de ciertas rutas, puede que sea necesario recubrir el compuesto con, o administrarlo conjuntamente con, un material que evite su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede ser administrado a un sujeto mediante un vehiculante adecuado, como podrían ser los liposomas, o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen las soluciones tamponantes salinas y acuosas.

10 Los vehículos aceptables farmacéuticamente incluyen las soluciones acuosas estériles o dispersiones y los polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes con sustancias farmacéuticamente activas es conocido en el estado del arte.

15 Las expresiones "administración parenteral" y "administrado perenteralmente", tal y como se utilizan aquí hacen referencia a las formas de administración diferentes a la administración tópica o enteral, normalmente mediante inyección, e incluye, sin limitaciones, las vías intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intrarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal, epidural e intraesternal.

20 Estas composiciones pueden contener también adyuvantes tales como conservantes, humectantes, emulsificadores o dispersantes. Para evitar la presencia de microorganismos puede aplicarse algún proceso de esterilización, en la preparación e incluir agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo: el parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede resultar conveniente incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares, a los compuestos. Además, para garantizar la absorción prolongada de compuesto farmacéutico inyectable se pueden incluir agentes retardantes para la absorción tales como el monoestearato de aluminio y la gelatina.

30 Independientemente de la ruta de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que pueden emplearse en forma hidratada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan con una dosificación farmacológicamente aceptable mediante métodos convencionales conocidos para aquellos con conocimientos sobre la materia.

35 Los niveles de dosificación reales para los ingredientes activos dentro de las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser variados con el fin de tener una cantidad de ingrediente activo que sea suficiente para producir la respuesta terapéutica deseada en cada paciente particular, composición o modo de administración, sin que llegue a ser tóxico para el paciente. La dosis seleccionada dependerá de una serie de factores farmacocinéticos, incluyendo la actividad cada uno de los compuesto de la presente invención, del éster, sal o amida, de la ruta de administración en particular, del momento de la administración, de la tasa de excreción de uno de los compuestos concretos que se emplee, de la duración del tratamiento, de otras drogas, compuestos y/o materiales administrados en combinación con las composiciones concretas empleadas, de la edad, del sexo, condición, estado general de salud e historia médica previa del paciente en tratamiento, y factores del estilo, bien conocidos por los especialistas médicos.

45 El compuesto debe ser estéril y fluido, en la medida que permita su administración mediante una jeringa. Además del agua, el vehículo puede ser una solución salina tamponada e isotónica, etanol, polialcohol (por ejemplo el glicerol, propilen glicol, polietilen glicol líquido y similares), y sus mezclas apropiadas.

50 La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, gracias al uso de recubrimientos tipo lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula deseado en el caso de una dispersión y mediante el uso de surfactantes. En muchas ocasiones, es preferible incluir agentes isotónicos en la composición, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, como el manitol o el sorbitol, y cloruro sódico. La absorción a largo plazo de los compuestos inyectables puede conseguirse por la inclusión en la composición de un agente que retrase la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio o gelatina.

55 **Listado de Secuencias**
Descripción del Listado de Secuencias

60	Nº ID SEC: 1	dominio variable de la cadena pesada del HuMab LC5002-002
	Nº ID SEC: 2	dominio variable de la cadena ligera del HuMab LC5002-002
	Nº ID SEC: 3	dominio variable de la cadena pesada del HuMab LC5002-003
	Nº ID SEC: 4	dominio variable de la cadena ligera del HuMab LC5002-003
	Nº ID SEC: 5	dominio variable de la cadena pesada del HuMab LC5002-005
	Nº ID SEC: 6	dominio variable de la cadena ligera del HuMab LC5002-005
	Nº ID SEC: 7	dominio variable de la cadena pesada del HuMab LC5002-007
65	Nº ID SEC: 8	dominio variable de la cadena ligera del HuMab LC5002-007

Nº ID SEC: 9	dominio variable de la cadena pesada del HuMab LC5002-018
Nº ID SEC: 10	dominio variable de la cadena ligera del HuMab LC5002-018
Nº ID SEC: 11	región constante κ de la cadena ligera
Nº ID SEC: 12	región constante κ 1 de la cadena pesada

5

Descripción de las figuras

Figura 1 muestra la unión de anticuerpos anti-IL-13R α 1 al polipéptido IL-13R α 1 humano recombinante previamente inmovilizado. Se incluyen el anticuerpo policlonal de conejo anti-IL-13R α 1 humana AF152 (R&D systems) y un anti-KLH como Monoclonal humano para control negativo.

10

Figura 2 muestra la inhibición de la unión a IL-13 mediante anticuerpos anti-IL-13 α 1, utilizando un receptor IL-13R α 1/IL-4R α inmovilizado.

15

Figura 3 muestra el bloqueo de la unión de IL-13 a células CHO (que expresan IL-13R α 1 e IL-4R α 2) mediante anticuerpos anti-IL-13R α 1. Como control positivo se usa un anticuerpo anti-IL-13R α 1 comercial (AF152, R&D Systems, Minneapolis, MN).

20

Figura 4 muestra la unión de los anticuerpos anti-IL-13R α 1 a hIL-13R α 1 y las propiedades de unión a receptores relacionados funcionalmente como hIL-13R α 2 y hIL-4R α .

25

Figura 5 muestra la capacidad de los anticuerpos anti-IL-13R α 1 para unirse al polipéptido recombinante de IL-13R α 1 murino, previamente inmovilizado. Se incluyen el anticuerpo policlonal de cabra anti-IL-13R α 1 humana AF152 (R&D systems) y un anti-KLH como Monoclonal humano para control negativo.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Generación de hibridomas

30

Los anticuerpos monoclonales humanos de acuerdo con la invención pueden ser producidos mediante la inmunización de animales transgénicos, como puede ser un ratón transgénico que tenga un genoma que incluya transgenes para las cadenas pesada y ligera codificantes para todo o una parte de un anticuerpo de la presente invención, con células que expresen el IL-13R α humano. Tras ello se obtienen células B del bazo del animal y se fusionan con células de mieloma para conseguir líneas de hibridoma inmortales que puedan secretar anticuerpos monoclonales humanos frente a IL-13R α 1. Se pueden generar anticuerpos monoclonales humanos frente a IL-13R α 1 utilizando ratones humanos portadores de partes del sistema inmunitario humano en lugar del propio. Estos ratones transgénicos se denominarán, de aquí en adelante, como ratones "HuMab", estos contienen un minilocus para la inmunoglobulina humana que incluye genes no reorganizados de las regiones constantes de las inmunoglobulinas humanas, tanto para la cadena pesada (μ e γ) como ligera κ (kappa), junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci endógenos para las cadenas μ y kappa (Lonberg N., et al., Nature 368 (1994) 856-859). Gracias a esto, los ratones muestran una expresión reducida de las IgM o κ de ratón, y, como respuesta a la inmunización, los transgenes introducidos para las cadenas ligera y pesada humanas sufren switching de clase y mutaciones somáticas para generar anticuerpos monoclonales IgG humanos de alta afinidad para producir anticuerpos monoclonales completamente humanos frente a IL-13R α 1, los ratones HuMab pueden inmunizarse con células que expresen IL-13R α 1 humano de acuerdo con el método general, tal y como está descrito por Lonberg, N., et al., Nature 368 (1994) 856-859; Fishwild, D.M., et al., Nat. Biotechnol. 14 (1996) 845-851 y WO 98/24884. Preferiblemente, los ratones deben tener de 6 a 16 semanas de edad al recibir la primera inmunización. Por ejemplo, las células transfectadas con IL-13R α 1 pueden emplearse para inmunizar los ratones HuMab vía intraperitoneal. La respuesta inmunitaria puede monitorizarse a lo largo del protocolo de inmunización mediante la extracción de muestras de plasma obtenidas por sangrados periorbitales. El plasma puede ser rastreado por ELISA y/o FACS. Los ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana anti-IL-13R α 1 humana, pueden ser utilizados para inmortalización de las células B correspondientes. Los ratones pueden ser reinmunizados por vía intravenosa con el antígeno unos 3 o 4 días antes del sacrificio y extracción del bazo y nódulos linfáticos. Por ejemplo, pueden inmunizarse ratones HuMab de las cepas HCo7 o HCo12. Los ratones HCo7 tienen una disrupción JKD en sus genes endógenos para la cadena ligera (kappa) (descrito en Chen et al. (1993) EMBO J. 12: 821-830), una disrupción CMD en sus genes endógenos para la cadena pesada (descrito en WO 01/14424), un transgen para la cadena ligera kappa humana KCo5 (descrito en Fishwild, D.M., et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851), y un transgen para la cadena pesada humana HCo7 (descrito en Estadounidense 5.770.429). Los ratones HCo12 tienen una disrupción JKD en sus genes endógenos para la cadena ligera (kappa) (descrito en Chen, J., et al., EMBO J. 12 (1993) 821-830), una disrupción CMD en sus genes endógenos para la cadena pesada (como se describe en el ejemplo 1 de WO 01/14424)) un transgen KCo5 para la cadena ligera humana kappa (descrito en Fishwild, D.M., et al., Nat. Biotechnol. 14 (1996) 845-851, y un transgen HCo12 para la cadena pesada humana (descrito en el ejemplo 2 de WO 01/14424). Los linfocitos de ratón pueden ser aislados y fusionados con una línea de mieloma de ratón utilizando PEG según los protocolos estándar para generar hibridomas. A continuación, los hibridomas resultantes

60

son rastreados para determinar la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, suspensiones celulares de linfocitos derivados del bazo y de los nódulos obtenidas a partir de ratones inmunizados se fusionan con células de mieloma SP/2 no secretoras de ratón (ATCC, CRL 1581) con PEG al 50%. Las células se ponen en cultivo a una densidad de $0,75 \times 10^7$ en microplacas de fondo plano, seguido de unas dos semanas de incubación en medio selectivo. Los pocillos individuales son rastreados por ELISA y/o FACS para la presencia de anticuerpos monoclonales humanos IgM e IgG anti-IL-13R α 1. Una vez se ha obtenido un crecimiento suficiente de los hibridomas, los que secretan anticuerpos son plaqueados de nuevo, y si se mantienen positivos para anticuerpos monoclonales IgG humanos anti-IL-13R α 1, pueden ser subclonados como mínimo dos veces por dilución limitante. Los subclones estables son cultivados in vitro para producir anticuerpos en medio de cultivo para su caracterización.

Procedimiento de inmunización de los ratones transgénicos

Tres ratones HCo7 (3 machos), cepa GG2201 (Medarex, San Jose, CA, USA) y 2 ratones HCo12 (1 macho y una hembra), cepa GG2198 (Medarex, San Jose, CA, USA) fueron inmunizados con 1×10^6 células HEK293, previamente transfectadas con un vector de expresión para IL-13R α 1. En total se procedió a ocho inmunizaciones, alternando la vía intraperitoneal (i.p.) con la subcutánea (s.c.) en la base de la cola. Para la primera inmunización se mezclaron 100 μ l de células HEK293: IL-13R α 1 a 1×10^6 con 100 μ l de adyuvante completo de Freund (CFA; Difco Laboratories, Detroit, USA). Para todas las demás inmunizaciones se mezclaron 100 μ l de células en PBS con 100 μ l de adyuvante incompleto de Freund (ICFA; Difco).

Reinoculación de los ratones

Cuando los títulos de suero de anti-IL-13R α 1 se demostraban suficientes, los ratones eran reinoculados de nuevo dos veces con células HEK293: IL-13R α 1 a 1×10^6 , en 200 μ l de PBS (i.v.) 4 y 3 días antes de la fusión.

Ejemplo 2

Comprobación por ELISA de la unión de los HuMab al IL-13R α 1 inmovilizado

Para determinar la capacidad de los anticuerpos de la invención para unirse a IL-13R α 1 recombinante, el dominio extracelular de IL-13R α 1 (R&D Systems, UK) fue disuelto en PBS (1 μ g/ml) y se adsorbió a microplacas (NUNC Maxisorb) mediante una incubación a 4°C durante toda la noche. Tras un lavado de las placas con tampón de lavado (TL = 0,9 % NaCl; 0,1% Tween® 20) los lugares de unión no específica fueron bloqueados mediante la adición de 100 μ l tampón de incubación (TI = PBS con 1% de proteína C y 0,1% de Tween® 20) e incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA). Tras esto se hicieron diluciones seriadas de los HuMab y de los anticuerpos control (100 μ l/pocillo; diluciones en TI), estas se añadieron e incubaron durante 1h a TA. Las placas fueron lavadas de nuevo y los anticuerpos humanos unidos se detectaron mediante una incubación con anti kappa humano de conejo conjugado a peroxidasa (DAKO, Dinamarca) a una dilución final de 1:500 en TI. Los anticuerpos policlonales de cabra anti-hIL-13R α 1 se detectaron con un policlonal anti IgG de cabra producido en burro y conjugado con peroxidasa (Santa Cruz; dilución 1:1000 en TI). Tras incubarse durante 1h a TA y tras un nuevo paso de lavado, las placas se revelaron con solución ABTS® lista para su uso (Roche Diagnostics GmbH) a TA en la oscuridad. La absorbancia a 405nm se midió en el momento en que la absorbancia de la concentración más alta alcanzaba un valor suficiente.

Todos los anticuerpos frente a IL-13R α 1 que se probaron fueron capaces de unirse al dominio extracelular inmovilizado del IL-13R α 1 humano. Los valores de EC₅₀ que se determinaron estaban en el rango de 0,5 - 2nM para los diversos anticuerpos LC testados. El anticuerpo HuMab anti-KLH que se utilizó como control negativo no se unió al dominio extracelular inmovilizado de IL-13R α 1. El control positivo, anticuerpo de cabra anti-IL-13R α 1 humano, se unió también de forma eficiente al dominio extracelular inmovilizado de IL-13R α 1 (Fig.1).

Ejemplo 3

Inhibición de la unión de IL-13 al heterodímero IL-13R α 1/IL-4R α (ELISA)

Se tapizaron microplacas con 100 μ l de la proteína quimérica hIL-13R α 1: hFc (R&D Systems, UK) disuelta en PBS a 3 μ g/ml durante toda la noche a 4°C, en agitación. Tras lavar las placas con TL se añadieron diluciones seriadas de anticuerpos HuMab y controles (100 μ l/pocillo; diluciones en TI) y se incubaron durante 30 minutos a TA. Las placas fueron lavadas de nuevo y tras ello se añadió una mezcla de IL-13 (R&D Systems, UK; a 0,5 μ g/ml; diluido con TI) con IL-4R α (R&D Systems, UK; 0,75 μ g/ml; diluido con TI), incubándose durante 1h a TA. Tras el lavado de las placas, se añadieron 100 μ l de anticuerpo biotinilado anti IL-13 (BAF213; R&D Systems, UK) a una concentración de 0,4 μ g/ml y se incubó durante 1h a TA. Tras lavar las placas, se detectó la IL-13 unida mediante estreptavidina unida a peroxidasa (Roche Diagnostics GmbH, DE) a una dilución de 1:5000 en TI (1h a TA). Finalmente, las placas fueron lavadas y reveladas con solución de ABTS® lista para su uso (Roche Diagnostics GmbH, DE) a TA en la oscuridad. La absorbancia a 405 de midió tras 45 - 60 minutos.

Los anticuerpos LC5002-002, LC5002-003, LC5002-005, LC5002-007 y LC5002-018 fueron capaces de inhibir la unión de la IL-13 al receptor heterodimérico con unos valores máximos de inhibición de un 50 a un 80-85%. El control positivo era AF152 (anticuerpo policlonal de conejo). Tal y como se esperaba, el control negativo, anti-KLH, no inhibió la unión de IL-13 al receptor heterodimérico. Los valores de CI₅₀ obtenidos estaban entre 1,5nM y 10,1nM para LC5002-002, LC5002-003, LC5002-005, LC5002-007 y LC5002-018 (Fig.2).

Ejemplo 4**Ensayo de unión con radioligando**

El ensayo de unión de ^{125}I -IL-13 se llevó a cabo sobre células CHO que expresan los IL-13R α 1 y IL-4R α humanos, disueltas en tampón de unión (HEPES 25mM, NaCl 150mM, CaCl $_2$ 1mM, MgCl $_2$ 5mM, y albúmina sérica bovina al 0,5%, ajustado a pH 7,2). Se mezclaron 1×10^5 células por pocillo con los anticuerpos y se preincubó de 15 minutos a 1 hora. Tras esto se añadió ^{125}I -IL-13 0,1nM y la mezcla se incubó a 4°C durante 4 horas. La concentración de ^{125}I -IL-13 utilizada en el ensayo se determinó a partir de análisis de saturación de unión, de competición y por la determinación de la cantidad de ^{125}I -IL-13 necesaria para alcanzar el equilibrio de unión con la línea celular. Las muestras se recogieron en una placa con filtro GF/C pretratada con PEI 1% / BSA 0.5% y medidas en un contador de centelleo Packard TopCount. El análisis de los datos se llevó a cabo con el software PRISM utilizando el ajuste no lineal a una curva de regresión (GraphPad Software, San Diego, CA).

Todos los anticuerpos frente al IL-13R α 1 probados bloqueaban la unión de la IL-13 marcada al complejo IL-13R α 1/IL-4R α . Los valores de CI_{50} calculados para los anticuerpos LC5002-002, LC5002-003, LC5002-005, LC5002-007 y LC5002-018 se encontraban entre 0,09nM y 0,32nM, con 84,8nM para el AF152 (Fig.3).

Ejemplo 5**Inhibición por parte de los anticuerpos HuMab de la regulación positiva de CD23 inducida por IL-13 en células B humanas y monocitos.**

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron mediante gradiente de densidad de Ficoll Hypaque. Tras un lavado de las células con RPMI, estas fueron resuspendidas en RPMI/10% FCS y distribuidas a una densidad de 3×10^5 PBMC/pocillo (50 μl de volumen) en microplacas de fondo plano (Corning Incorporated Costar). Tras esto, se añadían 25 μl de anticuerpo anti CD40 humano (Immunotech) a una concentración final de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ en RPMI/10% FCS y 25 μl de anticuerpo anti IgA+IgG+IgM humanas (Immunoresearch) a una concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$ en RPMI/10%FCS. Tras esto se añadieron diluciones seriadas de los anticuerpos HuMab y control (50 μl /pocillo; diluciones en RPMI/10% FCS) y se incubaron durante 30 min en la estufa (37°C; 5% CO $_2$). A continuación se añadió IL-13 humana recombinante (R&D Systems) a una concentración final de 0,67 ng/ml (50 μl /pocillo), incubándose las células durante 72h a 37°C/5% CO $_2$. Tras esta incubación las placas fueron centrifugadas y el medio aspirado. Para desenganchar las células se añadieron 200 μl de Accutase (PAA) y se incubaron las células durante aproximadamente 5 minutos a 37°C; 5% CO $_2$. Las células se desprenden por aclarado repetido y se transfieren a una placa de fondo redondo. Tras centrifugar y aspirar los sobrenadantes las células fueron incubadas con 200 μl de una mezcla de anti-CD23-PE, anti-CD20-FITC y anti-CD14-APC (todos ellos de BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). Las células fueron incubadas durante 30 minutos a 4°C, centrifugadas y los sobrenadantes aspirados. Este paso de lavado fue repetido nuevamente y se resuspendió las células en 200 μl de PBS/0,1% albúmina de suero humano y analizadas por FACS mediante un citómetro de flujo Calibur (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) empleando el software CellQuest. En la mayor parte de los casos se adquirieron 10000 eventos, siendo seleccionados y agrupados según la dispersión de la luz, incluyendo sólo los monocitos y linfocitos viables. Las células fueron preagrupadas en linfocitos B, positivos para CD19, o en monocitos, positivos para CD14, y fueron analizados para la expresión de CD23.

Los valores observados de CI_{50} para la inhibición de la regulación positiva del CD 23 en linfocitos B estaban entre 0,5nM y >70nM para los anticuerpos LC5002-002, LC5002-003, LC5002-005, LC5002-007 y LC5002-018 y 13,6nM para AF152. Para la inhibición de la regulación positiva de CD23 inducida por IL-13 se observó un patrón similar en los monocitos humanos. En el caso de los monocitos los valores de CI_{50} estaban entre 0,1nM y 62,8nM para los anticuerpos LC5002-002, LC5002-003, LC5002-005, LC5002-007 y LC5002-018 y 62,9nM para AF152.

Ejemplo 6**Ensayo de proliferación de TF-1 en respuesta a estímulo por IL-13 o IL-4**

Se cultivaron células TF-1 (ATCC # CRL 2003) en medio de cultivo conteniendo RPMI modificado por la ATCC, FBS al 10%, 1X Pencilina/Estreptomina, GM-CST a 2ng/ml. Un día antes del ensayo las células se traspararon a un medio sin GM-CSF. Se incubaron 5×10^3 células por pocillo frente a las concentraciones adecuadas de anticuerpos anti-IL-13R α 1 a 37°C durante 1 hora. A continuación las células fueron estimuladas con IL-13 humana a 2ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN) o IL-4 humana a 0,1ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN) e incubadas a 37°C durante 48 horas. Las células fueron expuestas a Timidina- Ci ^3H a 0,5 μM e incubadas a 37°C de 16 a 18 horas. Las muestras se recogieron en placas GFC que habían sido tratadas con PEI al 1%+BSA al 0,25%, utilizando el recogedor para 96 pocillos "Perkin Elmer Filtermate 96 harvester". Las placas GFC fueron recontadas utilizando un contador de centelleo "Perkin Elmer Top count Scintillation counter". El análisis de los datos se llevó a cabo con el software PRISM utilizando el ajuste no lineal a una curva de regresión (GraphPad Software, San Diego, CA).

Los anticuerpos anti-KLH no produjeron ningún tipo de inhibición en este ensayo. La misma afirmación resulta válida para LC5002-007. Todos los demás anticuerpos inhibieron la respuesta, incluso LC5002-007 inhibió la respuesta con valores de CI más altos que otros anticuerpo. Los valores de CI_{50} observados para los diferentes anticuerpos fueron de: 13,50nM para AF152, 9,21nM para LC5002-002, 3,07nM para LC5002-003 y de 0,39nM para LC5002-005. Para la proliferación de TF-1 inducida por IL-4 se obtuvo un perfil similar, sin embargo la potencia de los

anticuerpos era inferior en comparación con las respuestas inducidas por IL-13. Los valores de CI_{50} para la proliferación inducida por IL-4 fueron de 0,02nM para el anticuerpo anti-IL4R, de 74,37nM para AF152 y para los anticuerpos LC5002-002, LC5002-003, LC5002-005, LC5002-007 y LC5002-018 de entre 4,68nM y 60nM.

5 Ejemplo 7

Inhibición de la producción de eotaxina como respuesta a la IL-13 en fibroblastos humanos de pulmón.

El ensayo se llevó a cabo utilizando células HFL-1 (Human Lung Fibroblast, ATCC # CCL-153). Las células fueron sembradas a una densidad de unas 100.000 células por pocillo en una placa de 12 pocillos y se incubaron a 37°C durante 72 horas hasta alcanzar confluencia. Las células fueron posteriormente mantenidas en medio libre de suero durante 24 horas y tratadas con anticuerpos anti-IL-13R α 1 a 37°C durante 1 hora. A continuación de este tratamiento las células fueron estimuladas con IL-13 a 10ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN) a 37°C durante 48 horas. Se recogieron los sobrenadantes y se determinó el contenido de eotaxina utilizando el kit comercial de R&D Systems (Cat. No. DTX00). La lectura de absorbancia se hizo con un lector de placas Spectromax y los datos se analizaron con el programa PRISM (GraphPad Software, San Diego, CA).

Los anticuerpos analizados mostraron diferentes capacidades para inhibir la secreción de eotaxina. Con la excepción de LC5002-007 todos los demás anticuerpos analizados mostraron cierta inhibición. El cálculo de la CI_{50} promedio a partir de 3 a 4 experimentos fue de 11,5nM para AF152 y de entre 2,45nM y 19,8nM para los anticuerpos LC5002-002, LC5002-003, LC5002-005, LC5002-007 y LC5002-018.

20 Ejemplo 8

Inhibición de la fosforilación de Stat-6 inducida por IL-13 en células de músculo liso de bronquio humano

Se cultivaron células de músculo liso de bronquio humano (BSMC; Clonetics, Cat. No CC-2576) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Las células se cultivaron en placas de 12 pocillos hasta que alcanzaron confluencia. En ese momento de dejaron 24 horas en medio sin suero y se añadieron cantidades diversas de anticuerpo. Las placas se incubaron durante 1 hora y a continuación fueron estimuladas con IL-13 a 2,5ng/ml (R&D System). Los sobrenadantes se recuperaron tras una incubación de 15 minutos, las células fueron lavadas con tampón fosfato, añadiéndose finalmente 100 μ l de tampón de lisis. La mezcla se sonicó brevemente en hielo y se centrifugó. El lisado se empleó para detección por Western Blot de Stat-6 fosforilada. Se cargó un gel de SDS con cantidades equivalentes de proteína y se transfirió a una membrana. El anticuerpo anti-Stat-6 se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology (Cat. No. SC-11762R) y se utilizó un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa. La detección se llevó a cabo utilizando el sistema ECL Plus System de Amersham (Cat No RPN 2132). La cuantificación se hizo con el sistema Typhoon 9400 Imager.

Los dos HuMabs analizados en este ensayo (LC50002-003 y LC5002-005) inhibían la fosforilación de Stat-6 inducida por la IL-13. La potencia observada en este ensayo fue similar a la de otros ensayos funcionales. Los valores de CI_{50} obtenidos fueron de 18,64nM para AF152, de 5,98nM para LC5002-003 y de 1,18nM para LC5002-005.

Ejemplo 9

Clonación y análisis de la secuencia codificante para los dominios variables (cadenas ligera- κ y pesada- γ 1) del HuMab anti-hIL-13R α 1.

Las secuencias de nucleótidos codificantes para la región variable de la cadena ligera V_L y la cadena pesada V_H de los anticuerpos HuMabs anti hIL-13R α 1 fueron aisladas por síntesis de cDNA estándar, seguida por PCR. El RNA total fue obtenido a partir de células de hibridoma a 1×10^6 – 1×10^7 empleando para ello el kit GeneRacer™ (Invitrogen). El RNA así obtenido se utilizó como molde para la síntesis de la primera cadena del cDNA y ligación del cebador oligo dT GeneRacer™. La síntesis de la segunda cadena del cDNA y la amplificación subsecuente por PCR de los fragmentos codificantes para la V_L y la V_H se llevó a término con cebadores antisentido para la cadena ligera y pesada, complementarios a las secuencias de nucleótidos codificantes para la secuencia constante de la cadena ligera- κ y pesada- γ 1 y con cebadores específicos 5' GeneRacer™, respectivamente. Los productos de PCR se clonaron utilizando el kit de clonación TOPO™ TA de Invitrogen™ Life Technologies y el vector de clonación pCR4-TOPO™. Los productos de PCR clonados fueron identificados por restricción de los plásmidos apropiados utilizando EcoRI para la digestión, con unos fragmentos esperados con tamaños de unos 740 y 790 pares de bases para la V_L y la V_H , respectivamente. La secuencia de DNA de los fragmentos de PCR clonados se determinó por secuenciación de doble cadena. Para el procesado de las secuencias de DNA se utilizó el paquete de software del GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) en su versión 10.2 y el Vector-NTI 8 (InforMax, Inc). Las secuencias de DNA y proteína fueron alineadas utilizando el módulo CLUSTALW del GCG. Los alineamientos de secuencia se llevaron a cabo utilizando el programa GENEDOC (version 2.1).

Ejemplo 10

Construcción de los plásmidos de expresión para un anticuerpo IgG1 HuMab anti-hIL-13R α 1

Los genes codificantes para las cadenas ligera y pesada del HuMab anti-hIL-13R α 1 fueron ensamblados de forma separada en vectores de expresión para células de mamífero. A continuación los segmentos codificantes para la región variable de la cadena ligera (V_L) del HuMab anti-hIL-13R α 1 y para la región constante κ de la cadena (C_L , SEC N $^\circ$ ID: 11) fueron unidas del mismo modo que se hizo para los segmentos para la región variable de la cadena pesada humana (V_H) y para la región constante γ 1 de la cadena pesada humana del HuMab anti-hIL-13R α 1 (C_{H1} -

bisagra-C_{H2}-C_{H3}, SEC N° ID: 12). La información general referente a las secuencias de nucleótidos de las cadenas humanas pesada y ligera, y de su uso de codón está publicado por: Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S., y Foeller, C., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Ed., NIH Publication No. 91-3242. La unidad de transcripción de la cadena ligera κ del HuMab anti-hIL-13Rα1 está compuesta por los siguientes elementos:

- El potenciador inmediato y temprano y el promotor del citomegalovirus humano (HCMV),
- Un 5'-UT sintético incluyendo una secuencia Kozak,
- Una secuencia señal para la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón incluyendo el intrón de la secuencia señal,

El cDNA clonado para la parte variable de la cadena ligera del HuMab anti-hIL-13Rα1, dispuesta con una única diana de restricción para BsmI en su extremo 5', un lugar donante para el corte y empalme "splicing" y una única diana de restricción para NotI en el extremo 3',

- El gen para la región constante κ humana, incluyendo el potenciador intrónico 2 de ratón para su Ig-κ (Picard, D., y Schaffner, W., Nature 307 (1984) 80-82) y

La secuencia señal para poliadenilación ("poli-A") de la región κ de la inmunoglobulina humana.

La unidad de transcripción de la cadena pesada γ1 del HuMab anti-hIL-13Rα1 está compuesta por los siguientes elementos:

- El potenciador inmediato y temprano y el promotor del citomegalovirus humano (HCMV),
- Un 5'-UT sintético incluyendo una secuencia Kozak,
- Una secuencia señal para la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón incluyendo el intrón de la secuencia señal,

El cDNA clonado para la parte variable de la cadena pesada del HuMab anti-hIL-13Rα1, dispuesta con una única diana de restricción para BsmI en su extremo 5', un lugar donante para splicing y una única diana de restricción para NotI en el extremo 3',

- El gen para la región constante γ1 humana, incluyendo el potenciador de ratón para su Ig-μ (Neuberger, M.S., EMBO J. 2 (1983) 1373-1378)
- La secuencia señal para poliadenilación ("poli-A") de la región γ1 de la inmunoglobulina humana.

Los elementos funcionales para los plásmidos de expresión de la cadena ligera κ y la cadena pesada γ1 de los HuMab anti-hIL-13Rα1:

Además del casete de expresión antes descrito para la cadena ligera κ y la cadena pesada γ1 de los HuMab anti-hIL-13Rα1, estos plásmidos contienen:

- Un gen de resistencia a la higromicina
- Un origen de replicación, oriP, del virus Epstein-Barr (EBV)
- Un origen de replicación procedente del vector pUC18 que permite la replicación del plásmido en E.coli, y

- Un gen de la β-lactamasa que le aporta resistencia a la ampicilina en E.coli.

Ejemplo 11

Construcción y expresión de plásmidos para el anticuerpo mutante (variante) anti-hIL-13Rα1 IgG1

Los plásmidos de expresión codificantes para cadenas pesadas γ1 mutantes de los anticuerpos anti-hIL-13Rα1, pueden generarse por mutagénesis dirigida sobre los plásmidos de expresión silvestres utilizando el kit de mutagénesis QuickChange™ Site-Directed (Stratagene) y están descritos en la tabla 1. Los aminoácidos están numerados de acuerdo con la numeración EU (Edelman, G.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969) 78-85; Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S., and Foeller, C., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Ed., NIH Publication No. 91-3242).

Tabla 1

Mutación	Descripción
PVA-236; GLPSS331 como se especifica por E233P; L234V; L235A; delta G236;	La secuencia de aminoácidos Glu ₂₃₃ Leu ₂₃₄ Leu ₂₃₅ Gly ₂₃₆ de la cadena pesada humana γ1 se sustituye por la secuencia de aminoácidos Pro ₂₃₃ Val ₂₃₄ Ala ₂₃₅ de la cadena pesada humana γ2.
A327G; A330S; P331S	La secuencia de aminoácidos Ala ₃₂₇ Leu ₃₂₈ Pro ₃₂₉ Ala ₃₃₀ Pro ₃₃₁ de la cadena pesada

	humana $\gamma 1$ se sustituye por la secuencia de aminoácidos Gly ₃₂₇ Leu ₃₂₈ Pro ₃₂₉ Ser ₃₃₀ Ser ₃₃₁ de la cadena pesada humana $\gamma 4$.
L234A; L235A	La secuencia de aminoácidos Leu ₂₃₄ Leu ₂₃₅ de la cadena pesada humana $\gamma 1$ se sustituye por la secuencia de aminoácidos Ala ₂₃₄ Ala ₂₃₅

Ejemplo 12

Producción de HuMabs recombinantes anti-hIL-13R α 1

5 Los anticuerpos HuMabs recombinantes fueron generados mediante transfección transitoria de células adherentes HEK293-EBNA (ATTC CRL-10852) cultivadas en medio DMEM (Gibco) complementado con un 10 % de FCS con un contenido muy bajo en IgG (Gibco), Glutamina 2 mM (Gibco), un 1% v/v de aminoácidos no esenciales (Gibco) y 250 μ g/ml de G418 (Roche Diagnostics GmbH, DE). Para la transfección se utilizó el reactivo de transfección Fugene™ 6 (Roche Diagnostics GmbH, DE) en una proporción de reactivo (μ l) respecto a DNA (μ g) entre 3:1 y 6:1. Las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina fueron expresadas a partir de dos plásmidos diferentes, utilizando una proporción molar de plásmidos codificantes para cadenas pesadas y ligeras de 1:2 a 2:1. Los sobrenadantes de cultivo que contenían anticuerpos monoclonales humanos (HuMab) fueron recuperados entre los días 4 y 11 tras la transfección.

15 Se puede encontrar información general referente a la expresión recombinante de anticuerpos humanos en líneas como las HEK293 en: Meissner, P., et al., Biotechnol Bioeng 75 (2001) 197-203.

Ejemplo 13

a) Análisis de afinidad de los HuMabs LC5002-003, -005, and -007 frente a hIL-13R α 1: hFc quimérico

20 Para los análisis de interacción se empleo como instrumento el Biacore 3000. Como tampón de carrera y de reacción se utilizó HBS-P (HEPES 10mM, NaCl 150mM, polisurfactante P al 0,005%, pH 7,4) a 25°C. Las moléculas captadoras (anticuerpos de cabra anti IgG humano, específicos para Fc γ) se enlazaron por su amina a una concentración de 20 μ g/ml con un flujo de 5 μ l/min durante 20 minutos. Los HuMabs se inyectaron a una concentración de 1 μ g/ml con un flujo de 10 μ l/min durante 1 minuto. El bloqueo de los anticuerpos de cabra anti IgG-Fc γ humano que quedasen libres se hizo mediante la inyección de gammaglobulina humana 500nM a un flujo de 30 μ l/min durante 3 minutos. El analito (la proteína quimérica hIL-13R α 1: hFc) se inyectó durante dos minutos a cinco concentraciones diferentes, entre 5,63nM y 90nM, haciéndose un lavado con el tampón HBS-P durante cinco minutos. La regeneración de la superficie se obtuvo mediante dos inyecciones de HCl 100mM HCl durante 1 minuto. El chip, formato del ensayo y la secuencia de inyecciones, así como los datos cinéticos son los descritos en la tabla 2. Para la corrección de la deriva intrínseca de la línea base del sistema los datos del control negativo (curvas con el tampón) se restaron de las curvas generadas por las muestras. Para el análisis de los sensogramas y el cálculo de los datos de afinidad se utilizó el software BiaEvaluation versión 4.01. Los datos de las cinéticas se obtuvieron por ajuste de los datos a un modelo de unión 1:1 de Langmuir (Tabla 2).

Tabla 2:

35 **Análisis de afinidades de HuMab sobre hIL-13R α 1: hFc. Análisis de datos basado en un modelo de unión 1:1 de Langmuir**

Chip	Captador	Ligando	Analito	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
CM5	Anti-hFc γ	LC5002-003	hIL-13 R α 1:hFc	2,1x10 ⁵	1,4x10 ⁻⁶	<6,5x10 ⁻¹²
CM5	Anti-hFc γ	LC5002-005	hIL-13 R α 1:hFc	1,73x10 ⁵	3,12x10 ⁻⁶	1,8x10 ⁻¹¹
CM5	Anti-hFc γ	LC5002-007	hIL-13 R α 1:hFc	1,19x10 ⁵	1x10 ⁻⁶	<8,4x10 ⁻¹²

40 **b) Análisis de afinidad de los HuMabs LC5002-003, -005 and -007 sobre el dominio extracelular del hIL-13R α 1 obtenido a partir de la proteína quimérica hIL-13R α 1: hFc**

45 Para los análisis de interacción se empleo como instrumento el Biacore 3000. Como tampón de carrera y de reacción se utilizó HBS-P (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, polisurfactante P al 0,005 %, pH 7,4) a 25°C. Las moléculas captadoras (anti-hFc γ) se enlazaron por su amina a una concentración de 100 μ g/ml con un flujo de 5 μ l/min durante 20 minutos. Los HuMabs se inyectaron a una concentración de 10 μ g/ml con un flujo de 10 μ l/min durante 30 segundos. Las moléculas hIL-13R α 1 procesadas (M_w40kDa) se inyectaron durante 200 segundos a siete concentraciones diferentes, entre 1,56nM y 100nM, haciéndose un lavado con el tampón HBS-P durante cinco minutos. La regeneración de la superficie se obtuvo mediante dos inyecciones de HCl 100 mM HCl durante 1 minuto cada una con un flujo de 10 μ l/min. El chip, formato del ensayo y la secuencia de inyecciones, así como los datos cinéticos son los descritos en la tabla 3. Los datos de las cinéticas se obtuvieron por ajuste de los datos a un modelo de unión 1:1 de Langmuir.

Tabla 3:

Chip	Capturador	Ligando	Analito	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
C1	Anti-hFcy	LC5002-002	hIL-13R α 1	$1,1 \times 10^6$	$6,5 \times 10^{-4}$	$6,2 \times 10^{-10}$
C1	Anti-hFcy	LC5002-003	hIL-13R α 1	$1,3 \times 10^6$	$5,1 \times 10^{-4}$	$3,9 \times 10^{-10}$
C1	Anti-hFcy	LC5002-005	hIL-13R α 1	$1,4 \times 10^6$	$3,0 \times 10^{-4}$	$2,2 \times 10^{-10}$
C1	Anti-hFcy	LC5002-007	hIL-13R α 1	$1,9 \times 10^5$	$8,3 \times 10^{-4}$	$4,4 \times 10^{-9}$
C1	Anti-hFcy	LC5002-005, Mutante L234A; L235A	hIL-13R α 1	$1,4 \times 10^6$	$2,9 \times 10^{-4}$	$2,1 \times 10^{-10}$

c) **Análisis comparativo de la afinidad de las variantes recombinantes de LC5002-005, empleando el dominio extracelular del hIL-13R α 1 procesado a partir de la proteína quimérica hIL-13R α 1: hFc.**

- 5 En estos experimentos se comparó la afinidad de la IgG1 original, derivada del hibridoma con las afinidades de las variante recombinante IgG1-Ala-Ala. Para los análisis de interacción se utilizó el Biacore 3000. Como tampón de carrera y de reacción se utilizó HBS-P (HEPES 10mM, NaCl 150mM, polisurfactante P al 0,005%, pH 7,4) a 25°C. Las moléculas de anticuerpo capturadoras (anti-hFcy) se enlazaron por su amina a una concentración de 20µg/ml con un flujo de 5µl/min durante 20 minutos. Los HuMabs se inyectaron a una concentración de 10µg/ml con un flujo de 10µl/min durante 1 minuto. Las moléculas hIL-13R α 1 procesadas (analito) se inyectaron durante 5 minutos a ocho concentraciones diferentes, entre 1,56nM y 200nM, haciéndose un lavado con el tampón HBS-P durante cinco minutos. La regeneración de la superficie se obtuvo mediante dos inyecciones de HCl 100mM HCl durante 1 minuto cada una. El chip, formato del ensayo y la secuencia de inyecciones, así como los datos cinéticos son los descritos en la tabla 4. Los datos de las cinéticas se obtuvieron por ajuste de los datos a un modelo de unión de analito bivalente.

Tabla 4:
Ejemplo 14

Chip	Capturador	Ligando	Analito	k_{a1} (1/Ms)	k_{d1} (1/s)	k_{a2} (1/RUs)	k_{d2} (1/s)	K_D (M)
CM5	Anti-hFcy	LC5002-005	hIL-13R α 1	$1,33 \times 10^5$	$3,6 \times 10^{-4}$	$5,8 \times 10^{-3}$	0,06	$2,7 \times 10^{-9}$
CM5	Anti-hFcy	IgG1 ala-ala LC5002-005	hIL-13R α 1	$1,53 \times 10^5$	$4,2 \times 10^{-4}$	$4,1 \times 10^{-3}$	0,04	$2,8 \times 10^{-9}$

Comprobación por ELISA de la reacción cruzada de los HuMab frente a hIL-13R α 2 y a hIL-4R α

- 20 Las proteínas quiméricas hIL-13R α 2: hFc y hIL-4R α : hFc (R&D Systems, UK) fueron disueltas en PBS (1µg/ml) y adsorbidas a microplacas (NUNC Maxisorb) mediante una incubación durante toda una noche a 4°C. Tras un lavado de las placas con tampón de lavado (TL = 0,9 % NaCl; 0,1% Tween® 20) los lugares de unión no específica fueron bloqueados mediante la adición de 100 µl tampón de incubación (TI = PBS con 1% de proteína C y 0,1% de Tween® 20) incubándose durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA). Tras esto se hicieron diluciones seriadas de los HuMab y de los anticuerpos control (100µl / pocillo; diluciones en TI), estas se añadieron e incubaron durante 1h a TA. Las placas fueron lavadas de nuevo y los anticuerpos humanos unidos se detectaron mediante una incubación con anti kappa humano de conejo conjugado a peroxidasa (DAKO, Dinamarca) a una dilución final de 1:500 en TI. Tras incubarse durante 1h a TA y tras un nuevo paso de lavado, las placas se revelaron con solución ABTS® lista para su uso (Roche Diagnostics GmbH) a TA en la oscuridad. La absorbancia a 405nm se midió en el momento en que la absorbancia de la concentración más alta alcanzaba un valor suficiente.

Todos los anticuerpos frente al IL-13R α 1 analizados demostraron unión al dominio extracelular inmovilizado del IL-13R α 1 humano, pero no a hIL-13R α 2 ni a hIL-4R α (Fig. 4).

35 **Ejemplo 15**
Reacción cruzada de los con el IL-13R α 1 murino

La proteína quimérica murina IL-13R α 1: hFc (R&D Systems, UK) se disolvió en PBS (1µg/ml) incubándose en

microplacas para su adsorción (NUNC Maxisorb) mediante incubación a 4°C toda la noche. Tras un lavado de las placas con tampón de lavado (TL = 0,9% NaCl; 0,1% Tween® 20) los lugares de unión no específica fueron bloqueados mediante la adición de 100 µl tampón de incubación (TI = PBS con 1% de proteína C y 0,1% de Tween® 20) e incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA). Tras esto se hicieron diluciones seriadas de los HuMab y de los anticuerpos control (HuMab anti-KLH y policlonal de cabra anti-hIL-13Rα1 (R&D Systems)), se añadieron a los pocillos (100µl /pocillo; diluciones en TI), estas se añadieron e incubaron durante 1h a TA. Las placas fueron lavadas de nuevo y los anticuerpos humanos unidos se detectaron mediante una incubación con anti kappa humano de conejo conjugado a peroxidasa (DAKO, Dinamarca) a una dilución final de 1:500 en TI. Los anticuerpos policlonales de cabra anti-hIL-13Rα1 se detectaron con un policlonal anti IgG de cabra producido en burro y conjugado con peroxidasa (Santa Cruz; dilución 1:1000 en TI). Tras incubarse durante 1h a TA y tras un nuevo paso de lavado, las placas se revelaron con solución ABTS® lista para su uso (Roche Diagnostics GmbH) a TA en la oscuridad. La absorbancia a 405nm se midió en el momento en que la absorbancia de la concentración más alta alcanzaba un valor suficiente (Fig. 5).

15 Ejemplo 16

Reacción cruzada de los HuMab frente al IL-13Rα1 de Cynomolgus

El gen codificante para el IL-13Rα1 fue aislado por RT-PCR a partir de tejido de Cynomolgus y fue transfectado a la línea celular murina Ba/F3. Para comprobar si los anticuerpos HuMabs tenían reacción cruzada o no con la IL-13Rα1 de Cynomolgus, se incubaron tanto las células Ba/F3 transfectadas y estabilizadas como las Ba/F3 parentales frente a HuMab a 10µg/ml y a anticuerpos control. Como control positivo se utilizó un policlonal de cabra anti-hIL-13Rα1 (R&D Systems). Los controles negativos incluidos fueron: una proteína IgG1 de mieloma humano (Nordic) y un suero de cabra normal. Los anticuerpos unidos fueron detectados mediante análisis por FACS utilizando un anticuerpo frente a la IgG humana conjugado con FITC para detectar los HuMabs y un anticuerpo específico para las IgG de cabra conjugado con FITC para la detección de los anticuerpos de cabra. Se compararon las intensidades de fluorescencia medias (IFM) para los diferentes anticuerpos probados sobre la línea transfectada Ba/F3 frente a los obtenidos con la línea parental.

Todos los HuMabs de la invención fueron capaces de unirse al IL-13Rα1 de Cynomolgus expresado por células Ba/F3 transfectadas. Tal y como era de esperar debido a la gran homología existente entre el IL-13Rα1 humano y el de Cynomolgus, también el anticuerpo policlonal AF152 presentaba unión al IL-13Rα1 de Cynomolgus. Los anticuerpos control negativo presentaron sólo un aumento marginal de si IFM cuando se ensayaron con la línea celular Ba/F3 transfectada (Tabla 5).

Tabla 5:

	Anticuerpo	IFM Ba/F3	IFM Ba/F3_Cyno_IL-13Rα1	Tasa de incremento de la IFM en presencia de CynoIL-13Rα1
HuMabs	LC5002-002	3,9	83,7	79,8
	LC5002-003	3,4	82,4	79,0
	LC5002-005	14,8	101,5	86,7
	LC5002-007	4,1	19	14,9
Controles	AF152	3,2	21,2	18,0
	IgG de cabra normal	3,3	5,7	2,4
	IgG1 humana normal (Nordic)	3,5	10,2	6,7
	Sólo IgG-FITC anti-humana	3,3	5,5	2,2

35 Ejemplo 17

Unión de HuMab anti-IL-13Rα1 a receptores de Fcγ (unión a FcγR111a en células T asesinas)

Para determinar la capacidad de los anticuerpos de la invención para unirse a FcγR111a (CD16) en células T asesinas (NK), se aislaron en primer lugar Células Mononucleadas de Sangre Periférica (PBMCs) y se incubaron con anticuerpo HuMab a 20 µg/ml y con anticuerpos control en presencia o ausencia de anticuerpo de ratón bloqueante para FcγR111a (anti-CD16, clon 3G8, RDI, Flanders, NJ) a 20 µg/ml, comprobándose así la unión vía FcγR111a. Como controles negativos se usaron IgG2 e IgG4 humana (The Binding Site), que no se unen a FcγR111a. Las IgG1 y IgG3 humanas (The Binding Site) se utilizaron como controles positivos para unión a FcγR111a. Los anticuerpos unidos a las células T asesinas se detectaron por análisis de FACS utilizando un anticuerpo anti CD56 humano (marcador de superficie de las células NK) murino, marcado con ficoeritrina (PE) (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) en combinación con un F(ab)₂ de cabra anti IgG humana (Fc) marcado con FITC (Protos

immunoresearch, Burlingame, CA). Determinándose la unión máxima a 20µg/ml (U_{max}: IFM±desv.est.) del HuMab analizado.

- 5 El LC5002-005 era capaz de unirse a FcγRIIIa de forma eficiente (comparable al anticuerpo IgG1 control) tal como indicaba un valor de U_{max} (IFM) de 580,6±245,8. La adición de un anticuerpo de bloqueo frente a FcγRIIIa reducía de forma muy importante la unión de LC5002-005 a las células NK (U_{max} (IFM) de 260,4±95,90) indicando una unión específica a FcγRIIIa.

Listado de Referencias

- 10 Aikawa, M., et al., *Cytokine* 13 (2001) 75-84
 Aplin, J.D., and Wriston, J.C. Jr., *CRC Crit. Rev. Biochem.* (1981) 259-306
 Ausubel, F., et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)
- 15 Barnes, L.M., et al., *Cytotechnology* 32 (2000) 109-123
 Barnes, L.M., et al., *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270
 Berge, S.M., et al., *J. Pharm. Sci.* 66 (1977) 1-19
 Boerner, P., et al., *J. Immunol.* 147 (1991) 86-95
 Brueggemann M., et al., *J. Exp. Med.* 166 (1987) 1351-1361
 Bruggemann, M., et al., *Year Immunol.* 7 (1993) 33-40
- 20 Brunhouse, R., and Cebra, J.J., *Mol. Immunol.* 16 (1979) 907-917
 Burton, D.R., et al., *Nature* 288 (1980) 338-344
 Carter, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289
 Chen, J., et al., *International Immunology* 5 (1993) 647-656
 Chen, J., et al., *EMBO J.* 12 (1993) 821-830
- 25 Choi, T.K., et al., *Nature Genetics* 4 (1993) 117-123
 Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss (1985) p. 77
 Durocher, Y., et al., *Nucl. Acids. Res.* 30 (2002) E9
 Edelman, G.M., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63 (1969) 78-85
 Edge, A.S., et al., *Anal. Biochem.* 118 (1981) 131-137
- 30 EP 0 307 434
 Fishwild, D.M., et al., *Nat. Biotechnol.* 14 (1996) 845-851
 Geisse, S., et al., *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282
 Graber, P., et al., *Eur. J. Immunol.* 28 (1998) 4286-4298 Harding, F., and Lonberg, N., *Ann. N. Acad. Sci*
 764 (1995) 536-546
- 35 Harding, F., and Lonberg, N., *Ann. N. Acad. Sci* 764 (1995) 536-546
 Hazareh, M., et al., *J. Virol.* 75 (2001) 12161-12168
 Hoogenboom, H.R., and Winter, G., *J. Mol. Biol.* 227 (1992) 381-388
 Idusogie, E.E., et al., *J. Immunol.* 164 (2000) 4178-4184
 Jakobovits, A., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 2551-2555
- 40 Jakobovits, A., et al., *Nature* 362 (1993) 255-258
 Jones, P., et al., *Nature* 321 (1986) 522-525
 Kabat, E.A., et al., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), NIH Publication No. 91-3242
- 45 Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-161
 Lonberg, N., et al., *Nature* 368 (1994) 856-859
 Lonberg, N., *Handbook of Experimental Pharmacology* 113 (1994) 49-101
 Lonberg, N., and Huszar, D., *Intern. Rev. Immunol.* 25 (1995) 65-93
 Love, T.W., et al., *Methods Enzymol.* 178 (1989) 515-527
- 50 Lukas, T.J., et al., *J. Immunol.* 127 (1981) 2555-2560
 Makrides, S.C., *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202
 Marks, J.D., et al., *J. Mol. Biol.* 222 (1991) 581-597
 Meissner, P., et al., *Biotechnol Bioeng* 75 (2001) 197-203
 Morgan, A., et al., *Immunology* 86 (1995) 319-324
 Morrison, S.L., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 6851-6855
- 55 Neuberger, M.S., *EMBO J.* 2 (1983) 1373-1378
 Norderhaug, L., et al., *J. Immunol. Methods* 204 (1997) 77-87
 Obiri, N.I., et al., *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 8797-8804
 Orlandi, R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 3833-3837
 Picard, D., and Schaffner, W., *Nature* 307 (1984) 80-82
- 60 Poudrier, J., et al., *J. Immunol.* 30 (2000) 3157-3164
 Poudrier J., et al., *J. Immunol.*, 163 (1999) 1153-1161
 Queen, C., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 10029-10033
 Riechmann, L., et al., *Nature* 332 (1988) 323-327
 Schlaeger, E.-J., and Christensen, K., *Cytotechnology* 30 (1999) 71-83
- 65 Schlaeger, E.-J., in *J. Immunol. Methods* 194 (1996) 191-199

5 Sojahr, H.T., and Bahl, O.P., Arch. Biochem. Biophys. 259 (1987) 52-57
 SwissProt No. O09030
 SwissProt No. P24394
 SwissProt No. P35225
 SwissProt No. P78552
 SwissProt No. Q14627
 Taylor, L., et al., Nucleic Acids Research 20 (1992) 6287-6295
 Taylor, L., et al., Int. Immunol. 6 (1994) 579-591
 Thommesen, J.E., et al., Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004
 10 Thotakura, N.R., and Bahl, O.P., Meth. Enzymol. 138 (1987) 350-359
 Tuailon, N., et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 90 (1993) 3720-3724
 Tuailon, N., et al., Immunol. 152 (1994) 2912-2920
 Patente Estadounidense N° 4.640.835
 Patente Estadounidense N° 4.496.689
 15 Patente Estadounidense N° 4.301.144
 Patente Estadounidense N° 4.670.417
 Patente Estadounidense N° 4.791.192
 Patente Estadounidense N° 4.179.337
 Patente Estadounidense N° 5.202.238
 20 Patente Estadounidense N° 5.204.244
 Patente Estadounidense N° 5.545.806
 Patente Estadounidense N° 5.545.807
 Patente Estadounidense N° 5.569.825
 Patente Estadounidense N° 5.625.126
 25 Patente Estadounidense N° 5.633.425
 Patente Estadounidense N° 5.661.016
 Patente Estadounidense N° 5.770.429
 Patente Estadounidense N° 5.789.650
 Patente Estadounidense N° 5.814.318
 30 Patente Estadounidense N° 5.874.299
 Patente Estadounidense N° 5.877.397
 van Dijk, M.A., and van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol 5 (2001) 368-374
 Werner, R.G., Drug Res. 48 (1998) 870-880
 WO 87/05330
 35 WO 92/22645
 WO 92/03918
 WO 93/1227
 WO 94/25585
 WO 96/29417
 40 WO 97/15663
 WO 98/24884
 WO 01/14424
 WO 03/080675

45 **LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> F. Hoffmann-La Roche AG
 <120> Anticuerpos frente al receptor alfa-1 de la IL-13 y usos de los mismos
 50 <130> 22922 EP
 <150> EP 05002229
 <151> 2005-02-03
 <160> 12
 <170> PatentIn versión 3.2
 55 <210> 1
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 60 <223> LC5002-002 VH gamma/dominio variable de la cadena pesada
 <400> 1
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Ile Tyr
 65 20 25 30

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

10 Ala Lys Gly Ser Ser Ser Trp Thr Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 2

15 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> LC5002-002 VL cadena kappa /dominio variable de la cadena
 <400> 2

20 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Trp
 20 25 30

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

35 <210> 3
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

40 <223> LC5002-003 VH gamma/dominio variable de la cadena pesada
 <400> 3

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Ile Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Ile Tyr
 20 25 30

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

50 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

55 Ala Lys Gly Ser Ser Tyr Trp Thr Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 4
 <211> 107
 60 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> LC5002-003 VL kappa/dominio variable de la cadena ligera
 <400> 4

65

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 5 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 10 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 15 <210> 5
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> LC5002-005 VH gamma/dominio variable de la cadena pesada
 <400> 5
 Glu Val Gln Val Leu Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Leu Tyr
 20 25 30
 25 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

 Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Leu Ser Thr Tyr Phe Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 30 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 35 Ala Lys Glu Gly Asp Trp Ile Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Ile Val Ser Ser
 115
 40 <210> 6
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> LC5002-005 VL kappa/dominio variable de la cadena ligera
 45 <400> 6
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 50 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 55 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser His Pro Pro
 85 90 95
 60 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 7
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> LC5002-007 VH gamma/dominio variable de la cadena pesada
 <400> 7
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 5 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Arg Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 10 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 15 Ala Arg Glu Gly Glu Thr Leu Asp Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 8
 20 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> LC5002-007 VL kappa/dominio variable de la cadena ligera
 25 <400> 8
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 30 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ile Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 35 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Gly Ser Ser Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 40 <210> 9
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> LC5002-018 VH gamma/dominio variable de la cadena pesada
 <400> 9
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 50 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Ile Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Val Ile Ser Gly Ser Gly Val Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 55 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 60 Ala Lys Gly Ser Ser Trp Tyr Val Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 10
 65 <211> 107

<212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> LC5002-018 VL kappa/dominio variable de la cadena ligera
 5 <400> 10
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 10
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 15 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 20 100 105
 <210> 11
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 11
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30
 30 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 35 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 40 100 105
 <210> 12
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 12
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 50 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 55 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 60 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 65 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 5 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 10 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 15 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 20 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une al IL-13R α 1 y que inhibe la IL-13, caracterizado por que la secuencia de aminoácidos de la parte variable de la cadena pesada CDR3 de dicho anticuerpo, se selecciona a partir del grupo de secuencias de la cadena pesada CDR3 compuesto por las Secuencias con N^o ID: 1, 3, 5 o 7 con lo que dicho anticuerpo se obtiene partir de líneas celulares de hibridoma DSM ACC2709, DSM ACC2710, DSM ACC2711 o DSM ACC2712.
2. Un anticuerpo que se une al IL-13R α 1 y que inhibe la IL-13, caracterizado porque la secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable CDR3 de dicho anticuerpo se elige del grupo constituido por las secuencias CDR3 de cadena pesada con ID de SEC n^o: 1, 3 5, 7 o 9 y comprende como región variable de la cadena pesada a la región con N^o de ID SEC: 1 y como región variable de la cadena ligera a la de N^o de SEC: 2, como región variable de la cadena pesada a la región con N^o de ID SEC: 3 y como región variable de la cadena ligera a la de N^o de SEC: 4, como región variable de la cadena pesada a la región con N^o de ID SEC: 5 y como región variable de la cadena ligera a la de ID de SEC N^o: 6, como región variable de la cadena pesada a la región con ID de SEC N^o: 7 y como región variable de la cadena ligera a la de ID de SEC N^o: 8 o como región variable de la cadena pesada a la región con N^o de ID SEC: 9 y como región variable de la cadena ligera a la de ID de SEC N^o:10.
3. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque comprende
- a) como región variable de la cadena pesada la ID de SEC N^o: 1, como región variable de la cadena ligera la ID de SEC N^o:5, como región constante de la cadena ligera κ la ID de SEC N^o: 11 y como región constante de la cadena pesada γ 1 la ID de SEC N^o: 12,
 - b) como región variable de la cadena pesada la N^o de ID SEC: 3, como región variable de la cadena ligera la N^o de ID de SEC:4, como región constante de la cadena ligera κ la N^o de ID de SEC: 11 y como región constante de la cadena pesada γ 1 ID de SEC N^o: 12,
 - c) como región variable de la cadena pesada la N^o de ID SEC: 5, como región variable de la cadena ligera la N^o de ID de SEC:6, como región constante de la cadena ligera κ la N^o de ID de SEC: 11 y como región constante de la cadena pesada γ 1 la ID de SEC N^o: 12,
 - d) como región variable de la cadena pesada la N^o de ID SEC: 7, como región variable de la cadena ligera la N^o de ID de SEC:8, como región constante de la cadena ligera κ la N^o de ID de SEC: 11 y como región constante de la cadena pesada γ 1 ID de SEC N^o: 12,
 - e) como región variable de la cadena pesada la N^o de ID SEC: 9, como región variable de la cadena ligera la N^o de ID de SEC:10, como región constante de la cadena ligera κ la N^o de ID de SEC: 11 y como región constante de la cadena pesada γ 1 ID de SEC N^o: 12.
4. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque comprende en adición las mutaciones L234A y L235A o D265A y N297A.
5. El uso de un anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones de la 1 a 4 para la fabricación de un compuesto farmacéutico.
6. Un compuesto farmacéutico que incluya un anticuerpo que esté acorde con las reivindicaciones de la 1 a 4.
7. Una célula huésped recombinante capaz de producir un anticuerpo recombinante de acuerdo con las reivindicaciones de la 1 a 4.
8. Un método para la producción de un compuesto farmacéutico que incluya anticuerpo que esté acorde con las reivindicaciones de la 1 a 4.
9. Un ácido nucleico que codifica un anticuerpo que se une al IL-13R α 1 y que inhibe la IL-13 que comprende como región variable de la cadena pesada a la región con N^o de ID SEC: 1 y como región variable de la cadena ligera a la de N^o de SEC: 2, como región variable de la cadena pesada a la región con N^o de ID SEC: 3 y como región variable de la cadena ligera a la de N^o de SEC: 4, como región variable de la cadena pesada a la región con N^o de ID SEC: 5 y como región variable de la cadena ligera a la de ID de SEC N^o: 6, como región variable de la cadena pesada a la región con ID de SEC N^o: 7 y como región variable de la cadena ligera a la de ID de SEC N^o: 8 o como región variable de la cadena pesada a la región con N^o de ID SEC: 9 y como región variable de la cadena ligera a la de ID de SEC N^o:10.
10. Un vector de expresión que incluya un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 9, capaz de expresar dicho ácido nucleico en una célula huésped eucariota o procarionta.
11. Una célula huésped procarionta o eucariota incluyendo el vector de acuerdo con la reivindicación 10.

12. Un método para la producción de un polipéptido con capacidad de unión a IL-13R α 1 y que inhiba la unión de IL-13 a IL-13R α 1, caracterizado por expresar un ácido nucleico codificante para una cadena pesada y un ácido nucleico codificante para una cadena ligera de acuerdo con la reivindicación 9 en una célula huésped procariota o eucariota con la recuperación de dicho polipéptido a partir de la célula citada.
13. Anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4 para uso en el tratamiento de un paciente que requiera terapia para el asma o antialérgica.
- 10 14. Un método para la preparación del compuesto farmacéutico caracterizado por producir un anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 a la 4 mediante expresión recombinante, recuperación de dicho anticuerpo y combinación de dicho anticuerpo con un tampón y/o adyuvante farmacéuticamente aceptables.
15. Las líneas celulares de hibridoma DSM ACC2709, DSM ACC2710, DSM ACC2711 o DSM ACC2712.

15

Fig. 1

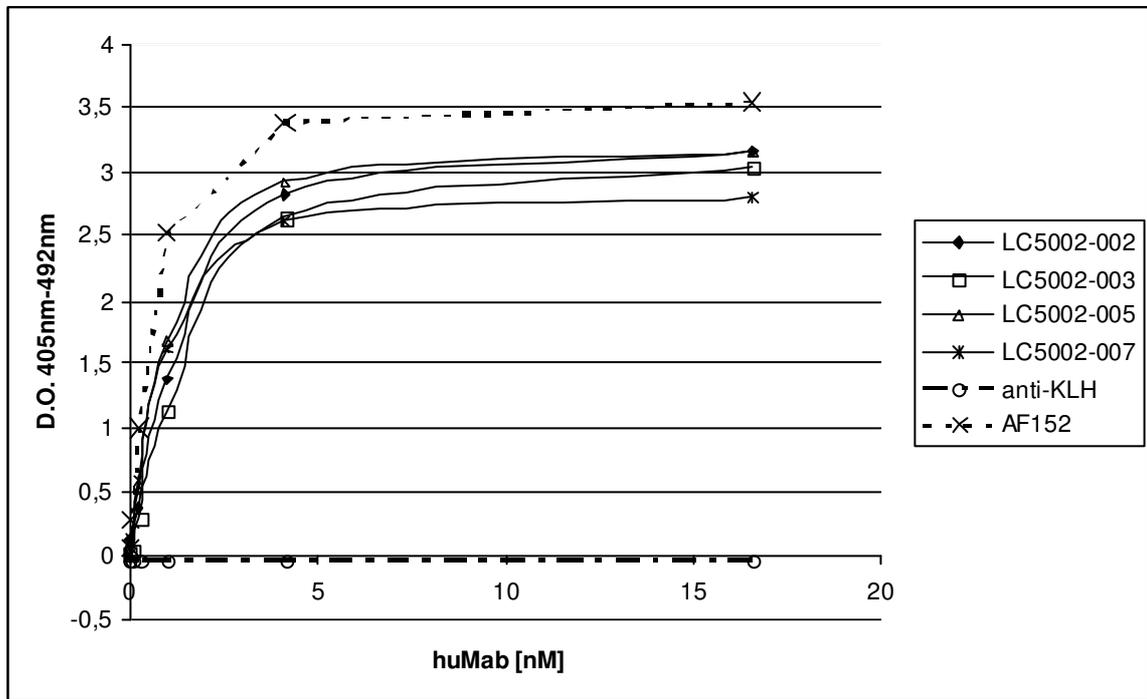


Fig. 2

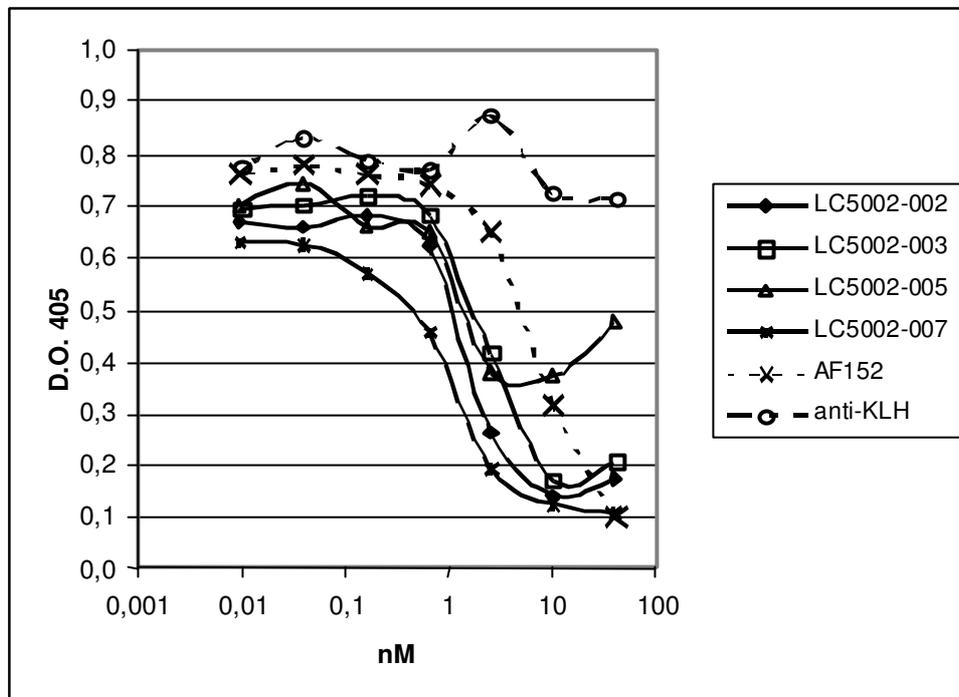


Fig. 3

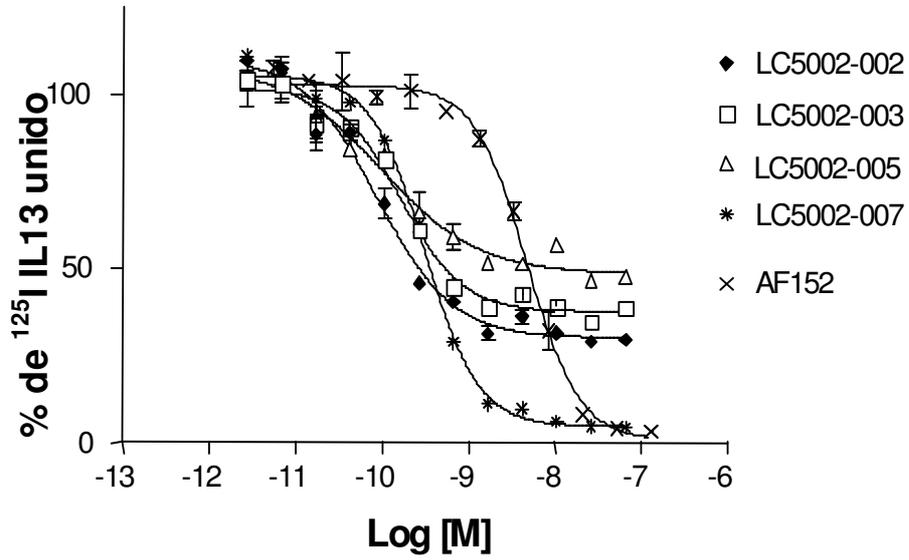


Fig. 4

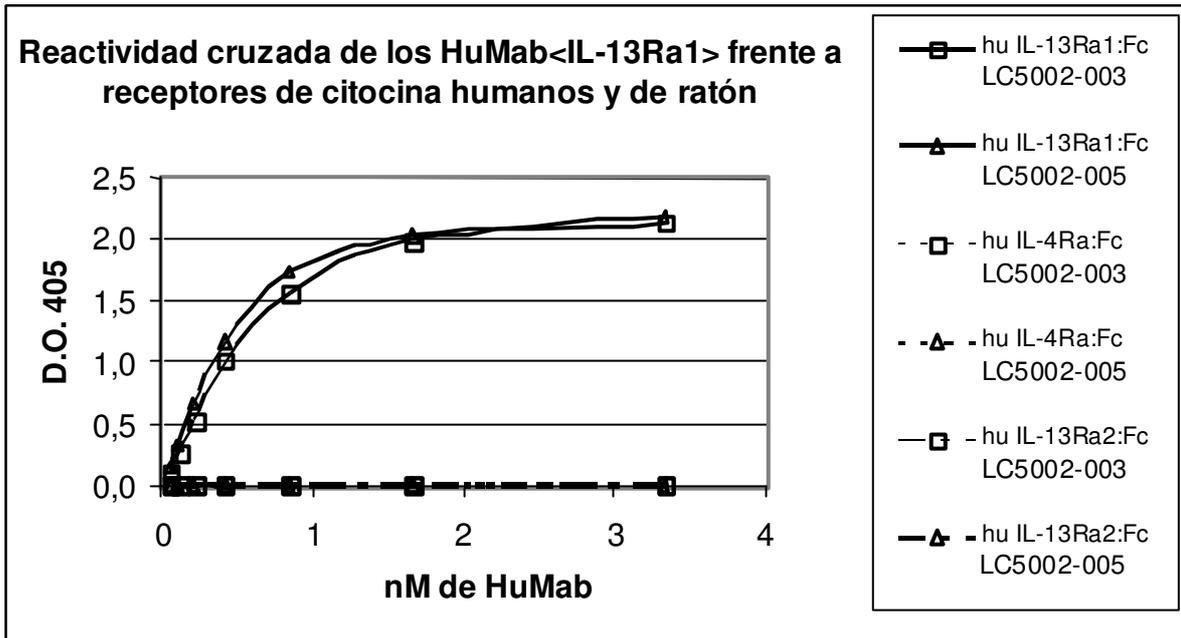


Fig. 5

