



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 352**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/715** (2006.01)

**C07K 19/00** (2006.01)

**A61K 38/19** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 38/20** (2006.01)

**A61P 37/00** (2006.01)

**A61P 43/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00928591 .7**

96 Fecha de presentación : **28.04.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1173484**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.01.2002**

54 Título: **Tratamiento de la fibrosis mediante el antagonismo de la IL-3 y de las cadenas del receptor del IL-3.**

30 Prioridad: **28.04.1999 US 301808**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**02.11.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**02.11.2011**

73 Titular/es: **GENETICS INSTITUTE, L.L.C.**  
**87 Cambridge Park Drive**  
**Cambridge, Massachusetts 02140, US**  
**Government of The United States of America, as**  
**Represented by The Secretary, Department of**  
**Health And Human Services**

72 Inventor/es: **Wynn, Thomas, A.;**  
**Chiaramonte, Monica, G.;**  
**Collins, Mary;**  
**Donaldson, Debra;**  
**Fitz, Lori;**  
**Neben, Tamlyn;**  
**Whitters, Matthew, J. y**  
**Wood, Clive**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 367 352 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

Tratamiento de la fibrosis mediante el antagonismo de la IL-3 y de las cadenas del receptor de IL-3

La presente solicitud es una continuación en parte de la solicitud con nº de serie 08/841.751, presentada el 30 de abril, 1997, que es una solicitud divisional de la solicitud con nº de serie 08/609.572, presentada el 1 de marzo, 1996.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al tratamiento y a la inhibición de la fibrosis mediante el antagonismo de la interacción de la IL-3 con su receptor y con los componentes del receptor.

**Antecedentes de la invención**

10 Se conoce la existencia de una diversidad de moléculas reguladoras, denominadas citoquinas, que incluyen a la interleuquina-13 (IL-13). Se divulgan diversas formas de la proteína de IL-13 y ADN que codifica diversas formas de actividad IL-13 en McKenzie et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:3735 (1993); Minty et al., Nature, 362:248 (1993); y Aversa et al., documento WO 94/04680. Por tanto, el término "IL-13" incluye proteínas que tienen la secuencia y/o actividad biológica divulgada en estos documentos, producidas mediante técnicas de modificación genética recombinate, purificadas a partir de fuentes celulares que producen el factor de modo natural o tras una inducción con otros factores, o sintetizadas mediante técnicas químicas, o una combinación de lo anterior.

15 La IL-13 es una citoquina que se ha implicado en la producción de diversas actividades biológicas que incluyen la inducción de la conmutación de IgG e IgE, incluyendo en células B inmaduras humanas (Punnonen et al., J. Immunol., 152:1094 (1994)); la inducción de la transcripción de la transcripción de la cadena pesada ( $\epsilon$ ) de IgE de la línea germinal y la expresión de CD23 en células B humanas normales (Punnonen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:3730 (1993)); y la inducción de la proliferación de células B en presencia de CD40L o mAb anti9-CD40 (Cocks et al., Int. Immunol., 5:657 (1993)). Aunque muchas actividades de IL-13 son similares a las de IL-4, en contraste con la IL-4, la IL-13 no tiene efectos estimulantes del crecimiento sobre células T activadas o clones de células T (Zurawski et al., EMBO J., 12:2663 (1993)).

20 Al igual que la mayoría de las citoquinas, la IL-13 muestra ciertas actividades biológicas interaccionando con un receptor de IL-13 ("IL-13R") sobre la superficie de células diana. El IL-13R y el receptor de IL-4 ("IL-4R") comparten un componente común, que se requiere para la activación del receptor; sin embargo, la IL-13 no se une a células transfectadas con IL-4R de 130 kD (Zurawski et al., *supra*). Por tanto, el IL-13R debe contener al menos otra cadena de unión al ligando. Los receptores de citoquinas están compuestos habitualmente por dos o tres cadenas. La clonación de una cadena de unión al ligando para IL-13 se ha divulgado en fecha reciente (Hilton et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 93:497-501).

25 Sería deseable identificar y clonar la secuencia para cualquier otra cadena de unión a IL-13 del IL-13R de forma que puedan producirse proteínas de IL-13R por diversas razones, incluyendo la producción de productos terapéuticos y la búsqueda de inhibidores de la unión de IL-13 al receptor y la señalización del receptor.

30 El documento WO 97/31946 describe la cadena de unión a IL-13 del receptor de IL-13 (IL-13bc) e indica que los inhibidores de IL-13bc e IL-13R pueden ser útiles para tratar o modular trastornos relacionados con IL-13, tales como trastornos alérgicos, asma, enfermedades del complejo inmunológico (tales como lupus, síndrome nefrótico, nefritis, glomerulonefritis, tiroiditis y enfermedad de Grave), deficiencias inmunológicas y cáncer.

35 Zhu et al. (J. Clin. Invest., 103 (1999), 779) divulgan que la expresión dirigida de la IL-13 en el tejido pulmonar de ratones conduce a la inflamación, la hipersecreción de moco, la formación de fibrosis subepitelial, anomalías fisiológicas y producción de eotaxina.

40 Chiamonte et al. (J. Immunol., 162 (1999), 920) describen una reducción en el tamaño de granulomas pulmonares inducidos por los huevos de *Schistosoma mansoni* en ratones tras un tratamiento con una proteína de fusión de IL-13R $\alpha$ 2-Fc soluble. Descubrieron, sin embargo, que el depósito de colágeno, que es un componente principal de los depósitos fibróticos en la fibrosis, no se vio afectado en estos ratones.

45 El documento WO 96/04388 describe una proteína soluble que tiene actividad antagonista o antagonista parcial de IL-4 y/o de IL-13, que comprende un mutante o un variante de IL-4 condensado con al menos un dominio constante de inmunoglobulina humana, o su fragmento. El documento WO 96/04388 reivindica el uso, entre otras reivindicaciones, de la proteína soluble para la precipitación de composiciones farmacéuticas para tratar trastornos que se producen como resultado de acciones indeseables de IL-4 y/o IL-13.

La presente invención proporciona el uso de una IL-13bc o su fragmento, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en (a) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2; (b) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 desde el aminoácido 22 al 334; (c) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 desde el aminoácido 357 al 383; (d) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4; (e) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 desde el aminoácido 26 al 341; (f) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 desde el aminoácido 263 al 380; y (g) los fragmentos (a)-(f) que tienen una actividad biológica de la cadena de unión del receptor de IL-13, para la fabricación de un medicamento para tratar la fibrosis de tejidos en un mamífero.

Según la presente invención, se divulgan polinucleótidos que codifican las cadenas de unión a IL-13 del receptor de interleuquina-13 que incluyen, sin limitación, las de los receptores murino y humano. En ciertas realizaciones, la invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

(a) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1 desde el nucleótido 256 al nucleótido 1404;

(b) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:3 desde el nucleótido 103 al nucleótido 1242;

(c) una secuencia de nucleótidos que varía de la secuencia de nucleótidos especificada en (a) o (b) como resultado de la degeneración del código genético;

(d) una secuencia de nucleótidos capaz de hibridarse bajo condiciones rigurosas a los nucleótidos especificados en (a) o (b);

(e) una secuencia de nucleótidos que codifica una especie homóloga a la secuencia especificada en (a) o (b); y

(f) un variante alélico de la secuencia de nucleótidos especificada en (a) o (b).

Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos codifica una proteína que tiene una actividad biológica del receptor de IL-13 humano. La secuencia de nucleótidos puede estar operablemente unida a una secuencia control de la expresión. En realizaciones preferidas, el polinucleótido comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1 desde el nucleótido 256 al nucleótido 1404; la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1 desde el nucleótido 319 al nucleótido 1257; la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1 desde el nucleótido 1324 al nucleótido 1404; la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:3 desde el nucleótido 103 al nucleótido 1242; la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:3 desde el nucleótido 178 al nucleótido 1125; o la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:3 desde el nucleótido 1189 al nucleótido 1242.

La invención también proporciona polinucleótidos aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

(a) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2;

(b) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 desde el aminoácido 22 al 334;

(c) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 desde el aminoácido 357 al 383;

(d) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4;

(e) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 desde el aminoácido 26 al 341;

(f) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 desde el aminoácido 363 al 380; y

(g) los fragmentos (a)-(f) que tienen una actividad biológica de la cadena de unión del receptor de IL-13. Otras realizaciones preferidas codifican la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 desde el aminoácido 1 al 331, y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 desde el aminoácido 26 al 331.

También se proporcionan células hospedantes, preferiblemente células de mamífero, transformadas con los polinucleótidos.

En otras realizaciones, la invención proporciona un procedimiento para producir una proteína IL-13bc. El procedimiento comprende:

- (a) cultivar un cultivo de la célula hospedante de la presente invención en un medio de cultivo adecuado; y
- (b) purificar la proteína IL-13bc humana del cultivo.

5 También se proporcionan las proteínas producidas según estos procedimientos.

La presente invención también proporciona una proteína IL-13bc aislada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2;
  - (b) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 desde el aminoácido 22 al 334;
  - 10 (c) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 desde el aminoácido 357 al 383;
  - (d) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4;
  - (e) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 desde el aminoácido 26 al 341;
  - (f) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 desde el aminoácido 363 al 380; y
  - (g) los fragmentos (a)-(f) que tienen una actividad biológica de la cadena de unión del receptor de IL-13.
- 15 Preferiblemente, la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2; la secuencia desde el aminoácido 22 al 334 de SEQ ID NO:2; la secuencia de SEQ ID NO:4; o la secuencia desde el aminoácido 26 al 341 de SEQ ID NO:4. En otras realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos especificada es parte de una proteína de fusión (con una secuencia de aminoácidos adicional que no se deriva de IL-13bc). Las proteínas de fusión preferidas comprenden un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fc. Las realizaciones
- 20 particularmente preferidas comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 desde el aminoácido 1 al 331, y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 desde el aminoácido 26 al 331.

También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 La presente invención también proporciona composiciones que comprenden un anticuerpo que reacciona de modo específico con una proteína de la presente invención.

También se proporcionan procedimientos para identificar un inhibidor de la unión de IL-13 al IL-13bc o al receptor de IL-13. Estos procedimientos comprenden:

- (a) combinar una proteína IL-13bc o su fragmento con IL-13 o su fragmento, formando dicha combinación una primera mezcla de unión;
  - 30 (b) medir la cantidad de unión entre la proteína y la IL-13 o el fragmento en la primera mezcla de unión;
  - (c) combinar un compuesto con la proteína y la IL-13 o el fragmento para formar una segunda mezcla de unión;
  - (d) medir la cantidad de unión en la segunda mezcla de unión; y
  - (e) comparar la cantidad de unión en la primera mezcla de unión con la cantidad de unión en la segunda mezcla de unión;
- 35 en las que el compuesto es capaz de inhibir la unión de IL-13 a la proteína IL-13bc o al receptor de IL-13 cuando se produce una disminución en la cantidad de unión de la segunda mezcla de unión. También se proporcionan inhibidores del IL-13R identificados mediante estos procedimientos, y composiciones farmacéuticas que los contienen.

También se describen procedimientos para inhibir la unión de IL-13 a las proteínas IL-13bc o al receptor de IL-13 en un sujeto mamífero, que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que contiene una proteína IL-13bc, un inhibidor de IL-13bc o de IL-13R, o un anticuerpo contra una proteína IL-13bc.

5 También se proporcionan procedimientos para potenciar la actividad IL-13, que comprenden combinar una proteína que tiene actividad IL-13 con una proteína de la presente invención, y poner en contacto dicha combinación con una célula que expresa al menos una cadena de IL-13R distinta de IL-13bc. Preferiblemente, la etapa de contacto se realiza administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha combinación a un sujeto mamífero.

10 Se proporcionan otros procedimientos para tratar un trastorno relacionado con la IL-13 en un sujeto mamífero, comprendiendo dicho procedimiento administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un antagonista de IL-13 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Otros procedimientos proporcionan un procedimiento para inhibir la interacción de la IL-13 con una proteína IL-13bc en un sujeto mamífero, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un antagonista de IL-13 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, el antagonista se selecciona del grupo que  
15 consiste en una proteína IL-13bc, una forma soluble de IL-13R $\alpha$ 1, un anticuerpo contra IL-13 o su fragmento de unión a IL-13, un anticuerpo contra IL-13bc o su fragmento de unión a IL-13bc, un anticuerpo contra IL-13R $\alpha$ 1 o su fragmento de unión a IL-13R $\alpha$ 1, los mutantes de unión a IL-13R de IL-4, una molécula pequeña capaz de inhibir la interacción de IL-13 con IL-13bc, y una molécula pequeña capaz de inhibir la interacción de IL-13 con IL-13R $\alpha$ 1.

20 En otras realizaciones, la invención proporciona un procedimiento para tratar la fibrosis de tejidos en un sujeto mamífero. El procedimiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende una proteína y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

(a) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2;

(b) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 desde el aminoácido 22 al 334;

(c) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 desde el aminoácido 357 al 383;

25 (d) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4;

(e) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 desde el aminoácido 26 al 341;

(f) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 desde el aminoácido 363 al 380; y

(g) los fragmentos (a)-(f) que tienen una actividad biológica de la cadena de unión del receptor de IL-13.

30 La invención también proporciona un procedimiento para inhibir la formación de fibrosis de tejidos en un sujeto mamífero. El procedimiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende una proteína y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

(a) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2;

(b) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 desde el aminoácido 22 al 334;

35 (c) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 desde el aminoácido 357 al 383;

(d) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4;

(e) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 desde el aminoácido 26 al 341;

(f) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 desde el aminoácido 363 al 380; y

(g) los fragmentos (a)-(f) que tienen una actividad biológica de la cadena de unión del receptor de IL-13.

Otras realizaciones de la invención proporcionan un procedimiento para tratar o inhibir la fibrosis de tejidos en un sujeto mamífero. El procedimiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende (a) una molécula seleccionada del grupo que consiste en un antagonista de IL-13 y un antagonista de IL-4; y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 En la práctica de dichos procedimientos para tratar o inhibir la fibrosis, preferiblemente la fibrosis de tejidos afecta a un tejido seleccionado del grupo que consiste en hígado, epidermis de la piel, endodermis de la piel, músculo, tendón, cartílago, tejido cardíaco, tejido pancreático, tejido pulmonar, tejido uterino, tejido neuronal, testículos, ovario, glándula adrenal, arterias, venas, colon, intestino delgado, tracto biliar e intestino; lo más preferiblemente, tejido hepático (incluyendo tejido infectado con esquistosoma). En ciertas realizaciones, la fibrosis es el resultado de la curación de una herida (incluyendo una incisión quirúrgica).

10 En la práctica de dichos procedimientos para tratar o inhibir la fibrosis utilizando un antagonista, preferiblemente dicho antagonista se selecciona del grupo que consiste en una proteína IL-13bc, una forma soluble de IL-13R $\alpha$ 1, un anticuerpo contra IL-13 o su fragmento de unión a IL-13, un anticuerpo contra IL-13bc o su fragmento de unión a IL-13bc, un anticuerpo contra IL-13R $\alpha$ 1 o su fragmento de unión a IL-13R $\alpha$ 1, los mutantes de unión a IL-13R de IL-4, una molécula pequeña capaz de inhibir la interacción de IL-13 con IL-13bc, y una molécula pequeña capaz de inhibir la interacción de IL-13 con IL-13R $\alpha$ 1. En realizaciones particularmente preferidas, el antagonista es una proteína IL-13bc que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

(a) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2;

(b) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 desde el aminoácido 22 al 334;

20 (c) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 desde el aminoácido 357 al 383;

(d) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4;

(e) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 desde el aminoácido 26 al 341;

(f) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 desde el aminoácido 363 al 380; y

(g) los fragmentos (a)-(f) que tienen una actividad biológica de la cadena de unión del receptor de IL-13.

25 En otros procedimientos preferidos para practicar dichos procedimientos utilizando un antagonista, el antagonista se selecciona del grupo que consiste en una forma soluble de IL-4R, un anticuerpo contra IL-4 o su fragmento de unión a IL-4, un anticuerpo contra IL-4R o su fragmento de unión a IL-4R, y una molécula pequeña capaz de inhibir la interacción de IL-4 con IL-4R.

### **Breve descripción de las figuras**

30 Figura 1: La figura presenta fotografías de células COS transfectadas con IL-13, IL-4, IL-11 y transfectadas de forma simulada después de la exposición a IL-13bc-Fc según se describe en el ejemplo 4 que aparece a continuación.

35 Figura 2: Caracterización de los papeles de IL-4 e IL-13 en la patogénesis de la esquistosomiasis. Ratones C57BL/6 WT ("wild type", de tipo salvaje) y ratones deficientes en IL-4 (4KO) se infectaron con 25 cercarias de *Schistosoma mansoni* y después se sacrificaron en la semana 8 después de la infección para evaluar el tamaño de los granulomas hepáticos (panel A), la eosinofilia de tejidos (panel B), y la fibrosis hepática (panel C). Se trataron otros grupos de ratones con control-Fc o sIL-13R $\alpha$ 2-Fc, según se describe en la sección de "Procedimientos". Los datos mostrados son mediciones procedentes de ratones individuales, y las líneas indican la media para cada grupo. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante el ensayo de la t de Student (paneles A y B), y mediante análisis de la covarianza (panel C). Las comparaciones significativas y sus valores de p se indican en la figura. Todos los datos se reprodujeron en un segundo estudio.

40 Figura 3: El colágeno hepático se reduce en ratones infectados/tratados con sIL-13R $\alpha$ 2-Fc. Se prepararon secciones de hígado 8 semanas después de la infección de exposición. Las secciones procedentes de ratones de tipo salvaje tratados con control-Fc (paneles A y B) y de ratones tratados con sIL-13R $\alpha$ 2-Fc que contenían cargas de huevos en los tejidos casi idénticas se tiñeron con rojo de picrosirius (paneles A y C), y se iluminaron utilizando luz polarizada para destacar las áreas ricas en colágeno (paneles B y D). Las áreas birrefringentes indican una tinción de colágeno

positiva, y las áreas mostradas son representativas para cada hígado (magnificación, x40). Las secciones de hígado procedentes de ratones tratados con sIL-13R $\alpha$ 2-Fc mostraron sólo granulomas muy ligeros y colágeno asociado al tracto portal, en comparación con los animales control.

5 Figura 4: El perfil de citoquinas de tipo Th1/Th2 no se ve afectado por un tratamiento con sIL-13R $\alpha$ 2-Fc. Se infectaron ratones C57BL/6 WT y ratones deficientes en IL-4 (4KO) con 25 cercarias de *Schistosoma mansoni*, y otros grupos de ratones se trataron con control-Fc o sIL-13R $\alpha$ 2-Fc, según se describe en la sección de "Procedimientos". Se aislaron células del nódulo linfático mesentérico de ratones individuales y se prepararon suspensiones de células individuales ( $3 \times 10^6$  células/pocillo en placas de 24 pocillos), y se estimularon sólo con medio (cuadrados), con SEA a 20 ug/ml (círculos), o con SEA y 50 ug/ml de mAb anti-CD4 (triángulos). Todas las citoquinas se ensayaron en sobrenadantes de cultivo mediante ELISA 72 horas después de la estimulación, según se describe en la sección de "Procedimientos". Los símbolos representan valores para ratones individuales, y las barras indican la media dentro de cada grupo.

15 Figura 5: La expresión de ARNm de citoquinas de tipo Th2 se reduce en los hígados de ratones deficientes en IL-4 infectados, pero permanece sin cambios por el bloqueo de IL-13. Se infectaron ratones C57BL/6 WT y ratones deficientes en IL-4 (4KO) con 25 cercarias de *Schistosoma mansoni*, y otros grupos de ratones se trataron con control-Fc o sIL-13R $\alpha$ 2-Fc, según se describe en la sección de "Procedimientos". Todos los animales se sacrificaron en la semana 8 después de la infección, y se prepararon especímenes de hígado para un análisis de RT-PCR, según se describe en la sección de "Procedimientos". Los datos mostrados son los valores individuales de 9 a 10 animales por grupo, y la barra indica la media dentro de cada grupo. El símbolo "\*" indica que los datos son significativamente diferentes del grupo de control-Fc de tipo salvaje, según se determina mediante el ensayo de la t de Student ( $p < 0,05$ ). Se muestran los valores medios de cinco ratones de tipo salvaje no infectados (círculos negros) y de cinco ratones deficientes en IL-4 no infectados (círculos blancos) en el eje de ordenadas para cada citoquina. Todos los datos se reprodujeron en un segundo estudio.

25 Figura 6: La expresión del ARNm de colágeno I y colágeno III se reduce en los hígados de ratones tratados con sIL-13R $\alpha$ 2-Fc infectados, pero permaneció sin cambios cuando existía deficiencia en IL-4. Se infectaron ratones C57BL/6 WT y ratones deficientes en IL-4 (4KO) con 25 cercarias de *Schistosoma mansoni*, y otros grupos de ratones se trataron con control-Fc o sIL-13R $\alpha$ 2-Fc, según se describe en la sección de "Procedimientos". Todos los animales se sacrificaron en la semana 8 después de la infección, y se prepararon especímenes de hígado para un análisis de RT-PCR, según se describe en la sección de "Procedimientos". Los datos mostrados son los valores individuales de 9 a 10 animales por grupo, y la barra indica la media dentro de cada grupo. El símbolo "\*" indica que los datos son significativamente diferentes del grupo de control-Fc de tipo salvaje y deficiente en IL-4, según se determina mediante el ensayo de la t de Student ( $p < 0,05$ ). Se muestran los valores medios de cinco ratones de tipo salvaje no infectados (círculos negros) y de cinco ratones deficientes en IL-4 no infectados (círculos blancos) en el eje de ordenadas para cada citoquina. Estos datos se reprodujeron en un segundo estudio.

35 Figura 7: La IL-13 induce la síntesis de colágeno de tipo I en fibroblastos 3T3 murinos. Las células se estimularon con medio (carril 1), rIL-4 a 1000 unidades/ml (carril 2), o rIL-13 a 20 ng/ml (carriles 3 y 4, de R&D Systems and Genetics Institute, respectivamente) durante 48 h. Los lisados de células totales se separaron en un SDS al 6%-PAGE bajo condiciones reductoras, se trasladaron a una membrana de nitrocelulosa y se sondaron con IgG de conejo anti-colágeno de tipo I de ratón. El doblete superior y la banda inferior (flechas) se corresponden con el colágeno de tipo I de rata purificado separado en el carril 5 (panel A). La figura inferior (panel B) son los valores densitométricos (unidades de píxeles arbitrarias).

#### **Descripción detallada de las realizaciones preferidas**

45 Los inventores de la presente solicitud han identificado y proporcionado, por primera vez, polinucleótidos que codifican la cadena de unión a IL-13 del IL-13R (en lo sucesivo "IL-13bc") incluyendo, sin limitación, polinucleótidos que codifican la IL-13bc murina y humana.

50 La SEQ ID NO:1 proporciona la secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica la IL-13bc murina. La SEQ ID NO:2 proporciona la secuencia de aminoácidos predicha de la cadena del receptor, incluyendo una secuencia señal putativa en los aminoácidos 1-21. Se cree que la IL-13bc murina madura tiene la secuencia de los aminoácidos 22-383 de SEQ ID NO:2. La cadena del receptor murina madura tiene al menos tres dominios diferenciados: un dominio extracelular (que comprende aproximadamente los aminoácidos 22-334 de SEQ ID NO:2), un dominio transmembrana (que comprende aproximadamente los aminoácidos 335-356 de SEQ ID NO:2), y un dominio intracelular (que comprende aproximadamente los aminoácidos 357-383 de SEQ ID NO:2).

La SEQ ID NO:3 proporciona la secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica la IL-13bc humana. La SEQ ID NO:4 proporciona la secuencia de aminoácidos predicha de la cadena del receptor, incluyendo una secuencia señal putativa en los aminoácidos 1-25. Se cree que la IL-13bc humana madura tiene la secuencia de los aminoácidos 26-380 de SEQ ID NO:4. La cadena del receptor humana madura tiene al menos tres dominios diferenciados: un dominio extracelular (que comprende aproximadamente los aminoácidos 26-341 de SEQ ID NO:4), un dominio transmembrana (que comprende aproximadamente los aminoácidos 342-362 de SEQ ID NO:4), y un dominio intracelular (que comprende aproximadamente los aminoácidos 363-380 de SEQ ID NO:4).

Los primeros 81 aminoácidos de la secuencia de la IL-13bc humana son idénticos a la secuencia traducida de un marcador de secuencia expresado (EST) identificado como "clon 41648 5 de ADNc de *Homo sapiens* yg99f10.r1" y al que se le ha adjudicado el n° de registro de la base de datos R52795.gb\_est2. No existen homologías ni motivos de secuencia en esta secuencia EST que podrían conducir a los expertos en la técnica a identificar la proteína codificada como un receptor de citoquinas. Un clon de ADNc que se corresponde con esta entrada en la base de datos está disponible públicamente en I.M.A.G.E. Consortium. Posteriormente a la fecha de prioridad de la presente solicitud, dicho clon fue encargado por los solicitantes y secuenciado. Se determinó que la secuencia de dicho clon era la secuencia previamente indicada por los solicitantes como SEQ ID NO:3 en la presente.

También pueden producirse las formas solubles de la proteína IL-13bc. Estas formas solubles incluyen, sin limitación, proteínas que comprenden los aminoácidos 1-334 ó 22-334 de SEQ ID NO:2, o los aminoácidos 1-341 ó 26-341 de SEQ ID NO:4. Las formas solubles de la IL-13bc se caracterizan también por ser solubles en una disolución acuosa, preferiblemente a temperatura ambiente. También pueden producirse proteínas IL-13bc que comprendan sólo el dominio intracelular o una porción de éste. Cualquier forma de IL-13bc con una longitud menor que la longitud completa se incluye dentro de la presente invención y estas formas se denominan en la presente junto con las formas de longitud completa y maduras "IL-13bc" o "proteínas IL-13bc". Las proteínas IL-13bc con una longitud menor que la longitud completa pueden producirse expresando un correspondiente fragmento del polinucleótido que codifica la proteína IL-13bc de longitud completa (SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3). Estos correspondientes fragmentos de polinucleótidos también son parte de la presente invención. Pueden producirse polinucleótidos modificados según se describió anteriormente mediante técnicas de biología molecular convencionales, que incluyen la construcción de los mutantes de delección deseados apropiados, procedimientos de mutagénesis dirigida a sitio, o mediante una reacción en cadena con polimerasa utilizando cebadores oligonucleotídicos apropiados.

Para los objetivos de la presente invención, una proteína tiene "una actividad biológica de la cadena de unión del receptor de IL-13" si posee una o más de las siguientes características: (1) la capacidad para unirse a IL-13 o a un fragmento de ésta (preferiblemente a un fragmento biológicamente activo de ésta); y/o (2) la capacidad de interactuar con la segunda cadena de unión a IL-13 de IL-13R para producir una señal característica de la unión de IL-13 a IL-13R. Preferiblemente, la actividad biológica que posee la proteína es la capacidad para unirse a IL-13 o a un fragmento de ésta, más preferiblemente con una  $K_D$  de 0,1 a 100 nM. Los procedimientos para determinar si una proteína o un péptido concretos tienen dicha actividad incluyen, sin limitación, los procedimientos descritos en los ejemplos proporcionados en la presente.

La IL-13bc o sus fragmentos activos (proteínas IL-13bc) pueden condensarse a moléculas portadoras, tales como inmunoglobulinas. Por ejemplo, las formas solubles de la IL-13bc pueden condensarse a través de secuencias "conectoras" a la porción Fc de una inmunoglobulina. También pueden utilizarse otras proteínas de fusión, tales como las producidas con GST, Lex-A o MBP.

También se divulgan los variantes alélicos de las secuencias de nucleótidos indicadas en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3, es decir, las formas alternativas naturales del polinucleótido aislado de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 que también codifican proteínas IL-13bc, preferiblemente las proteínas que tienen una actividad biológica de IL-13bc. También se incluyen en la invención los polinucleótidos aislados que se hibridan con la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 bajo condiciones muy rigurosas (por ejemplo, 0,1 x SSC a 65 °C). Los polinucleótidos aislados que codifican las proteínas IL-13bc pero que se diferencian de la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 en virtud de la degeneración del código genético también se incluyen en la presente invención. Las variaciones en la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 que están provocadas por mutaciones puntuales o por modificaciones inducidas también se incluyen en la invención.

También se proporcionan polinucleótidos que codifican homólogos de la IL-13bc murina y humana procedentes de otras especies animales, en particular de otras especies de mamífero. Las especies homólogas pueden identificarse y aislarse fabricando sondas o cebadores a partir de las secuencias murina o humana descritas en la presente y



seleccionando un banco procedente de una especie apropiada tal como, por ejemplo, bancos construidos a partir de PBMC, timo o testículos de la especie pertinente.

Los polinucleótidos aislados divulgados pueden unirse operablemente a una secuencia control de la expresión, tal como los vectores de expresión pMT2 o pED descritos en Kaufman et al., *Nucleic Acids Res.*, 19, 4485-4490 (1991), para producir la proteína IL-13bc de modo recombinante. En la técnica se conocen muchas secuencias de control de la expresión adecuadas. También se conocen procedimientos generales para expresar proteínas recombinantes y se ejemplifican en R. Kaufman, *Methods in Enzymology*, 185, 537-566 (1990). Tal como se define en la presente, "unido operablemente" significa unido enzimáticamente o químicamente para formar un enlace covalente entre el polinucleótido aislado de la invención y la secuencia de control de la expresión, de tal forma que la proteína IL-13bc es expresada por una célula hospedante que se ha transformado (transfectado) con el polinucleótido/secuencia de control de la expresión unidos.

Una serie de tipos de células pueden actuar como células hospedantes adecuadas para la expresión de la proteína IL-13bc. Puede utilizarse cualquier tipo celular capaz de expresar la proteína IL-13bc funcional. Las células hospedantes de mamífero adecuadas incluyen, por ejemplo, células COS de mono, células de ovario de hámster chino (CHO), células 293 de riñón humanas, células A431 epidérmicas humanas, células Colo205 humanas, células 3T3, células CV-1, otras líneas celulares de primate transformadas, células diploides normales, cepas de células derivadas del cultivo *in vitro* de tejido primario, explantes primarios, células HeLa, células L de ratón, células BHK, HL-60, U937, HaK, Rat2, BaF3, 32D, FDCEP-1, PC12, M1x o C2C12.

La proteína IL-13bc también puede producirse uniendo operablemente el polinucleótido aislado descrito a secuencias control adecuadas en uno o más vectores de expresión de insectos, y empleando un sistema de expresión de insectos. Los materiales y los procedimientos para los sistemas de expresión de células de insecto/baculovirus están disponibles en el mercado en forma de kit, por ejemplo en Invitrogen, San Diego, California, EEUU (el kit MaxBac®), y dichos procedimientos son muy conocidos en la técnica, tal como se describe en Summers y Smith, *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin* nº 1555 (1987). Las formas solubles de la proteína IL-13bc también pueden producirse en células de insecto utilizando los polinucleótidos aislados apropiados según se describió anteriormente.

Como alternativa, la proteína IL-13bc puede producirse en eucariotas inferiores, tales como levaduras, o en procariotas, tales como bacterias. Las cepas de levadura adecuadas incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, cepas de *Kluyveromyces*, *Candida*, o cualquier cepa de levadura capaz de expresar proteínas heterólogas. Las cepas bacterianas adecuadas incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, o cualquier cepa bacteriana capaz de expresar proteínas heterólogas.

La expresión en bacterias puede producir la formación de cuerpos de inclusión que incorporan la proteína recombinante. Por tanto, puede ser necesario el replegamiento de la proteína recombinante para producir el material activo o más activo. En la técnica se conocen varios procedimientos para obtener proteínas heterólogas correctamente plegadas a partir de cuerpos de inclusión bacterianos. Estos procedimientos en general implican solubilizar la proteína de los cuerpos de inclusión, y después desnaturalizar la proteína completamente utilizando un agente caotrópico. Cuando están presentes restos de cisteína en la secuencia de aminoácidos primaria de la proteína a menudo es necesario realizar el replegamiento en un entorno que permita la formación correcta de enlaces disulfuro (un sistema redox). Los procedimientos generales de replegamiento se describen en Kohno, *Meth. Enzym.*, 185:187-195 (1990). El documento EP 0433225 y la solicitud en tramitación junto con la presente USSN 08/163.877 describen otros procedimientos apropiados.

La proteína IL-13bc divulgada también puede expresarse como un producto de animales transgénicos, por ejemplo, como un componente de la leche de vacas, cabras, cerdos u ovejas transgénicas que se caracterizan por células somáticas o germinales que contienen una secuencia polinucleotídica que codifica la proteína IL-13bc.

La proteína IL-13bc divulgada puede prepararse cultivando un cultivo de células hospedantes transformadas bajo las condiciones de cultivo necesarias para expresar la proteína deseada. La proteína expresada resultante puede entonces purificarse a partir del medio de cultivo o de extractos celulares. Las formas solubles de la proteína IL-13bc pueden purificarse a partir del medio condicionado. Las formas unidas a membranas de la proteína IL-13bc pueden purificarse preparando una fracción de membranas totales a partir de las células expresoras y extrayendo las membranas con un detergente no iónico, tal como Triton X-100.

La proteína IL-13bc puede purificarse utilizando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la proteína IL-13bc de la invención puede concentrarse utilizando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Tras la etapa de

concentración, el concentrado puede aplicarse a una matriz de purificación, tal como un medio de filtración en gel. Como alternativa, puede emplearse una resina de intercambio aniónico, por ejemplo una matriz o un sustrato que tenga grupos dietilaminoetilo (DEAE) o polietilimina (PEI) colgantes. Las matrices pueden ser de acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos que se emplean habitualmente en la purificación de proteínas. Como alternativa, puede emplearse una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupo sulfopropilo o carboximetilo. Se prefieren los grupos sulfopropilo (por ejemplo, columnas de S-Sepharose®). La purificación de la proteína IL-13bc a partir del sobrenadante del cultivo también puede incluir una o más etapas en columna con resinas de afinidad, tales como concanavalina A-agarosa, Heparintoyopearl®, o Cibacrom blue 3GA Sepharose®; o mediante una cromatografía de interacción hidrófoba utilizando resinas tales como fenil éter, butil éter, o propil éter; o mediante cromatografía de inmunoafinidad. Por último, pueden emplearse una o más etapas de cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPCL) que utilizan medios RP-HPLC hidrófobos, por ejemplo gel de sílice con grupos metilo colgantes u otros grupos alifáticos, para purificar aún más la proteína IL-13bc. También pueden utilizarse columnas de afinidad que incluyen IL-13 o sus fragmentos, o que incluyen anticuerpos contra la proteína IL-13bc para la purificación según procedimientos conocidos. Algunas o todas las anteriores etapas de purificación, en diversas combinaciones o con otros procedimientos conocidos, también pueden emplearse para proporcionar una proteína recombinante aislada sustancialmente purificada. Preferiblemente, la proteína IL-13bc aislada se purifica para que esté sustancialmente exenta de otras proteínas de mamífero.

Las proteínas IL-13bc también pueden utilizarse para seleccionar agentes que sean capaces de unirse a IL-13bc o IL-13R, o que interfieran con la unión de IL-13 a IL-13 o IL-13bc (a los dominios extracelulares o intracelulares) y, por tanto, pueden actuar como inhibidores de la unión normal y de la acción de citoquinas (“inhibidores de IL-13R”). Los ensayos de unión que emplean una proteína de unión deseada, inmovilizada o no inmovilizada, son muy conocidos en la técnica y pueden utilizarse para este objetivo empleando la proteína IL-13bc de la invención. Pueden utilizarse ensayos de selección basados en proteínas (sin células) o basados en células purificadas para identificar estos agentes. Por ejemplo, la proteína IL-13bc puede inmovilizarse en forma purificada sobre un vehículo y puede medirse la unión a la proteína IL-13bc purificada en presencia y en ausencia de agentes inhibidores potenciales. Un ensayo de unión adecuado puede emplear, como alternativa, una forma soluble de la IL-13bc de la invención. Otro ejemplo de sistema en que pueden seleccionarse inhibidores se describe en el ejemplo 2 que aparece a continuación.

En dicho ensayo de selección, se forma una primera mezcla de unión combinando IL-13 o un fragmento de ésta y la proteína IL-13bc, y se mide la cantidad de unión en la primera mezcla de unión ( $B_0$ ). También se forma una segunda mezcla de unión combinando IL-13 o un fragmento de ésta, la proteína IL-13bc, y el compuesto o el agente que se va a seleccionar, y se mide la cantidad de unión en la segunda mezcla de unión (B). Se comparan las cantidades de unión en la primera y segunda mezcla de unión, por ejemplo realizando un cálculo de la proporción  $B/B_0$ . Se considera que un compuesto o un agente es capaz de inhibir la unión si se observa una disminución en la unión en la segunda mezcla de unión, comparado con la primera mezcla de unión. Opcionalmente, puede añadirse la segunda cadena de IL-13R a una o ambas mezclas de unión. La formulación y la optimización de las mezclas de unión están dentro del nivel de la técnica, y dichas mezclas de unión también pueden contener los tampones y las sales necesarios para potenciar o para optimizar la unión, y pueden incluirse más ensayos de control en el ensayo de selección.

Por tanto, pueden identificarse los compuestos que reducen la actividad de unión de la proteína IL-13bc a la IL-13 o a su fragmento en cualquier grado, preferiblemente en al menos aproximadamente 10%, más preferiblemente más de aproximadamente 50% o mayor, y después pueden volver a seleccionarse en otros ensayos de unión y en ensayos *in vivo*. Mediante estos medios pueden identificarse los compuestos que tienen actividad inhibidora de la unión de IL-13bc que puedan ser adecuados como agentes terapéuticos.

Las proteínas IL-13bc, y los polinucleótidos que las codifican, también pueden utilizarse como agentes de diagnóstico para detectar la expresión o la presencia de IL-13bc, IL-13R, IL-13 o células que expresan IL-13bc, IL-13R o IL-13. Las proteínas o los polinucleótidos pueden emplearse para estos objetivos en procedimientos convencionales para ensayos de diagnóstico utilizando estos tipos de materiales. Los procedimientos adecuados son muy conocidos por los expertos en la técnica.

Tal como se emplea en la presente, “IL-13R” se refiere a IL-13bc y/o una segunda cadena del receptor de IL-13 conocida como “IL-13R $\alpha$ 1” o “NR4” (véase, cadena del receptor murino, Hilton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93:497-501; cadena del receptor humano, Aman et al., J. Biol. Chem., 1996, 271:29265-29270, y Gauchat et al., Eur. J. Immunol., 1997, 27:971-978).

La IL-13bc actúa como mediador de las actividades biológicas conocidas de IL-13. Como resultado, la proteína IL-13bc (en particular, las proteínas IL-13bc solubles), y los inhibidores de IL-13R (es decir, los antagonistas de la interacción de IL-13 con IL-13R (tales como, por ejemplo, anticuerpos contra IL-13R (incluyendo, en particular, contra IL-13bc o contra IL-13R $\alpha$ 1) y sus fragmentos, anticuerpos contra IL-13 y sus fragmentos, proteínas IL-13R $\alpha$ 1 solubles, e inhibidores de molécula pequeña y otros inhibidores de la interacción de IL-13 con IL-13R (incluyendo con IL-13bc y/o con IL-13R $\alpha$ 1))) pueden ser útiles para el tratamiento o la modulación de diversos trastornos médicos en los que esté implicada la IL-13 o que son afectados por la actividad (o por la falta de actividad) de la IL-13 (de modo colectivo "trastornos relacionados con IL-13"). Las formas mutadas de IL-4 que se unen a IL-3R también pueden utilizarse como antagonistas de IL-13 (véanse, por ejemplo, las divulgadas en Shanafelt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95:9454-9458; Aversa et al., J. Exp. Med., 1993, 178:2213-2218; y Grunewald et al., J. Immunol., 1998, 160:4004-4009).

Los trastornos relacionados con IL-13 incluyen, sin limitación, trastornos y enfermedades mediados por Ig, en particular trastornos mediados por IgE (que incluyen, sin limitación, atopía, trastornos alérgicos, asma, enfermedades del complejo inmunológico (tales como, por ejemplo, lupus, síndrome nefrótico, nefritis, glomerulonefritis, tiroiditis y enfermedad de Grave)); trastornos inflamatorios de los pulmones; deficiencias inmunológicas, de modo específico deficiencias en las células progenitoras hematopoyéticas, o trastornos relacionados con éstas; cáncer y otras enfermedades. Estos estados patológicos pueden ser el resultado de una enfermedad, de la exposición a radiación o a fármacos, e incluyen, por ejemplo, leucopenia, infecciones bacterianas y víricas, anemia, deficiencias en células B o células T, tales como deficiencia en células inmunológicas o en células hematopoyéticas tras un trasplante de médula ósea. Puesto que la IL-13 inhibe la activación de macrófagos, las proteínas IL-13bc también pueden ser útiles para potenciar la activación de macrófagos (es decir, en la vacunación, el tratamiento de organismos micobacterianos o intracelulares, o infecciones parasitarias).

Las proteínas IL-13bc también pueden utilizarse para potenciar los efectos de la IL-13 *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, una proteína IL-13bc puede combinarse con una proteína que tenga actividad IL-13 (preferiblemente IL-13) y la combinación resultante puede ponerse en contacto con una célula que exprese al menos una cadena de IL-13R distinta de IL-13bc (preferiblemente todas las cadenas de IL-13R distintas de IL-13bc, tales como IL-13R $\alpha$ 1). Preferiblemente, la etapa de contacto se realiza administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha combinación a un sujeto mamífero *in vivo*. La asociación preestablecida de la proteína IL-13 con la proteína IL-13bc ayudará a la formación del complejo de IL-13/ IL-13R completo necesario para una señalización adecuada. Véanse, por ejemplo, los procedimientos descritos por Economides et al., Science, 270:1351 (1995).

La proteína IL-13bc y los inhibidores de IL-13R, purificados a partir de células o producidos de modo recombinante, pueden utilizarse como composición farmacéutica cuando se combinan con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dicha composición puede contener, además de la IL-13bc o el inhibidor y el vehículo, diversos diluyentes, cargas, sales, tampones, estabilizantes, solubilizantes y otros materiales muy conocidos en la técnica. La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente o ingredientes activos. Las características del vehículo dependerán de la vía de administración.

La composición farmacéutica puede contener también citoquinas, linfocinas u otros factores hematopoyéticos, tales como M-CSF, GM-CSF, interleucinas (tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4... IL-24, IL-25), G-CSF, factor de células pluripotenciales, y eritropoyetina. La composición farmacéutica también puede incluir anticuerpos anticitoquinas. La composición farmacéutica también puede contener otros agentes antiinflamatorios. Estos otros factores y/o agentes pueden incluirse en la composición farmacéutica para producir un efecto sinérgico con la proteína IL-13bc o el inhibidor de IL-13bc aislados, o para minimizar los efectos secundarios provocados por la IL-13bc o por el inhibidor de IL-13bc aislados. A la inversa, la IL-13bc o el inhibidor de IL-13bc aislados pueden incluirse en formulaciones de la citoquina, linfocina, otro factor hematopoyético, factor trombolítico o antitrombótico, o agente antiinflamatorio concretos para minimizar los efectos secundarios de la citoquina, linfocina, otro factor hematopoyético, factor trombolítico o antitrombótico, o agente antiinflamatorio.

La composición farmacéutica de la invención puede estar en forma de un liposoma en que se combina la proteína IL-13bc o el inhibidor de IL-13bc aislados, además de otros vehículos farmacéuticamente aceptables, con agentes anfipáticos, tales como lípidos que existen en forma agregada como micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos, o capas laminares en disolución acuosa. Los lípidos adecuados para la formulación liposómica incluyen, sin limitación, monoglicéridos, diglicéridos, sulfatadas, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares, y similares. La preparación de dichas formulaciones liposómicas está dentro de la técnica y se divulga, por ejemplo, en la patente de EEUU nº 4.235.871; la patente de EEUU nº 4.501.728; la patente de EEUU nº 4.837.028; y la patente de EEUU nº 4.737.323.

5 Tal como se emplea en la presente, la expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” significa la cantidad total de cada componente activo en la composición farmacéutica o procedimiento que es suficiente para mostrar un beneficio valioso para el paciente, por ejemplo una mejoría de los síntomas, la curación, o el aumento en la velocidad de curación de dichos trastornos. Cuando se aplica a un ingrediente activo individual, administrado por sí solo, la expresión se refiere a este ingrediente solo. Cuando se aplica a una combinación, la expresión se refiere a las cantidades combinadas de los ingredientes activos que producen el efecto terapéutico, tanto si se administran en combinación, en serie o de modo simultáneo.

10 En la práctica del procedimiento de tratamiento o uso de la presente invención, una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína IL-13bc o del inhibidor de IL-13bc aislados se administra a un mamífero. La proteína IL-13bc o el inhibidor de IL-13bc aislados pueden administrarse según el procedimiento de la invención por sí solos o en combinación con otras terapias, tales como tratamientos que emplean citoquinas, linfoquinas u otros factores hematopoyéticos. Cuando se coadministran con una o más citoquinas, linfoquinas u otros factores hematopoyéticos, la proteína IL-13bc o el inhibidor de IL-13bc pueden administrarse de modo simultáneo con la citoquina o citoquinas, la linfoquina o linfoquinas, el otro factor o factores hematopoyéticos, los factores trombolíticos o antitrombóticos, o de modo secuencial. Si se administran de modo secuencial, el médico encargado decidirá la secuencia apropiada para administrar la proteína IL-13bc o el inhibidor de IL-13bc en combinación con la citoquina o citoquinas, la linfoquina o linfoquinas, el otro factor o factores hematopoyéticos, y los factores trombolíticos o antitrombóticos.

15 La administración de la proteína IL-13bc o del inhibidor de IL-13bc utilizado en la composición farmacéutica o en la práctica del procedimiento descrito puede realizarse mediante una diversidad de formas convencionales, tales como la ingestión oral, la inhalación, o la inyección cutánea, subcutánea o intravenosa. Se prefiere la administración intravenosa al paciente.

20 Cuando se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína IL-13bc o del inhibidor de IL-13bc por vía oral, la proteína IL-13bc o el inhibidor de IL-13bc estará en forma de un comprimido, cápsula, polvo, disolución o elixir. Cuando se administra en forma de comprimidos, la composición farmacéutica de la invención puede contener también un vehículo sólido, tal como gelatina o un adyuvante. El comprimido, cápsula y polvo contienen de aproximadamente 5% al 95% de proteína IL-13bc o inhibidor de IL-13bc, y preferiblemente de aproximadamente 25% al 90% de proteína IL-13bc o inhibidor de IL-13bc. Cuando se administra en forma líquida, puede añadirse un vehículo líquido, tal como agua, petróleo, aceites de origen animal o vegetal, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite mineral, aceite de soja, o aceite de sésamo, o aceites sintéticos. La forma líquida de la composición farmacéutica también puede contener disolución salina fisiológica, dextrosa u otra disolución de sacáridos, o glicoles, tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Cuando se administra en forma líquida, la composición farmacéutica contiene de aproximadamente 0,5% al 90% en peso de proteína IL-13bc o inhibidor de IL-13bc, y preferiblemente de aproximadamente 1% al 50% de proteína IL-13bc o inhibidor de IL-13bc.

35 Cuando se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína IL-13bc o del inhibidor de IL-13bc mediante inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, la proteína IL-13bc o el inhibidor de IL-13bc estará en forma de una disolución acuosa parenteralmente aceptable y apirógena. La preparación de dichas disoluciones de proteínas parenteralmente aceptables, teniendo en cuenta el pH, la isotonicidad, la estabilidad y similares, está dentro de la técnica. Una composición farmacéutica preferida para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea debería contener, además de la proteína IL-13bc o el inhibidor de IL-13bc, un vehículo isotónico, tal como cloruro de sodio para inyección, disolución de Ringer para inyección, dextrosa para inyección, dextrosa y cloruro de sodio para inyección, disolución de Ringer lactada para inyección, u otro vehículo conocido en la técnica. La composición farmacéutica de la presente invención también puede contener estabilizantes, conservantes, tampones, antioxidantes u otros aditivos muy conocidos por los expertos en la técnica.

45 La cantidad de proteína IL-13bc o inhibidor de IL-13bc en la composición farmacéutica de la presente invención dependerá de la naturaleza y la gravedad del trastorno que se está tratando, y de la naturaleza de los tratamientos anteriores a los que se ha sometido el paciente. En último término, el médico encargado decidirá la cantidad de proteína IL-13bc o de inhibidor de IL-13bc con la que tratar a cada paciente individual. En un principio, el médico encargado administrará dosis bajas de proteína IL-13bc o de inhibidor de IL-13bc, y observará la respuesta del paciente. Pueden administrarse dosis mayores de la proteína IL-13bc o del inhibidor de IL-13bc hasta que se obtiene el efecto terapéutico óptimo para el paciente, y en este momento en general la dosificación no aumenta más. Se contempla que las diversas composiciones farmacéuticas utilizadas en la práctica del procedimiento de la presente invención deberían contener de 0,1 µg a 100 mg (preferiblemente de 20 µg a 500 µg) de la proteína IL-13bc o del inhibidor de IL-13bc por kg de peso corporal.

5 La duración de la terapia intravenosa utilizando la composición farmacéutica de la presente invención variará dependiendo de la gravedad de la enfermedad que se está tratando y de la condición y respuesta idiosincrásica potencial de cada paciente individual. Se contempla que la duración de cada aplicación de la proteína IL-13bc o del inhibidor de IL-13bc estará en el intervalo de 12 a 24 horas de administración intravenosa continua. En último término, el médico encargado decidirá la duración apropiada de la terapia intravenosa utilizando la composición farmacéutica descrita en la presente.

10 Las proteínas IL-13bc también pueden utilizarse para inmunizar animales para obtener anticuerpos policlonales y monoclonales que reaccionen de modo específico con la proteína IL-13bc y que puedan inhibir la unión de la IL-13 o de sus fragmentos al receptor. Dichos anticuerpos pueden obtenerse utilizando la IL-13bc completa como inmunógeno, o utilizando fragmentos de la IL-13bc, tales como la forma madura soluble de IL-13bc. También pueden utilizarse fragmentos más pequeños de la IL-13bc para inmunizar animales. Los inmunógenos peptídicos también pueden contener un resto cisteína en el carboxilo terminal, y se conjugan con un hapteno, tal como hemocianina de lapa (KLH). Pueden generarse otros inmunógenos peptídicos sustituyendo los restos tirosina por restos tirosina sulfatados. Los procedimientos para sintetizar dichos péptidos son conocidos en la técnica, por ejemplo, en R.P. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc., 85, 2149-2154 (1963); J.L. Krstenansky, et al., FEBS Lett., 211, 10 (1987).

Los anticuerpos neutralizantes o no neutralizantes (preferiblemente anticuerpos monoclonales) que se unan a la proteína IL-13bc también pueden ser productos terapéuticos útiles para ciertos tumores y también para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. Estos anticuerpos monoclonales neutralizantes pueden ser capaces de bloquear la unión de la IL-13 a IL-13bc.

## 20 **Ejemplo 1**

### Aislamiento de ADNc de IL-13bc

#### Aislamiento de la cadena del receptor de IL-13 murino

25 Se prepararon 5 ug de ARN poliA+ a partir del timo de ratones C3H/HeJ de 6-8 semanas de edad. Se preparó el ADNc bicatenario hemimetilado utilizando el kit de síntesis de ADNc de Stratagene según las instrucciones del fabricante. Brevemente, la primera hebra se cebó con un cebador oligoT-Xho, y después de la síntesis de la segunda hebra se añadieron adaptadores EcoRI, y el ADNc se digirió con XhoI y se purificó. El ADNc se acopló a los sitios XhoI-EcoRI del vector lambda Zap Express (Stratagene) y se empaquetó utilizando extractos de empaquetado Gigapak III Gold (Stratagene) según las instrucciones del fabricante. Un banco de  $1,5 \times 10^6$  fagos recombinantes resultantes se amplificó según las instrucciones del fabricante. Este banco se seleccionó con una sonda oligonucleotídica 17-mera degenerada con la secuencia KSRCTCCABKCRCTCCA (SEQ ID NO:5) (K = G+T; S = C+G; R = A+G; B = C+G+T) utilizando condiciones de hibridación TMAC convencionales según se describe (Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, et al., editores, John Wiley and Sons, 1995, sección 6.4.3). Se identificó el clon A25 porque se hibrida con la sonda 17-mera pero no con las sondas derivadas de receptores de hematopoyetina conocidos. Este clon se aisló en forma de plásmido del vector ZapExpress según las instrucciones del fabricante, y se determinó la secuencia de ADN. La secuencia de ADN codifica un miembro nuevo de la familia de receptores de hematopoyetina.

El clon A25 que contiene el polinucleótido que tiene la secuencia de SEQ ID NO:1 se depositó en ATCC como pA25pBKCMV con el nº de registro 69997, el 22 de febrero, 1996.

#### Aislamiento de la cadena del receptor de IL-13 humano

40 Se aisló un fragmento parcial del homólogo humano del receptor murino mediante PCR utilizando oligonucleótidos derivados de la secuencia murina. Se preparó ADNc a partir del ARN poliA+ de testículo humano que se obtuvo en Clontech. Se amplificó un fragmento de ADN de 274 pares de bases a partir de este ADNc mediante PCR con los siguientes oligonucleótidos: ATAGTTAAACCATTGCCACC (SEQ ID NO:6) y CTCCATTGCTCCAAATTCC (SEQ ID NO:7) utilizando la polimerasa AmpliTaq (Promega) en 1x tampón Taq que contenía  $MgCl_2$  1,5 mM durante 30 ciclos de incubación (94 °C x 1 minuto, 42 °C durante 1 minuto, y 72 °C durante 1 minuto). Se determinó la secuencia de ADN de este fragmento y se prepararon dos oligonucleótidos a partir de una porción interna de este fragmento con la siguiente secuencia: AGTCTATCTTACTTTTACTCG (SEQ ID NO:8) y CATCTGAGCAATAAATATTAC (SEQ ID NO:9). Estos oligonucleótidos se utilizaron como sondas para seleccionar un banco de ADNc de testículo humano adquirido en CLONTECH (nº de catálogo HL1161). Los filtros se hibridaron a 52 °C utilizando condiciones de hibridación convencionales 5x SSC y se lavaron en 2x SSC a 52 °C. Se aislaron 21 clones que se hibridaban con ambos oligonucleótidos en una selección de 400.000 clones. Se determinó la secuencia de ADN de cuatro de los

clones de ADNc, y todos codificaban el mismo receptor de hematopoyetina nuevo. La secuencia de ADN predicha de la cadena del receptor humano de longitud completa se muestra en SEQ ID NO:3.

El clon humano se depositó en ATCC como pH25#11pDR2 con el nº de registro 69998, el 22 de febrero, 1996.

## Ejemplo 2

### 5 Expresión de la proteína IL-13bc soluble y ensayo de actividad

#### Producción y purificación de la IL-13bc-Ig soluble

10 Se condensó ADN que codifica los aminoácidos 1-331 del dominio extracelular de la IL-13bc murina con una secuencia espaciadora que codifica Gly-Ser-Gly mediante PCR y se acopló dentro del marco con secuencias que codifican las regiones bisagra CH2 y CH3 de la IgG 1 humana del vector de expresión de COS-1 pED.Fc. Se produjo IL-13bc-IgG a partir de células COS-1 transfectadas con DEAE-dextrano y se purificó mediante una cromatografía de proteína A-Sepharose (Pharmacia).

#### Ensayo de proliferación de B9

15 La estimulación de la proliferación de células B9 (Aarden et al., Eur. J. Immunol., 1987. 17:1411-1416) en respuesta a IL-13 o IL-4 se midió mediante la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina al ADN. Se sembraron células (5 x 10<sup>3</sup>/pocillo) en placas de 96 pocillos con medio que contenía factores del crecimiento en concentraciones variables en presencia o en ausencia de IL-13bc-Ig a 1 ug/ml. Después de una incubación durante 3 días se añadió 1 uCi/pocillo de <sup>3</sup>H-timidina y las células se incubaron durante 4 horas más. Se determinó la radiactividad incorporada utilizando un lector de placas LKB 1205.

20 La línea celular B9 proliferó en respuesta a IL-13, IL-4 o IL-6. Sólo las respuestas a IL-13 fueron inhibidas por la IL-13bc-Ig soluble, lo cual indica que este receptor se une a IL-13 de modo específico, pero no a IL-4 ni a IL-6. Las tablas muestran las cpm. Se muestran dos experimentos distintos.

Tabla I

Dilución de citoquinas	IL-13 (3 ng/ml)	IL-13 más A25-Fc (1 ug/ml)	IL-4 (20 ng/ml)	IL-4 más A25-Fc (1 ug/ml)	Cos IL-6 (1/10.000)
1	37734	1943	6443	6945	37887
1/3	30398	1571	2680	2442	36500
1/10	16101	1461	1767	1771	33335
1/30	2148	1567	1619	1783	27271
1/100	1574	1419	1522	1576	18831
1/300	1512	1531	1373	1577	7768
1/1000	1316	1392	1190	1474	2760
1/3000	1834	1994	1482	1819	1672

Tabla II

Dilución de citoquinas	IL-13 (3 ng/ml)	IL-13 más A25-Fc (5 ug/ml)	IL-4 (20 ng/ml)	IL-4 más A25-Fc (5 ug/ml)	Cos IL-6 (1/10.000)	Cos IL-6 más A25-Fc (5 ug/ml)
1	6413	295	1216	1158	6969	7703
1/3	5432	281	518	656	7827	8804
1/10	2051	281	489	520	8345	10027
1/30	506	319	279	476	8680	9114
1/100	430	372	288	423	7426	10364
1/300	330	287	323	420	5531	6254
1/1000	326	389	348	nt	2524	nt
sin citoquinas	339	279	404	394	326	279

### Ejemplo 3

#### Unión directa de IL-13bc soluble a IL-13 medida mediante resonancia de plasmón de superficie (análisis Biacore)

- 5 Se empleó un biodetector Biacore para medir directamente la unión específica de IL-13 a la IL-13bc-Ig purificada (Pharmacia, Johnsson et al., 1991). Aproximadamente de 10.000 a 17.000 unidades de resonancia (UR) de IL-13bc-Ig, IgG1 humana o receptor irrelevante purificados se inmovilizaron cada uno de modo covalente a diferentes células de flujo sobre el chip detector según recomienda el fabricante (las UR son un reflejo de la masa de proteína unida a la superficie del chip detector). La IL-13 purificada se inyectó a través de las células de flujo a 5 ul/min durante 10 min en presencia o en ausencia de un exceso de IL-13bc-Ig purificada. La unión se cuantificó como la diferencia en UR antes y después de la inyección de la muestra. Se observó una unión de IL-13 específica de 481,9 UR sólo para la IL-13bc-Ig inmovilizada, mientras que la coinyección de IL-13 más IL-13bc-Ig no produjo unión a la IL-13bc-Ig inmovilizada (4 UR). No se observó unión de IL-13 para la IgG o IL-11R-Ig inmovilizadas (5,4 y 3,7 UR, respectivamente).

Muestra	IL-13bc-Ig (10.383 UR)	IgG control (13.399 UR)	IL-11R-Ig (17.182 UR)
IL-13 humana 100 ng/ml	481,9 UR unidas	5,4 UR unidas	3,7 UR unidas
IL-13 humana 100 ng/ml + IL-13bc-Ig soluble	4,0 UR unidas	no ensayado	no ensayado

15

**Ejemplo 4**La unión de IL-13 expresada en células COS a la proteína de fusión IL-13bc-Ig marcada: detección *in situ* en COS de IL-13 con IL-13bc-Fc

5 Se transfectaron vectores de expresión para IL-13, IL-4, IL-11 o un vector vacío en células COS-1 en placas por duplicado mediante el procedimiento de DEAE-dextrano. Dos días después de la transfección, las células se lavaron dos veces en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) y se fijaron en la placa de cultivo durante 10 min a 4 °C con metanol. Tras la fijación, las células se lavaron dos veces con PBS, después se enjuagaron una vez con tampón de unión (PBS, albúmina de suero bovina al 1% (en p/v), azida de sodio al 1% (en p/v)) y se incubaron durante dos horas a 4 °C en tampón de unión con IL-13bc-Fc a 1,0 ug/ml o con el antisuero anticitoquinas pertinente. Las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron a 4 °C con agitación en F(ab)2' de conejo anti-IgG humana marcada con fosfatasa alcalina diluido 1:500 en tampón de unión (para la detección de la fusión de Fc) o F(ab)2' de conejo anti-IgG de rata (para la detección de anticitoquinas). Las células de nuevo se lavaron dos veces en PBS. Se visualizó la actividad fosfatasa alcalina utilizando nitrozul de tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato.

La unión específica se visualizó al microscopio. Sólo las células tranfectadas con IL-13 mostraron una unión específica a IL-13bc-Ig (véase la fotografía de las células tranfectadas en la figura).

**15 Ejemplo 5**Otros sistemas para determinar la actividad biológica de la proteína IL-13bc

Pueden utilizarse otros sistemas para determinar si una proteína IL-13bc específica muestra una "actividad biológica" de IL-13bc tal como se define en la presente. A continuación se ofrecen ejemplos de dichos sistemas.

Ensayos para la unión de IL-13

20 Puede determinarse la capacidad de una proteína IL-13bc para unirse a IL-13 o a un fragmento de ésta mediante cualquier ensayo adecuado que pueda detectar dicha unión. A continuación se ofrecen algunos ejemplos adecuados.

La unión de la IL-13 a la región extracelular de la proteína IL-13bc provoca de modo específico una inducción rápida de la fosfotirosina sobre la proteína del receptor. A continuación se describen ensayos para la actividad de unión al ligando, según se mide mediante la inducción de la fosforilación.

25 Como alternativa, una proteína IL-13bc (tal como, por ejemplo, una forma soluble del dominio extracelular) se produce y se emplea para detectar la unión a IL-13. Por ejemplo, se prepara una construcción de ADN en la que el dominio extracelular (truncado antes, preferiblemente inmediatamente antes del dominio transmembrana predicho) está ligado dentro del marco a un ADNc que codifica los dominios bisagra C<sub>H</sub>2 y C<sub>H</sub>3 de una inmunoglobulina humana (Ig)  $\gamma$ 1. Esta construcción se genera en un vector de expresión apropiado para células COS, tal como pED $\Delta$ C o pMT2. El plásmido se tranfecta de modo transitorio en células COS. La proteína de fusión de IL-13bc-Ig segregada se recoge en el medio condicionado y se purifica mediante una cromatografía de proteína A.

35 La proteína de fusión de IL-13bc-Ig purificada se utiliza para demostrar la unión de IL-13 en una serie de aplicaciones. La IL-13 puede revestirse sobre la superficie de una placa de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), y después se bloquean los sitios de unión adicionales con albúmina de suero bovina o caseína utilizando tampones ELISA convencionales. La proteína de fusión de IL-13bc-Ig después se une a la IL-13 en fase sólida, y se detecta la unión con un anti-Ig humana de cabra secundario conjugado con peroxidasa de rábano. La actividad de la enzima unida de modo específico puede medirse con un sustrato colorimétrico, tal como tetrametilbenzidina y lecturas de absorbancia.

40 La IL-13 también puede expresarse sobre la superficie de células, por ejemplo proporcionando un dominio transmembrana o un enlace glucosilfosfatidilinositol (GPI). Las células que expresan la IL-13 unida a la membrana pueden identificarse utilizando la proteína de fusión de IL-13bc-Ig. La fusión de IL-13bc-Ig soluble se une a la superficie de estas células y se detecta con anti-Ig humana de cabra conjugado con un fluorocromo, tal como isotiocianato de fluoresceína y citometría de flujo.



Trampa de interacción

Puede utilizarse un procedimiento de selección genética de levaduras, la “trampa de interacción” (Gyuris et al., Cell, 75:791-803, 1993) para determinar si una proteína IL-13bc tiene una actividad biológica de IL-13bc según se define en la presente. En este sistema, la expresión de genes indicadores de LewAop-Leu2 y LexAop-LacZ se basa en la interacción entre la proteína cebo, por ejemplo en este caso una especie que interacciona con la IL-13bc humana, y la presa, por ejemplo en este caso la proteína IL-13bc humana. Por tanto, se puede medir la fuerza de la interacción mediante el nivel de expresión de Leu2 o LacZ. El procedimiento más sencillo es medir la actividad de la proteína codificada por LacZ,  $\beta$ -galactosidasa. Esta actividad puede juzgarse mediante el grado de color azul sobre el filtro o en el medio que contiene X-Gal. Para la medición cuantitativa de la actividad  $\beta$ -galactosidasa, pueden encontrarse ensayos convencionales en "Methods in Yeast Genetics", Cold Spring Harbor, Nueva York, 1990 (de Rose, M.D., Winston, F., y Hieter, P.).

En dichos procedimientos, si se desea determinar si la proteína IL-13bc interacciona con una especie concreta (tal como, por ejemplo, una proteína citosólica que se une al dominio intracelular de la IL-13bc *in vivo*), esta especie puede utilizarse como “cebo” en la trampa de interacción, actuando la proteína IL-13bc que se va a ensayar como “presa”, o viceversa.

15 **Ejemplo 6**Inhibición de la fibrosis utilizando IL-13R soluble

El desarrollo de tejido fibroso es parte del proceso normal de curación después de una lesión. No obstante, en algunas circunstancias se produce una acumulación destructiva de un exceso de colágeno que interfiere con la función normal del tejido afectado. En efecto, la síntesis de colágeno y la formación de escaras en tejidos son las manifestaciones patológicas principales de una serie de enfermedades crónicas y debilitantes, incluyendo varias enfermedades autoinmunitarias, alérgicas e infecciosas<sup>1-7</sup>. Aunque existe una gran cantidad de información mecanística con respecto al proceso de la formación de tejido de escara<sup>8,9</sup>, sigue habiendo grandes huecos en nuestra comprensión del papel de las citoquinas y de las células inflamatorias en el comienzo del proceso fibrótico.

Tal como se emplea en la presente, “fibrosis” incluye cualquier trastorno que implique la formación de tejido fibroso (tanto si dicha formación es deseable o indeseable). Dichos trastornos incluyen, sin limitación, fibrositis, formación de fibromas (fibromatosis), fibrogénesis (incluyendo fibrogénesis pulmonar), fibroelastosis (incluyendo fibroelastosis endocárdica), formación de fibromiomas, anquilosis fibrosa, formación de fibroides, formación de fibroadenomas, formación de fibromixomas, y fibrocistitis (incluyendo fibrosis quística).

El complejo del receptor de IL-13 está compuesto por al menos tres componentes diferenciados, que incluyen el receptor de IL-4, la cadena IL-13R $\alpha$ 1 de unión de baja afinidad, y la cadena de unión de alta afinidad IL-13R $\alpha$ 2<sup>35,42-44</sup>. En fechas recientes se ha preparado una proteína de fusión de IL-13R $\alpha$ 2-Fc y se ha utilizado con éxito para neutralizar la IL-13 *in vitro*<sup>35</sup> e *in vivo*<sup>30,39-41</sup>. Puesto que la proteína de fusión se une a IL-13 con alta afinidad pero no neutraliza la IL-4, la proteína proporciona una herramienta excelente para determinar los papeles específicos de la IL-13. En el presente estudio, los inventores utilizaron el antagonista de IL-13 en ratones de tipo salvaje y deficientes en IL-4 para analizar minuciosamente las contribuciones de IL-13 e IL-4 en el desarrollo de la fibrosis hepática en la esquistosomiasis murina. En estos estudios, se estudió en detalle la formación de granulomas, centrándose en el reclutamiento de eosinófilos y células cebadas y, de modo más importante, se cuantificó el desarrollo de la fibrosis inducida por los huevos utilizando técnicas bioquímicas, histológicas y moleculares. También se estudiaron las contribuciones de IL-4 e IL-13 en la regulación de las respuestas de citoquinas de tipo Th1/Th2 *in vitro*, en cultivos de nódulos linfáticos mesentéricos e, *in vivo*, en hígados granulomatosos. Aunque los resultados de este estudio demuestran que IL-13 e IL-4 muestran algunas actividades redundantes en la patogénesis de la esquistosomiasis, también se aclararon totalmente funciones diferenciadas para ambas citoquinas. Probablemente, el descubrimiento más importante y novedoso fue la observación de que era la IL-13, y no la IL-4, la principal citoquina de tipo Th2 que conduce la producción de ARNm de colágeno de tipo I y de tipo III y la fibrosis hepática en ratones infectados. Por tanto, los descubrimientos de los inventores establecen que un inhibidor/antagonista de IL-13, tal como sIL-13R $\alpha$ 2-Fc, puede tener un beneficio terapéutico para prevenir la fibrosis, tal como, por ejemplo, la asociada con una enfermedad infecciosa crónica.

## RESULTADOS

**Efecto comparativo de la deficiencia en IL-4, IL-13 o IL-4/IL-13 doble en la patogénesis de la esquistosomiasis: un tratamiento con sIL-13R $\alpha$ 2-Fc reduce significativamente la fibrosis hepática en ratones infectados con *S. mansoni***

5 Para comparar los papeles reguladores de la IL-4 y de la IL-3 en la patogénesis de la esquistosomiasis, los inventores infectaron ratones C57BL/6 de tipo salvaje y ratones deficientes en IL-4 por vía percutánea con 25 cercarias de *S. mansoni*. Grupos separados de animales se trataron con sIL-13R $\alpha$ 2-Fc o con control-Fc, según se describe en "Materiales y procedimientos". Los tratamientos comenzaron en la semana 5, al comienzo de la puesta de huevos, y todos los animales se sacrificaron 8 semanas después de la infección y se estudiaron para determinar diversos parámetros parasitológicos e inmunológicos. Tal como se muestra en la tabla III, los cuatro grupos de animales albergaban cargas de lombrices similares, y los huevos en los tejidos producidos por pareja de lombrices no variaron entre los grupos. A las 8 semanas después de la infección, que es el tiempo de la respuesta pico tisular<sup>45</sup>, los ratones de tipo salvaje no mostraron cambios significativos en el tamaño de los granulomas como resultado del bloqueo de la IL-13 (figura 2A). De manera interesante, los ratones deficientes en IL-4 tratados con control-Fc tampoco mostraron una respuesta granulomatosa reducida y, de hecho, los granulomas fueron significativamente más grandes en estos ratones. En notable contraste con estas observaciones, los ratones deficientes en IL-4 mostraron una respuesta granulomatosa marcadamente reducida cuando se inhibió la IL-13 (figura 2A, derecha). En efecto, los ratones doblemente deficientes en IL-4/tratados con sIL-13R $\alpha$ 2-Fc mostraron una media de reducción del 40% al 50% en el volumen de los granulomas cuando se comparan con los animales control o tratados con sIL-13R $\alpha$ 2-Fc de tipo salvaje, y una reducción de más del 75% cuando se comparan con los ratones deficientes en IL-4 tratados con control-Fc.

La composición celular de las lesiones también se evaluó en secciones de hígado teñidas con Giemsa y, tal como se muestra en la tabla III, los ratones deficientes en IL-4 mostraron una marcada reducción en las células cebadas asociadas con los granulomas. En contraste, no se produjeron cambios en el número de células cebadas cuando se inhibió sólo la IL-13, y el bloqueo de la IL-13 no produjo efectos adicionales sobre el número de células cebadas, ya muy reducido, en ratones deficientes en IL-4. Se observaron resultados algo similares, pero diferenciados, cuando se evaluaron los eosinófilos asociados a granulomas (figura 2B). En este caso, el número de eosinófilos aumentó desde 46% al 64% en ratones de tipo salvaje por el bloqueo de la IL-13, y disminuyó significativamente (28%) como consecuencia de la deficiencia en IL-4. A pesar de los aparentes papeles opuestos de la IL-13 y la IL-4 en la eosinofilia de tejidos, se observó un efecto inhibitorio combinado aún más sorprendente cuando los ratones deficientes en IL-4 fueron tratados con el inhibidor de IL-13. En estos ratones, el número medio de eosinófilos de granulomas era menor que 10%. Por último, no hubo cambios en el grado de necrosis hepática parenquimática o asociada a huevos en los animales de tipo salvaje frente a los animales deficientes en IL-4, mientras que los grupos deficientes en IL-4 y de tipo salvaje tratado con sIL-13R $\alpha$ 2-Fc mostraron marcadas reducciones en la necrosis parenquimática global.

Quizás de modo más importante, el tratamiento sólo con sIL-13R $\alpha$ 2-Fc redujo significativamente el contenido en colágeno de los granulomas hepáticos en ratones de tipo salvaje, según se evaluó en secciones de tejido teñidas con rojo de picosirius (tabla III y figura 3). En contraste, los ratones deficientes en IL-4 infectados no mostraron cambios detectables en el depósito de colágeno en los granulomas mediante un análisis microscópico. De manera interesante, parece que no existe un papel combinado o sinérgico para la IL-13 y la IL-4 en este parámetro, puesto que no había diferencias significativas entre los ratones de tipo salvaje tratados con sIL-13R $\alpha$ 2-Fc y los ratones deficientes en IL-4 (tabla III). La figura 3 demuestra que aunque se encontró un número similar de lombrices, de carga de huevos en los tejidos, y de tamaño de los granulomas en los ratones control y en los ratones de tipo salvaje tratados con sIL-13R $\alpha$ 2-Fc, el bloqueo de IL-13 tiene un efecto inhibitorio sustancial sobre el depósito de colágeno dentro del hígado. Por último, el grado de fibrosis hepática también se midió mediante la evaluación de los niveles de hidroxiprolina (figura 2C), que es más cuantitativo que las técnicas histológicas descritas anteriormente. El antagonista de IL-13 soluble por sí solo disminuyó en gran medida los niveles de hidroxiprolina hepática, mientras que la deficiencia en IL-4 produjo una reducción menos significativa. La deficiencia dual de IL-4/IL-13 no redujo los niveles de hidroxiprolina por debajo de los ya observados en los ratones de tipo salvaje tratados con sIL-13R $\alpha$ 2-Fc (figura 2C), aunque en el segundo estudio se observó una ligera tendencia (no significativa). Juntos, estos datos demuestran que la IL-13 es la citoquina asociada a Th2 dominante responsable del desarrollo de la fibrosis hepática en la esquistosomiasis murina.

**La producción de citoquinas de tipo Th2 se reduce en ratones deficientes en IL-4 pero permanece igual por la inhibición de la IL-13**

Aunque se sabe que la IL-4 es la principal citoquina que dirige el desarrollo celular Th2 de CD4<sup>+</sup> 21,22, el papel de la IL-13 en la generación y el mantenimiento de las respuestas de tipo Th2 ha sido controvertido y puede verse influido por la genética del hospedante y por el modelo de enfermedad infecciosa en estudio<sup>30,34,38</sup>. Por tanto, para determinar si los cambios inducidos por sIL-13R $\alpha$ 2-Fc en la patología hepática fueron generados por alteraciones en el equilibrio de citoquinas Th1/Th2, los inventores aislaron nódulos linfáticos mesentéricos y bazo de ratones infectados, prepararon suspensiones de células individuales, y reestimularon los cultivos *in vitro* con antígenos del parásito. Otros cultivos celulares se expusieron a antígenos del parásito en presencia de mAb anti-CD4 para determinar si la producción de citoquinas depende de una respuesta de células T CD4<sup>+</sup>. Los sobrenadantes de los cultivos se analizaron mediante ELISA para IL-4, IL-13, IL-5, IL-10 e IFN- $\gamma$ . Tal como podría predecirse<sup>15</sup>, los cultivos mesentéricos (figura 5) y esplénicos (los datos no se muestran) preparados a partir de ratones de tipo salvaje mostraron una respuesta de citoquinas de tipo Th2 muy polarizada. Produjeron niveles altos de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 en respuesta a una estimulación con SEA, y produjeron poco o no produjeron IFN- $\gamma$ . En contraste, los ratones deficientes en IL-4 mostraron un perfil de tipo Th1/Th2 más mixto. En efecto, se detectó una significativa respuesta de IFN- $\gamma$  específica de SEA en los ratones deficientes en IL-4, que es coherente con los estudios previos<sup>23,24</sup>. También se detectó IL-13, IL-10, y en menor grado IL-15, en estos animales, aunque los niveles de estas citoquinas fueron marcadamente menores cuando se comparan con los ratones de tipo salvaje. De manera importante, el mantenimiento de una respuesta baja, pero significativa, de IL-13 independiente de IL-4 probablemente explica la respuesta granulomatosa marcada que se mantiene en ausencia de IL-4 (figura 2). De modo sorprendente, a pesar de su marcado efecto inhibitorio sobre la fibrosis hepática, la sIL-13R $\alpha$ 2-Fc no produjo un efecto significativo sobre las respuestas de citoquinas de tipo Th1 o Th2 en los ratones de tipo salvaje ni en los ratones deficientes en IL-4. También debe advertirse que, en todos los casos, la producción de citoquinas fue muy dependiente de la respuesta de células T CD4<sup>+</sup>, puesto que no se detectó o se detectó muy poca expresión de citoquinas en cualquiera de los cultivos estimulados por SEA tratados con mAb anti-CD4.

**Cambios en la expresión de ARNm de citoquinas de tipo Th1/Th2 en los hígados granulomatosos de ratones deficientes en IL-4 y tratados con sIL-13R2-Fc**

Para determinar si se observa un patrón similar de expresión de citoquinas *in vivo* en el sitio de la formación de granulomas, los inventores aislaron ARNm hepático de diversos grupos de ratones a las 8 semanas después de la infección y realizaron una RT-PCR cuantitativa. Tal como se muestra en la figura 5, los ratones de tipo salvaje infectados mostraron un fuerte perfil de ARNm de citoquinas de tipo Th2, mostrando un marcado aumento en el ARNm de IL-4, IL-13, IL-5 e IL-10. Los ratones de tipo salvaje también mostraron incrementos modestos en la expresión del ARNm de IFN- $\gamma$ , lo cual resulta coherente con las observaciones previas<sup>19</sup>. En contraste con estos descubrimientos, los niveles de ARNm de IL-13 e IL-5 fueron mucho menores en ratones deficientes en IL-4, mientras que el ARNm de IL-10 y TNF- $\alpha$  aumentó de modo significativo, y la expresión del ARNm de IFN- $\gamma$  no cambió. De nuevo, de forma similar a los resultados *in vitro* obtenidos de cultivos de nódulos linfáticos mesentéricos y esplénicos, el bloqueo de IL-13 no produjo un efecto significativo sobre el patrón de expresión del ARNm de citoquinas en ratones de tipo salvaje ni en ratones deficientes en IL-4. Sin embargo, se produjo un aumento modesto en los niveles de ARNm de IL-10 en ratones deficientes en IL-4 tratados con la sIL-13R $\alpha$ 2-Fc, aunque no es probable que explique la disminución en la fibrosis, puesto que se detectaron niveles muy divergentes de IL-10 en ratones de tipo salvaje tratados con sIL-13R $\alpha$ 2-Fc frente a ratones deficientes en IL-4, aunque se observó una disminución similar en la fibrosis. También se estudió la expresión del ARNm de TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 en los tejidos granulomatosos, aunque no se observaron diferencias significativas en los ratones deficientes en IL-4 infectados ni en los animales tratados con sIL-13R $\alpha$ 2-Fc (los datos no se muestran).

**Los niveles de ARNm de colágeno I y colágeno III se reducen en los hígados de los ratones tratados con sIL-13R2-Fc pero no cambiaron con la deficiencia en IL-4**

Los estudios de citoquinas *in vitro* e *in vivo* descritos anteriormente sugieren que el efecto antifibrótico de sIL-13R $\alpha$ 2-Fc no puede explicarse por los cambios en la expresión de citoquinas de tipo Th1 o Th2. Por tanto, en posteriores experimentos los inventores investigaron los patrones de expresión de ARNm de colágeno I (Col I) y colágeno III (Col III) para determinar si la reducción en la fibrosis inducida por sIL-13R $\alpha$ 2-Fc viene acompañada por cambios directos en la expresión de estos dos importantes genes productores de colágeno<sup>19</sup>. Tal como se muestra en la figura 6, el bloqueo de IL-13 redujo significativamente la expresión de ARNm de Col I y Col III en ratones de tipo salvaje y en ratones deficientes en IL-4. No hubo cambios en los niveles inducidos por la infección de los ARNm de Col I o Col III en ratones deficientes en IL-4, y cuando se comparan con los ratones de tipo salvaje tratados con sIL-13R $\alpha$ 2-Fc no se produjo más reducción en los ratones deficientes en IL-4 tratados de modo similar.

**La IL-13 estimula la producción de colágeno en fibroblastos 3T3 de ratón**

Tras haber demostrado que el bloqueo de IL-13 *in vivo* reduce significativamente la expresión del ARNm de Col I y Col III en el hígado de ratones deficientes en IL-4 y de tipo salvaje infectados, los inventores quisieron determinar si la IL-13 estimula directamente la síntesis de colágeno en fibroblastos. Para responder a esta pregunta, estudiaron la inducción de colágeno de tipo I en fibroblastos 3T3 murinos mediante análisis de la transferencia Western. Tal como se muestra en la figura 7, la IL-13 induce la síntesis de colágeno 48 horas después de la estimulación. Se detectó una cantidad mínima colágeno de tipo I en las células no estimuladas (figura 7, carril 1) o en momentos anteriores en los cultivos activados con citoquinas (los datos no se muestran). La IL-4 también induce la síntesis de colágeno I (carril 2) y se detectaron con facilidad unos altos niveles de colágeno segregado en los sobrenadantes obtenidos de ambos cultivos estimulados con citoquinas (los datos no se muestran). La especificidad de la reacción se confirmó utilizando colágeno de tipo I purificado (carril 5), y unos tratamientos con colagenasa bacteriana demostraron que los anticuerpos eran específicos para el colágeno (los datos no se muestran).

**ANÁLISIS**

Un patrón de citoquinas de tipo Th2 CD4<sup>+</sup> domina la respuesta inmunológica en ratones infectados con *S. mansoni*<sup>12,13</sup>. Los estudios de disminución de IL-4 y los experimentos con ratones deficientes en IL-4 previos sin embargo no pudieron demostrar un papel indispensable de esta citoquina en la patogénesis de la esquistosomiasis<sup>15,23,24</sup>. En efecto, aunque se observó una reducción parcial en la fibrosis en algunos estudios<sup>15</sup>, la formación de granulomas inducidos por huevos pudo producirse en ausencia completa de IL-4<sup>23,24</sup>. En contraste con estas observaciones, la formación de granulomas y el desarrollo de fibrosis hepática fue gravemente afectado en ratones deficientes en Stat6<sup>16</sup>, que muestran un defecto importante en la producción de varias citoquinas asociadas a Th2<sup>46</sup>. La IL-4 y la IL-13 señalizan a través de Stat6 y, por tanto, las diferencias aparentes en la patología observada entre ratones deficientes en IL-4 y deficientes en Stat6 infectados pueden ser explicadas por IL-13. No obstante, las contribuciones diferenciadas de IL-4 e IL-13 en el avance de la enfermedad no pueden distinguirse sólo a partir de estudios en ratones deficientes en IL-4 o Stat6. En este estudio, los inventores utilizaron un potente inhibidor de IL-13 en ratones deficientes en IL-4 y de tipo salvaje infectados, y demostraron que la IL-13 y la IL-4 tienen papeles redundantes, y también exclusivos, en la patogénesis de la esquistosomiasis.

Varios estudios han demostrado que las respuestas de citoquinas de tipo Th2 pueden desarrollarse *in vivo* en ausencia de IL-4 o del receptor de IL-4<sup>26,39</sup>, lo cual resulta coherente con los descubrimientos de los inventores, puesto que se detectó una expresión reducida, pero significativa, de IL-13, IL-10 e IL-5 en los nódulos linfáticos mesentéricos (figura 4) e hígados (figura 5) de ratones deficientes en IL-4 infectados. Su producción también era muy dependiente de la respuesta de células T CD4<sup>+</sup> (figura 4), lo cual indica también que se estableció una respuesta de tipo Th2 convencional. Estos descubrimientos proporcionan pruebas de que aunque la expresión máxima de IL-13 depende de IL-4, la producción continuada de IL-13 podría explicar el mantenimiento de una significativa respuesta granulomatosa en ausencia de IL-4<sup>23-25</sup>. En efecto, aunque el bloqueo de IL-13 solamente no produjo ningún efecto en el tamaño de los granulomas en ratones de tipo salvaje, la inhibición de la IL-13 residual en ratones deficientes en IL-4 produjo una reducción marcada y muy significativa en el volumen de los granulomas (figura 2A). Estos descubrimientos demuestran que la IL-4 y la IL-13 son ambas suficientes para mediar en el desarrollo de granulomas y explican formalmente la producción de granulomas en ratones deficientes en IL-4 frente a la falta casi completa de granulomas en ratones deficientes en Stat6<sup>16,24</sup>. También apoyan los descubrimientos recientes en el modelo de granulomas de huevos pulmonares<sup>30</sup>. Debido a que los granulomas tienen un importante papel protector del hospedante actuando como barrera para hepatoxinas potencialmente letales liberadas por los huevos<sup>47</sup>, el hospedante ha podido desarrollar mecanismos redundantes para la formación de granulomas para asegurar una relación favorable de hospedante-parásito.

Aunque estas observaciones demuestran con claridad que la IL-4 y la IL-13 participan activamente en la formación de granulomas, en estos estudios se han revelado unos papeles exclusivos para ambas citoquinas en el reclutamiento de células cebadas, la eosinofilia de tejidos y, de modo más importante, la generación de fibrosis hepática. Los estudios histológicos de secciones de hígados de ratones infectados demuestran que la IL-13 no es necesaria para la diferenciación y el reclutamiento de células cebadas (tabla III) o eosinófilos (figura 2B), puesto que los granulomas de ratones de tipo salvaje tratados con sIL-13R $\alpha$ 2-Fc no mostraron disminución en ninguno de estos tipos celulares. De hecho, el número de eosinófilos aumentó significativamente en las lesiones de ratones de tipo salvaje con inhibición de IL-13 (figura 2B), lo cual sugiere que la IL-13 puede antagonizar parcialmente este efecto. En contraste, las células cebadas estaban casi completamente ausentes de las lesiones en ratones deficientes en IL-4, y los eosinófilos disminuyeron en más del 50%. De modo interesante, la IL-13 parece apoyar parcialmente la reducida, pero significativa eosinofilia de tejidos inducida por huevos en ratones deficientes en IL-4, puesto que los eosinófilos se redujeron hasta por debajo del 10% en los animales tratados con sIL-13R $\alpha$ 2-Fc/deficientes en IL-4. No

obstante, estos datos indican que la IL-4 es la citoquina dominante responsable del desarrollo de poblaciones de eosinófilos y células cebadas dentro de los granulomas.

Probablemente el avance más importante que ha surgido de este estudio es el descubrimiento de que la fibrosis hepática puede ser bloqueada por sIL-13R $\alpha$ 2-Fc. En efecto, las técnicas microscópicas (tabla III), bioquímicas (figura 2C) y moleculares (figura 6) indican que la IL-13, y no la IL-4, desempeña el papel principal en el desarrollo de la fibrosis hepática inducida por huevos. Estudios previos demostraron que el equilibrio de citoquinas Th1/Th2 puede afectar significativamente el grado de fibrosis tisular en ratones infectados con *S. mansoni*<sup>19</sup>. No obstante, este estudio sugiere que los efectos de sIL-13R $\alpha$ 2-Fc no fueron mediados a través de un sesgo de la respuesta de citoquinas de células Th. El bloqueo de la IL-13 no produjo un efecto significativo en la producción de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-10 o IL-13 por nódulos linfáticos mesentéricos (figura 4) ni células esplénicas *in vitro*, y tampoco hubo cambios en la expresión de ARNm de citoquinas *in vivo* en el sitio de formación de las lesiones (figura 5). En contraste con estas observaciones, los ratones deficientes en IL-4 mostraron una mayor respuesta de IFN- $\gamma$  en los nódulos linfáticos de drenaje (figura 4) y una menor expresión de IL-5 e IL-13 en nódulos linfáticos (figura 4) e hígado (figura 5). Por tanto, la ligera reducción en la fibrosis detectada en ratones deficientes en IL-4 mediante un análisis de hidroxiprolina (figura 2C) puede atribuirse a una disminución en la producción de IL-13. El hecho de que la producción de IL-4 no se vio afectada por el bloqueo de la IL-13, aunque la fibrosis se redujo de forma máxima en estos animales, enfatiza el importante papel desempeñado por la IL-13. En efecto, los ratones deficientes en IL-4 tratados con sIL-13R $\alpha$ 2-Fc muestran una poca disminución adicional en los niveles de hidroxiprolina (figura 2C) y ninguna diferencia en la expresión del ARNm de colágeno I o III (figura 6) frente a los observados en ratones de tipo salvaje tratados de modo similar. Tampoco hubo cambios en la expresión del ARNm del colágeno I o III en los ratones deficientes en IL-4 tratados con control-Fc cuando se comparan con los animales de tipo salvaje, que también desenfatan la contribución de la IL-4. Además, los estudios *in vitro* con células 3T3 demuestran por primera vez la capacidad de la IL-13 para estimular la producción de colágeno en fibroblastos (figura 7), y por tanto los efectos de la IL-13 sobre la fibrosis pueden ser más directos y no depender de las modulaciones en la respuesta de citoquinas Th1/Th2. Apoyando esta conclusión, estudios recientes han demostrado que los receptores de IL-13 se expresan sobre fibroblastos<sup>32</sup> y que la IL-13 aumenta la expresión de moléculas de adhesión y citoquinas inflamatorias en fibroblastos de pulmón humanos<sup>48</sup>. Por último, aunque la IL-13 (figura 7) y la IL-4<sup>49</sup> son ambas capaces de estimular la producción de colágeno en fibroblastos, el hecho de que las células de nódulos linfáticos cultivadas producen casi 100 veces más IL-13 que IL-4 (figura 4) sólo sirve para enfatizar la contribución potencialmente importante de la IL-13 en este proceso. En efecto, estudios en el modelo de granulomas pulmonares han revelado que la expresión de ARNm de IL-4 está más fuertemente regulada en el sitio de formación de las lesiones, mientras que la inducción del ARNm de IL-13 es mucho más sostenida a lo largo del tiempo<sup>30</sup>. No obstante, los inventores no han estudiado la cinética de la expresión del ARNm de IL-4 y de IL-13 en animales infectados, y no pueden decir si se produce un patrón similar en los hígados granulomatosos.

La IL-13 también ha demostrado recientemente ser importante en la resistencia contra los nemátodos intestinales<sup>27,37-39</sup>. Los estudios en ratones deficientes en IL-4<sup>39</sup> e IL-13<sup>37,38</sup> sugieren que la IL-13, en contraste con la IL-4, desempeña un papel requerido en la expulsión de *N. brasiliensis* y *T. muris*. No obstante, el mecanismo específico de expulsión de las lombrices sigue siendo desconocido, aunque se han sugerido cambios inducidos por IL-4 e IL-13 en las células epiteliales y en la fisiología del intestino como posibles dianas<sup>50,51</sup>. La IL-13 también desempeña un papel fundamental en los modelos de asma murinos. En estos estudios, se descubrió que la IL-13 era necesaria y suficiente para la expresión del asma alérgico<sup>40,41</sup>. La fibrosis subepitelial y la hipertrofia del músculo liso de las vías respiratorias son características habituales del asma grave crónico<sup>5</sup>, y la fibrosis pulmonar crónica está asociada con la producción de colágeno de tipo III y de tipo I en las etapas temprana y tardía de la enfermedad, respectivamente. Por tanto, la conexión entre la IL-13 y la fibrosis revelada en el estudio de los inventores aclara la etiología de varias enfermedades humanas importantes y proporciona modos más eficaces de tratamiento de las enfermedades fibróticas en general.

Los estudios previos de los inventores han demostrado que una respuesta de memoria de Th1 inducida por IL-12 específica de los huevos puede reducir de modo eficaz la fibrosis hepática en ratones infectados posteriormente<sup>19</sup>. La reducción en la patología venía acompañada de un cambio en la respuesta Th2 normal a otra dominada por citoquinas de tipo Th1. Los descubrimientos del presente estudio sugieren que los efectos antipatología de este protocolo de vacunación basado en IL-12 pueden explicarse mediante la inhibición de la IL-13. De modo interesante, un segundo estudio que emplea un protocolo diferente demostró que una inyección repetida de rIL-12 realizadas a las 6 a 8 semanas, durante la fase dominada por Th2 del desarrollo de granulomas, fueron casi completamente ineficaces para bloquear la formación de granulomas y la fibrosis<sup>52</sup>. Estudios relacionados han sugerido que la IL-12 es menos capaz de modular las respuestas de tipo Th2 establecidas<sup>53</sup>, lo cual probablemente explica la incapacidad para modular la patología en el último estudio<sup>52</sup>. En contraste con estos descubrimientos, la sIL-13R $\alpha$ 2-Fc fue extremadamente eficaz para reducir la fibrosis hepática, aunque se administre sólo durante las etapas finales de la

infección. Estos descubrimientos indican que el antagonismo de IL-13 es un enfoque terapéutico mucho más eficaz para reducir la fibrosis en situaciones en que ya se han establecido respuestas inmunológicas de tipo Th2 patógenas. En resumen, los descubrimientos de los inventores han proporcionado pruebas de que los inhibidores de IL-13, tales como sIL-13R $\alpha$ 2-Fc, tienen un beneficio terapéutico general para prevenir la fibrosis asociada con una enfermedad infecciosa crónica y demuestran el importante papel no redundante de la IL-13 en la patogénesis de la esquistosomiasis.

## PROCEDIMIENTOS

### **Animales, parásitos y preparaciones de Ag**

Se obtuvieron ratones deficientes en IL-4 y C57BL/6 hembra de 6-8 semanas (fondo C57BL/6, 10<sup>o</sup> retrocruzamiento) de Taconic Farms, Inc. (Germantown, NY). Todos los ratones se alojaron en una instalación para animales aprobada por NIH American Association for the Accreditation of Laboratory Animal Care en jaulas de filtro superior estéril y se mantuvieron sobre agua estéril. Se obtuvieron cercarias de la cepa portorriqueña de *Schistosoma mansoni* (NMRI) de caracoles *Biomphalaria glabrata* infectados (Biomedical Research Institute, Rockville, MD). El antígeno de los huevos soluble (SEA) se purificó a partir de huevos homogeneizados, como se ha descrito previamente<sup>15</sup>.

### **Reactivos**

La proteína de fusión del receptor  $\alpha$ 2 de IL-13 soluble-Fc (sIL-13R $\alpha$ 2-Fc) se preparó como se ha descrito previamente<sup>35</sup> y fue proporcionada por Genetics Institute, Cambridge, MA. La contaminación con endotoxinas fue <2 EU/mg, según se determina con el ensayo LAL de Cape Cod Associates (LAL, "Limulus Amebocyte Lysate", lisado de amebocitos de *Limulus*, Woods Hole, MA). La DI50 *in vitro*, según se determina mediante la capacidad para neutralizar 3 ng/ml de IL-13 murina en el ensayo de proliferación de B9, fue de aproximadamente 10 ng/ml. La IgG humana (control-Fc), que se utilizó como control para la sIL-13R $\alpha$ 2-Fc, se purificó por afinidad mediante una cromatografía de proteína A-Sepharose, según se describe para sIL-13R $\alpha$ 2-Fc<sup>35</sup>. Tal como se ha descrito previamente, el control-Fc no produjo un efecto detectable sobre la patología o la expresión de citoquinas en ratones infectados<sup>30</sup>.

### **Infección y tratamientos**

Los ratones fueron infectados mediante una exposición percutánea de la piel de la cola durante 40 min en agua que contenía entre 20 y 25 cercarias. Los animales se trataron con control-Fc humano o con la sIL-13R $\alpha$ 2-Fc mediante una inyección intraperitoneal en 0,5 ml de PBS, en días alternos después de la aparición de producción de huevos (semana 5). La concentración óptima para un uso *in vivo* (200  $\mu$ g/ratón/día) se eligió basándose en ensayos cinéticos y en experimentos de dosis-respuesta en ratones inyectados por vía intravenosa con huevos/sensibilizados<sup>30</sup>. Se recogió el suero de los ratones en el día del sacrificio. Todos los animales se sacrificaron mediante la administración intraperitoneal de pentobarbital sodio (18 mg/ratón, Sigma, St. Louis, MO) en la semana 8 y se perfusionaron con disolución salina citrada para evaluar la carga de lombrices<sup>15</sup>. No se observó mortalidad en ninguno de los grupos tratados.

### **Histopatología y medición de la fibrosis**

Para la medición de los granulomas, aproximadamente la mitad del hígado se fijó con fijador Bouin-Hollande y se procesó como se ha descrito previamente<sup>15</sup>. Se determinó el tamaño de los granulomas hepáticos en secciones histológicas teñidas con tinte Giemsa de Wright (Histopath of America, Clinton, MD). Los diámetros de cada granuloma que contenía un único huevo viable se midieron con un micrómetro ocular y se calculó el volumen de cada granuloma suponiendo que tienen una forma esférica. Se utilizó la media del diámetro mayor y su diámetro perpendicular. Se evaluó el porcentaje de eosinófilos, células cebadas y otros tipos celulares en las mismas secciones. Se puntuó la necrosis parenquimática sobre una escala de 0-4, siendo 0 la necrosis menos extensa y 4 la necrosis más extensa. Se midió el número de huevos de esquistosoma en el hígado y en el intestino y el contenido en colágeno del hígado, determinado como hidroxiprolina, tal como se ha descrito previamente<sup>15</sup>. También se puntuó la fibrosis de modo histológico utilizando secciones teñidas con rojo de picrosirius. El reactivo de picrosirius tiñe el colágeno de modo específico y cuando las secciones se visualizan bajo luz polarizada se iluminan las áreas brillantes en que se deposita el colágeno. Se puntuaron todos los granulomas dentro de cada sección para la "densidad" de picrosirius (rojo) basándose en una escala de 1-4, y también se determinó una segunda medición del "área implicada" utilizando la misma escala. Se determinó la puntuación de fibrosis total multiplicando la densidad y el área para cada granuloma (es decir, una puntuación de 16 sería el máximo). En todos los análisis se incluyó una

media de 30 granulomas por ratón. Para un control de la coherencia, el mismo individuo establece las puntuaciones para todas las características histológicas y este individuo no conoce el diseño experimental.

### ***Aislamiento y purificación del ARN***

5 Se reunieron dos porciones del hígado de cada animal y se colocaron en 1 ml de RNA-STAT 60 (Tel-Test), se congelaron en hielo seco y se mantuvieron a -70 °C hasta su uso. Los tejidos se homogeneizaron utilizando un Polytron de tejidos (Omni International Inc., Waterbury, CT) y se extrajo el ARN total siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ARN se resuspendió en agua tratada con DEPC y se cuantificó de modo espectrofotométrico.

### ***Detección mediante RT-PCR del ARNm de citoquinas***

10 Se empleó un procedimiento de RT-PCR para determinar las cantidades relativas de ARNm para IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$ , colágeno I, colágeno III, TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, y HPRT (hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa). El ADNc se obtuvo después de la transcripción inversa de 1  $\mu$ g de ARN según se ha descrito<sup>14</sup>. Los cebadores y las sondas para todos los genes se han publicado previamente<sup>14,19,54</sup>. Los ciclos de PCR utilizados para cada citoquina fueron los siguientes: IL-4 (33), IL-5 (31), IFN- $\gamma$  (29), colágeno I (26), colágeno III (22), TGF $\beta$ 1 (34), TGF $\beta$ 2 (34), y HPRT (23).

### ***Análisis y cuantificación de los productos de la PCR***

15 El ADN amplificado se analizó mediante electroforesis. Se realizó un análisis de la transferencia Southern y una hibridación con sondas específicas de citoquinas no radiactivas como se ha descrito previamente<sup>14</sup>. Los productos de la PCR se detectaron utilizando un sistema de detección ECL (Amersham). Las señales quimioluminiscentes se cuantificaron utilizando un escáner plano (Molecular Dynamics, modelo 600 ZS, Torrance, CA). Se determinó la cantidad de producto de PCR comparando la proporción de densidad de señal específica de citoquinas con la de la densidad de señal específica de HPRT en muestras individuales. Las unidades densitométricas arbitrarias para las muestras individuales después se multiplicaron por un factor de 100.

### ***Cultivos in vitro***

25 Se extrajeron células de nódulos linfáticos mesentéricos (MLN) y los bazos de los ratones y se prepararon suspensiones de células individuales. Los eritrocitos se lisaron mediante un tratamiento osmótico con tampón de lisado ACK (Biofluids, Inc., Rockville, MD). Las células se colocaron en medio RPMI 1640 suplementado con FCS al 10%, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100  $\mu$ g/ml, HEPES 25 mM, piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, y 2-ME 50  $\mu$ M a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5%. Las células se cultivaron en placas de 24 pocillos (3 x 10<sup>6</sup>/ml, 1 ml) y se estimularon con SEA (20  $\mu$ g/ml), y los sobrenadantes se recogieron después de 72 h para medir los niveles de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IFN- $\gamma$ . Otros cultivos estimulados con SEA también se trataron con 50  $\mu$ g/ml de mAb anti-CD4 (GK1.5). Los cultivos tratados sólo con mAb anti-CD4 no mostraron cambios en la expresión de citoquinas cuando se comparan con la observada en cultivos en medio control (los datos no se muestran). Se midió la IL-5, la IL-10 y el IFN- $\gamma$  utilizando un ELISA de "sandwich" específico<sup>15</sup>. Se midieron los niveles de IL-13 utilizando kits ELISA de IL-13 murina (R&D Systems, Minneapolis, MN). Se calcularon los niveles de citoquinas a partir de curvas preparadas con citoquinas recombinantes. La IL-4 se midió utilizando la línea celular sensible a IL-4 CT.4S. Se cuantificó la proliferación de estas células mediante la incorporación de <sup>3</sup>H-TDR y se determinó la cantidad de citoquinas mediante una comparación con cantidades conocidas de IL-4 recombinante.

### ***Detección mediante análisis de la transferencia Western del colágeno I***

40 Se cultivaron fibroblastos 3T3 en medio RPMI 1640 suplementado con FCS al 10%, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100  $\mu$ g/ml, HEPES 25 mM, piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, y 2-ME 50  $\mu$ M a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5%. Las células confluentes se cultivaron en placas de 24 pocillos (500.000 células/ml) y se estimularon con IL-4 (1000 U/ml) o rIL-13 (R&D Systems, Minneapolis, MN) (20 ng/ml) durante 6, 24 y 48 h. Los sobrenadantes de los cultivos se recogieron para analizar el colágeno I segregado. Las células se lavaron una vez con disolución salina tamponada con fosfato y se lisaron con tampón de muestras de SDS-PAGE. Los lisados celulares y los sobrenadantes de los cultivos se sometieron a una separación electroforética en geles de tris-glicina al 6% (Novel Experimental Technology, San Diego, CA) utilizando condiciones reductoras, y se trasladaron a membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell, Keene, NK). Las transferencias se sondaron con IgG de conejo anti-colágeno de tipo I de ratón (Bioscience Resource Project, Kennebunk, ME) y se empleó como segundo Ab IgG anti-conejo marcada con peroxidasa (Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ). Las bandas se visualizaron utilizando un reactivo quimioluminiscente de transferencia Western (NEN Life Science Products, Boston, MA). Para

confirmar la identidad de las bandas de colágeno, los lisados celulares se trataron con 0,5 mg/ml de colagenasa (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) en PBS, suplementada con  $\text{CaCl}_2$  1 mM y FCS al 1% durante 1 h a 37 °C. También se utilizó como control una preparación de colágeno I de rata purificada.

### **Estadísticas**

- 5 Se comparó el número de huevos y de lombrices de esquistosoma, los cambios en el ARNm de citoquinas, y los valores para las proteínas de citoquinas segregadas utilizando un ensayo de la t de Student de dos colas. La fibrosis hepática se comparó mediante un análisis de la covarianza, utilizando el logaritmo de los huevos totales en el hígado como la covariable, y el logaritmo de la hidroxiprolina por huevo. Se consideró significativo  $p < 0,05$ .

### **Referencias bibliográficas**

- 10 1. Rosenstein, B.J. y Zeitlin, P.L., Cystic fibrosis, *Lancet*, 351, 277-282 (1998).
2. Lee, J.K. et al., A serine elastase inhibitor reduces inflammation and fibrosis and preserves cardiac function after experimentally-induced murine myocarditis, *Nat. Med.*, 4, 1383-1391 (1998).
- 15 3. Lahita, R.G., Collagen disease: the enemy within, *Int. J. Fertil. Womens Med.*, 43, 229-234 (1998).
4. Kuroda, K., Tsukifuji, R. y Shinkai, H., Increased expression of heat-shock protein 47 is associated with overproduction of type I procollagen in systemic sclerosis skin fibroblasts, *J. Invest. Dermatol.*, 111, 1023-1028 (1998).
- 20 5. Bento, A.M. y Hershenson, M.B., Airway remodeling: potential contributions of subepithelial fibrosis and airway smooth muscle hypertrophy/hyperplasia to airway narrowing in asthma, *Allergy Asthma Procedimiento.*, 19, 353-358 (1998).
- 25 6. Wahl, S.M. et al., Bacterial cell wall-induced hepatic granulomas. An in vivo model of T cell-dependent fibrosis, *J. Exp. Med.*, 163, 884-902 (1986).
7. Henderson, G.S. et al., Two distinct pathological syndromes in male CBA/J inbred mice with chronic *Schistosoma mansoni* infections, *Am. J. Pathol.*, 142, 703-714 (1993).
- 30 8. Trojanowska, M., LeRoy, E.C., Eckes, B. y Krieg, T., Pathogenesis of fibrosis: type 1 collagen and the skin, *J. Mol. Med.*, 76, 266-274 (1998).
9. Johnson, L.L., Dyer, R. y Hupe, D.J., Matrix metalloproteinases, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 466-471 (1998).
- 35 10. Cheever, A.W. y Yap, G.S., Immunologic basis of disease and disease regulation in schistosomiasis, *Chem. Immunol.*, 66, 159-176 (1997).
11. Bergquist, N.R., Schistosomiasis vaccine development: progress and prospects [en la citación de proceso], *Mem. Inst., Oswaldo Cruz*, 93, 95-101 (1998).
- 40 12. Grzych, J.M. et al., Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni, *J. Immunol.*, 146, 1322-1327 (1991).
- 45 13. Pearce, E.J., Caspar, P., Grzych, J.M., Lewis, F.A. y Sher, A., Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*, *J. Exp. Med.*, 173, 159-162 (1992).
14. Wynn, T.A. et al., Analysis of cytokine mRNA expression during primary granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni*, *J. Immunol.*, 151, 1430-1440 (1993).
- 50 15. Cheever, A.W. et al., Anti-IL-4 treatment of *Schistosoma mansoni*-infected mice inhibits development of T cells and non-B, non-T cells expressing Th2 cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis, *J. Immunol.*, 153, 753-754 (1994).

55



16. Kaplan, M.H., Whitfield, J.R., Boros, D.L. y Grusby, M.J., Th2 cells are required for the *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous response, *J. Immunol.*, 160, 1850-1856 (1998).
- 5 17. Chensue, S.W. et al., Role of interleukin-4 and gamma-interferon in *Schistosoma mansoni* egg-induced hypersensitivity granuloma formation: orchestration, relative contribution and relationship to macrophage function, *J. Immunol.*, 148, 900-910 (1992).
- 10 18. Henderson, G.S., Lu, X., McCurley, T.L. y Colley, D.G., In vivo molecular analysis of lymphokines involved in the murine immune response during *Schistosoma mansoni* infection: II. Quantitation of IL-4 mRNA, IFN-g mRNA, and IL-2 mRNA levels in the granulomatous livers, mesenteric lymph nodes, and spleens during the course of modulation, *J. Immunol.*, 148,2261-2267 (1992).
- 15 19. Wynn, T.A. et al., An IL-12-based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection, *Nature*, 376, 594-596 (1995).
- 20 20. Secor, W.E., Stewart, S.J. y Colley, D.G., Eosinophils and immune mechanisms. VI. The synergistic combination of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IL-5 accounts for eosinophil-stimulation promoter activity in *Schistosoma mansoni*-infected mice, *J. Immunol.*, 144, 1484-1489 (1990).
- 25 21. Le Gros, G., Ben-Sasson, S.Z., Seder, R., Finkelman, F.D. y Paul, W.E., Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4- producing cells, *J. Exp. Med.*, 172, 921-929 (1990).
- 30 22. Kopf, M. et al., Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses, *Nature*, 362, 245-248 (1993).
- 35 23. Metwali, A. et al., The granulomatous response in murine *Schistosomiasis mansoni* does not switch to Th1 in IL-4-deficient C57BL/6 mice, *J. Immunol.*, 157, 4546-4553 (1996).
- 40 24. Pearce, E.J. et al., *Schistosoma mansoni* in IL-4-deficient mice, *Int. Immunol.*, 8, 435-444 (1996).
- 45 25. Chensue, S.W., Warmington, K., Ruth, J.H., Lukacs, N. y Kunkel, S.L., Mycobacterial and schistosomal antigen-elicited granuloma formation in IFN-gamma and IL-4 knockout mice: analysis of local and regional cytokine and chemokine networks, *J. Immunol.*, 159, 3565-3573 (1997).
- 50 26. Noben-Trauth, N. et al., An interleukin 4 (IL-4)-independent pathway for CD4+ T cell IL-4 production is revealed in IL-4 receptor-deficient mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 10838-10843 (1997).
- 55 27. Barner, M., Mohrs, M., Brombacher, F. y Kopf, M., Differences between IL-4R alpha-deficient and IL-4-deficient mice reveal a role for IL-13 in the regulation of Th2 responses, *Curr. Biol.*, 8, 669-672 (1998).
- 60 28. Amiri, P. et al., Tumour necrosis factor alpha restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice, *Nature*, 356, 604-607 (1992).
29. Hernandez, H.J., Wang, Y. y Stadecker, M.J., In infection with *Schistosoma mansoni*, B cells are required for T helper type 2 cell responses but not for granuloma formation, *J. Immunol.*, 158, 4832-4837 (1997).
30. Chiamonte, M.G. et al., IL-13 is a key regulatory cytokine for Th2 cell-mediated pulmonary granuloma formation and IgE responses induced by *Schistosoma mansoni* eggs, *J. Immunol.*, 162, 920-930 (1999).
31. de Vries, J.E., The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 102, 165-169 (1998).
32. Murata, T., Husain, S.R., Mohri, H. y Puri, R.K., Two different IL-13 receptor chains are expressed in normal human skin fibroblasts, and IL-4 and IL-13 mediate signal transduction through a common pathway, *Int. Immunol.*, 10, 1103-1110 (1998).
33. Emson, C.L., Bell, S.E., Jones, A., Wisden, W. y McKenzie, A.N., Interleukin (IL)-4-independent induction of immunoglobulin (Ig)E, and perturbation of T cell development in transgenic mice expressing IL-13, *J. Exp. Med.*, 188, 399-404 (1998).
34. McKenzie, G.J. et al., Impaired development of Th2 cells in IL-13-deficient mice, *Immunity*, 9, 423-432 (1998).

35. Donaldson, D.D. et al., The Murine IL-13Ra2: Molecular Cloning, Characterization and Comparison with Murine IL-13Ra1, *J. Immunol.*, 161, 2317-2324 (1998).
- 5 36. Minty, A. et al., Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses, *Nature*, 362, 248-250 (1993).
37. McKenzie, G.J., Bancroft, A., Grecis, R.K. y McKenzie, A.N., A distinct role for interleukin-13 in Th2-cell-mediated immune responses, *Curr. Biol.*, 8, 339-342 (1998).
- 10 38. Bancroft, A.J., McKenzie, A.N. y Grecis, R.K., A critical role for IL-13 in resistance to intestinal nematode infection, *J. Immunol.*, 160, 3453-3461 (1998).
39. Urban, J.F., Jr. et al., IL-13, IL-4Ralpha, and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*, *Immunity*, 8, 255-264 (1998).
- 15 40. Wills-Karp, M. et al., Interleukin-13: central mediator of allergic asthma, *Science*, 282, 2258-2261 (1998).
41. Grunig, G. et al., Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma, *Science*, 282, 2261-2263 (1998).
- 20 42. Hilton, D.J. et al., Cloning and characterization of a binding subunit of the interleukin 13 receptor that is also a component of the interleukin 4 receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 497-501 (1996).
- 25 43. Miloux, B. et al., Cloning of the human IL-13R alpha chain and reconstitution with the IL-4R alpha of a functional IL-4/IL-13 receptor complex, *FEBS Lett.*, 401, 163-166 (1997).
44. Gauchat, J.F. et al., A novel 4-kb interleukin-13 receptor alpha mRNA expressed in human B, T, and endothelial cells encoding an alternate type-II interleukin- 4/interleukin-13 receptor, *Eur. J. Immunol.*, 27, 971-978 (1997).
- 30 45. Warren, K.S., Schistosomiasis: host-pathogen biology, *Rev. Infect. Dis.*, 4, 771-775 (1982).
46. Kaplan, M.H., Schindler, U., Smiley, S.T. y Grusby, M.J., Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells, *Immunity*, 4, 313-319 (1996).
- 35 47. Dunne, D.W., Jones, F.M. y Doenhoff, M.J., The purification, characterization, serological activity and hepatotoxic properties of two cationic glycoproteins (alpha 1 and omega 1) from *Schistosoma mansoni* eggs, *Parasitology*, 103, pt, 2, 225-236 (1991).
- 40 48. Doucet, C. et al., IL-4 and IL-13 specifically increase adhesion molecule and inflammatory cytokine expression in human lung fibroblasts, *Int. Immunol.*, 10, 1421-1433 (1998).
49. Serpier, H. et al., Antagonistic effects of interferon-gamma and interleukin-4 on fibroblast cultures, *J. Invest. Dermatol.*, 109, 158-162 (1997).
- 45 50. Zund, G., Madara, J.L., Dzus, A.L., Awtrey, C.S. y Colgan, S.P., Interleukin-4 and interleukin-13 differentially regulate epithelial chloride secretion, *J. Biol. Chem.*, 271, 7460-7464 (1996).
51. Finkelman, F.D. et al., Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models, *Annu. Rev. Immunol.*, 15, 505-533 (1997).
- 50 52. Boros, D.L. y Whitfield, J.R., Enhanced Th 1 and dampened Th2 responses synergize To inhibit acute granulomatous and fibrotic responses in murine schistosomiasis mansoni [en la citación de proceso], *Infect. Immun.*, 67, 1187-1193 (1999).
- 55 53. Wang, Z.E. et al., Interferon gamma-independent effects of interleukin 12 administered during acute or established infection due to *Leishmania major*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 12932-12936 (1994).
- 60 54. Wynn, T.A., Eltoun, I., Oswald, I.P., Cheever, A.W. y Sher, A., Endogenous interleukin 12 (IL-12) regulates granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni* and exogenous IL-12 both inhibits and prophylactically immunizes against egg pathology, *J. Exp. Med.*, 179, 1551 - 1561 (1994).

## LISTADO DE SECUENCIAS

## (1) INFORMACIÓN GENERAL:

5 (i) SOLICITANTE: Wynn, Thomas  
 Chiaramonte, Monica  
 Collins, Mary  
 Donaldson, Debra  
 Fitz, Lori  
 10 Neben, Tamlyn  
 Witters, Matthew  
 Wood, Clive

15 (ii) TÍTULO DE LA INVENCÓN: TRATAMIENTO DE LA FIBROSIS MEDIANTE EL ANTAGONISMO DE LA IL-13 Y DE LAS CADENAS DEL RECEPTOR DE IL-13

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 9

## (iv) DIRECCIÓN PARA LA CORRESPONDENCIA:

20 (A) DESTINATARIO: Genetics Institute, Inc.  
 (B) CALLE: 87 CambridgePark Drive  
 (C) CIUDAD: Cambridge  
 (D) ESTADO: MA  
 (E) PAIS: EEUU  
 25 (F) CÓDIGO POSTAL: 02140

## (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

30 (A) TIPO DE MEDIO: disquete  
 (B) ORDENADOR: IBM PC compatible  
 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS  
 (D) PROGRAMA: PatentIn edición nº 1.0, versión nº 1.25

## (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:

35 (A) NÚMERO DE SOLICITUD:  
 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:  
 (C) CLASIFICACIÓN:

## (viii) INFORMACION SOBRE EL ABOGADO/AGENTE:

40 (A) NOMBRE: Brown, Scott A.  
 (B) NÚMERO DE REGISTRO: 32.724  
 45 (C) NÚMERO DE REFERENCIA/SUMARIO: GI5268A2

## (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIONES:

50 (A) TELÉFONO: (617) 498-8224  
 (B) TELEFAX: (617) 876-5851

## (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:1:

## (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

55 (A) LONGITUD: 1525 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) CADENA: doble  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

60 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(ix) CARACTERÍSTICA:

- 5 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 256..1404

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:1:

10

GAATTCGGCA CGAGGGAGAG GAGGAGGGAA AGATAGAAAG AGAGAGAGAA AGATTGCTTG	60
CTACCCCTGA ACAGTGACCT CTCTCAAGAC AGTGCTTTGC TCTTCACGTA TAAGGAAGGA	120
AAACAGTAGA GATTCAATTT AGTGTCTAAT GTGGAAAGGA GGACAAAGAG GTCTTGTGAT	180
AACTGCCTGT GATAATACAT TTCTTGAGAA ACCATATTAT TGAGTAGAGC TTTCAGCACA	240
CTAAATCCTG GAGAA ATG GCT TTT GTG CAT ATC AGA TGC TTG TGT TTC ATT	291
Met Ala Phe Val His Ile Arg Cys Leu Cys Phe Ile	
1 5 10	
CTT CTT TGT ACA ATA ACT GGC TAT TCT TTG GAG ATA AAA GTT AAT CCT	339
Leu Leu Cys Thr Ile Thr Gly Tyr Ser Leu Glu Ile Lys Val Asn Pro	
15 20 25	
CCT CAG GAT TTT GAA ATA TTG GAT CCT GGA TTA CTT GGT TAT CTC TAT	387
Pro Gln Asp Phe Glu Ile Leu Asp Pro Gly Leu Leu Gly Tyr Leu Tyr	
30 35 40	
TTG CAA TGG AAA CCT CCT GTG GTT ATA GAA AAA TTT AAG GGC TGT ACA	435
Leu Gln Trp Lys Pro Pro Val Val Ile Glu Lys Phe Lys Gly Cys Thr	
45 50 55 60	
CTA GAA TAT GAG TTA AAA TAC CGA AAT GTT GAT AGC GAC AGC TGG AAG	483
Leu Glu Tyr Glu Leu Lys Tyr Arg Asn Val Asp Ser Asp Ser Trp Lys	
65 70 75	
ACT ATA ATT ACT AGG AAT CTA ATT TAC AAG GAT GGG TTT GAT CTT AAT	531
Thr Ile Ile Thr Arg Asn Leu Ile Tyr Lys Asp Gly Phe Asp Leu Asn	
80 85 90	
AAA GGC ATT GAA GGA AAG ATA CGT ACG CAT TTG TCA GAG CAT TGT ACA	579
Lys Gly Ile Glu Gly Lys Ile Arg Thr His Leu Ser Glu His Cys Thr	
95 100 105	
AAT GGA TCA GAA GTA CAA AGT CCA TGG ATA GAA GCT TCT TAT GGG ATA	627
Asn Gly Ser Glu Val Gln Ser Pro Trp Ile Glu Ala Ser Tyr Gly Ile	
110 115 120	
TCA GAT GAA GGA AGT TTG GAA ACT AAA ATT CAG GAC ATG AAG TGT ATA	675
Ser Asp Glu Gly Ser Leu Glu Thr Lys Ile Gln Asp Met Lys Cys Ile	
125 130 135 140	
TAT TAT AAC TGG CAG TAT TTG GTC TGC TCT TGG AAA CCT GGC AAG ACA	723
Tyr Tyr Asn Trp Gln Tyr Leu Val Cys Ser Trp Lys Pro Gly Lys Thr	
145 150 155	
GTA TAT TCT GAT ACC AAC TAT ACC ATG TTT TTC TGG TAT GAG GGC TTG	771
Val Tyr Ser Asp Thr Asn Tyr Thr Met Phe Phe Trp Tyr Glu Gly Leu	
160 165 170	
GAT CAT GCC TTA CAG TGT GCT GAT TAC CTC CAG CAT GAT GAA AAA AAT	819

Asp	His	Ala	Leu	Gln	Cys	Ala	Asp	Tyr	Leu	Gln	His	Asp	Glu	Lys	Asn		
		175					180					185					
GTT	GGA	TGC	AAA	CTG	TCC	AAC	TTG	GAC	TCA	TCA	GAC	TAT	AAA	GAT	TTT	867	
Val	Gly	Cys	Lys	Leu	Ser	Asn	Leu	Asp	Ser	Ser	Asp	Tyr	Lys	Asp	Phe		
	190					195					200						
TTT	ATC	TGT	GTT	AAT	GGA	TCT	TCA	AAG	TTG	GAA	CCC	ATC	AGA	TCC	AGC	915	
Phe	Ile	Cys	Val	Asn	Gly	Ser	Ser	Lys	Leu	Glu	Pro	Ile	Arg	Ser	Ser		
205				210					215						220		
TAT	ACA	GTT	TTT	CAA	CTT	CAA	AAT	ATA	GTT	AAA	CCA	TTG	CCA	CCA	GAA	963	
Tyr	Thr	Val	Phe	Gln	Leu	Gln	Asn	Ile	Val	Lys	Pro	Leu	Pro	Pro	Glu		
				225					230						235		
TTC	CTT	CAT	ATT	AGT	GTG	GAG	AAT	TCC	ATT	GAT	ATT	AGA	ATG	AAA	TGG	1011	
Phe	Leu	His	Ile	Ser	Val	Glu	Asn	Ser	Ile	Asp	Ile	Arg	Met	Lys	Trp		
			240					245						250			
AGC	ACA	CCT	GGA	GGA	CCC	ATT	CCA	CCA	AGG	TGT	TAC	ACT	TAT	GAA	ATT	1059	
Ser	Thr	Pro	Gly	Gly	Pro	Ile	Pro	Pro	Arg	Cys	Tyr	Thr	Tyr	Glu	Ile		
		255					260						265				
GTG	ATC	CGA	GAA	GAC	GAT	ATT	TCC	TGG	GAG	TCT	GCC	ACA	GAC	AAA	AAC	1107	
Val	Ile	Arg	Glu	Asp	Asp	Ile	Ser	Trp	Glu	Ser	Ala	Thr	Asp	Lys	Asn		
	270					275					280						
GAT	ATG	AAG	TTG	AAG	AGG	AGA	GCA	AAT	GAA	AGT	GAA	GAC	CTA	TGC	TTT	1155	
Asp	Met	Lys	Leu	Lys	Arg	Arg	Ala	Asn	Glu	Ser	Glu	Asp	Leu	Cys	Phe		
285					290					295					300		
TTT	GTA	AGA	TGT	AAG	GTC	AAT	ATA	TAT	TGT	GCA	GAT	GAT	GGA	ATT	TGG	1203	
Phe	Val	Arg	Cys	Lys	Val	Asn	Ile	Tyr	Cys	Ala	Asp	Asp	Gly	Ile	Trp		
				305					310						315		
AGC	GAA	TGG	AGT	GAA	GAG	GAA	TGT	TGG	GAA	GGT	TAC	ACA	GGG	CCA	GAC	1251	
Ser	Glu	Trp	Ser	Glu	Glu	Glu	Cys	Trp	Glu	Gly	Tyr	Thr	Gly	Pro	Asp		
			320					325							330		
TCA	AAG	ATT	ATT	TTC	ATA	GTA	CCA	GTT	TGT	CTT	TTC	TTT	ATA	TTC	CTT	1299	
Ser	Lys	Ile	Ile	Phe	Ile	Val	Pro	Val	Cys	Leu	Phe	Phe	Ile	Phe	Leu		
			335				340								345		
TTG	TTA	CTT	CTT	TGC	CTT	ATT	GTG	GAG	AAG	GAA	GAA	CCT	GAA	CCC	ACA	1347	
Leu	Leu	Leu	Leu	Cys	Leu	Ile	Val	Glu	Lys	Glu	Glu	Pro	Glu	Pro	Thr		
	350					355						360					
TTG	AGC	CTC	CAT	GTG	GAT	CTG	AAC	AAA	GAA	GTG	TGT	GCT	TAT	GAA	GAT	1395	
Leu	Ser	Leu	His	Val	Asp	Leu	Asn	Lys	Glu	Val	Cys	Ala	Tyr	Glu	Asp		
365					370					375					380		
ACC	CTC	TGT	TAA	ACC	ACCA	ATT	TCT	TGAC	ATAG	AGCC	AG	CCAG	CAGG	AG		1444	
Thr	Leu	Cys															
TCAT	ATT	AAA	CTCA	ATT	TCT	CTT	AAA	ATTT	CGA	ATAC	ATC	TTCT	TG	AAAA	AAAA	1504	
AAAA	AAAA	AAAA	AAAA	ACT	CGA	G											
																	1525

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 383 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácidos
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:2:

```

Met Ala Phe Val His Ile Arg Cys Leu Cys Phe Ile Leu Leu Cys Thr
 1           5           10           15
Ile Thr Gly Tyr Ser Leu Glu Ile Lys Val Asn Pro Pro Gln Asp Phe
           20           25           30
Glu Ile Leu Asp Pro Gly Leu Leu Gly Tyr Leu Tyr Leu Gln Trp Lys
           35           40           45
Pro Pro Val Val Ile Glu Lys Phe Lys Gly Cys Thr Leu Glu Tyr Glu
           50           55           60
Leu Lys Tyr Arg Asn Val Asp Ser Asp Ser Trp Lys Thr Ile Ile Thr
           65           70           75           80
Arg Asn Leu Ile Tyr Lys Asp Gly Phe Asp Leu Asn Lys Gly Ile Glu
           85           90           95
Gly Lys Ile Arg Thr His Leu Ser Glu His Cys Thr Asn Gly Ser Glu
           100          105          110
Val Gln Ser Pro Trp Ile Glu Ala Ser Tyr Gly Ile Ser Asp Glu Gly
           115          120          125
Ser Leu Glu Thr Lys Ile Gln Asp Met Lys Cys Ile Tyr Tyr Asn Trp
           130          135          140
Gln Tyr Leu Val Cys Ser Trp Lys Pro Gly Lys Thr Val Tyr Ser Asp
           145          150          155          160
Thr Asn Tyr Thr Met Phe Phe Trp Tyr Glu Gly Leu Asp His Ala Leu
           165          170          175
Gln Cys Ala Asp Tyr Leu Gln His Asp Glu Lys Asn Val Gly Cys Lys
           180          185          190
Leu Ser Asn Leu Asp Ser Ser Asp Tyr Lys Asp Phe Phe Ile Cys Val
           195          200          205
Asn Gly Ser Ser Lys Leu Glu Pro Ile Arg Ser Ser Tyr Thr Val Phe
           210          215          220
Gln Leu Gln Asn Ile Val Lys Pro Leu Pro Pro Glu Phe Leu His Ile
           225          230          235          240
Ser Val Glu Asn Ser Ile Asp Ile Arg Met Lys Trp Ser Thr Pro Gly
           245          250          255
Gly Pro Ile Pro Pro Arg Cys Tyr Thr Tyr Glu Ile Val Ile Arg Glu

```

	260		265		270										
Asp	Asp	Ile	Ser	Trp	Glu	Ser	Ala	Thr	Asp	Lys	Asn	Asp	Met	Lys	Leu
	275						280					285			
Lys	Arg	Arg	Ala	Asn	Glu	Ser	Glu	Asp	Leu	Cys	Phe	Phe	Val	Arg	Cys
	290					295					300				
Lys	Val	Asn	Ile	Tyr	Cys	Ala	Asp	Asp	Gly	Ile	Trp	Ser	Glu	Trp	Ser
305					310					315					320
Glu	Glu	Glu	Cys	Trp	Glu	Gly	Tyr	Thr	Gly	Pro	Asp	Ser	Lys	Ile	Ile
				325					330					335	
Phe	Ile	Val	Pro	Val	Cys	Leu	Phe	Phe	Ile	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu
			340					345						350	
Cys	Leu	Ile	Val	Glu	Lys	Glu	Glu	Pro	Glu	Pro	Thr	Leu	Ser	Leu	His
		355					360						365		
Val	Asp	Leu	Asn	Lys	Glu	Val	Cys	Ala	Tyr	Glu	Asp	Thr	Leu	Cys	
	370					375					380				

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1369 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 103..1245

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:3:

GGATCCGCGC	GGATGAAGGC	TATTTGAAGT	CGCCATAACC	TGGTCAGAAG	TGTGCCTGTC	60
GGCGGGGAGA	GAGGCAATAT	CAAGGTTTTA	AATCTCGGAG	AA ATG GCT TTC GTT	114	
				Met Ala Phe Val		
				1		
TGC TTG GCT ATC GGA TGC TTA TAT ACC TTT CTG ATA AGC ACA ACA TTT	162					
Cys Leu Ala Ile Gly Cys Leu Tyr Thr Phe Leu Ile Ser Thr Thr Phe						
5 10 15 20						
GGC TGT ACT TCA TCT TCA GAC ACC GAG ATA AAA GTT AAC CCT CCT CAG	210					
Gly Cys Thr Ser Ser Ser Asp Thr Glu Ile Lys Val Asn Pro Pro Gln						
25 30 35						
GAT TTT GAG ATA GTG GAT CCC GGA TAC TTA GGT TAT CTC TAT TTG CAA	258					
Asp Phe Glu Ile Val Asp Pro Gly Tyr Leu Gly Tyr Leu Tyr Leu Gln						
40 45 50						

TGG CAA CCC CCA CTG TCT CTG GAT CAT TTT AAG GAA TGC ACA GTG GAA	306
Trp Gln Pro Pro Leu Ser Leu Asp His Phe Lys Glu Cys Thr Val Glu	
55 60 65	
TAT GAA CTA AAA TAC CGA AAC ATT GGT AGT GAA ACA TGG AAG ACC ATC	354
Tyr Glu Leu Lys Tyr Arg Asn Ile Gly Ser Glu Thr Trp Lys Thr Ile	
70 75 80	
ATT ACT AAG AAT CTA CAT TAC AAA GAT GGG TTT GAT CTT AAC AAG GGC	402
Ile Thr Lys Asn Leu His Tyr Lys Asp Gly Phe Asp Leu Asn Lys Gly	
85 90 95 100	
ATT GAA GCG AAG ATA CAC ACG CTT TTA CCA TGG CAA TGC ACA AAT GGA	450
Ile Glu Ala Lys Ile His Thr Leu Leu Pro Trp Gln Cys Thr Asn Gly	
105 110 115	
TCA GAA GTT CAA AGT TCC TGG GCA GAA ACT ACT TAT TGG ATA TCA CCA	498
Ser Glu Val Gln Ser Ser Trp Ala Glu Thr Thr Tyr Trp Ile Ser Pro	
120 125 130	
CAA GGA ATT CCA GAA ACT AAA GTT CAG GAT ATG GAT TGC GTA TAT TAC	546
Gln Gly Ile Pro Glu Thr Lys Val Gln Asp Met Asp Cys Val Tyr Tyr	
135 140 145	
AAT TGG CAA TAT TTA CTC TGT TCT TGG AAA CCT GGC ATA GGT GTA CTT	594
Asn Trp Gln Tyr Leu Leu Cys Ser Trp Lys Pro Gly Ile Gly Val Leu	
150 155 160	
CTT GAT ACC AAT TAC AAC TTG TTT TAC TGG TAT GAG GGC TTG GAT CAT	642
Leu Asp Thr Asn Tyr Asn Leu Phe Tyr Trp Tyr Glu Gly Leu Asp His	
165 170 175 180	
GCA TTA CAG TGT GTT GAT TAC ATC AAG GCT GAT GGA CAA AAT ATA GGA	690
Ala Leu Gln Cys Val Asp Tyr Ile Lys Ala Asp Gly Gln Asn Ile Gly	
185 190 195	
TGC AGA TTT CCC TAT TTG GAG GCA TCA GAC TAT AAA GAT TTC TAT ATT	738
Cys Arg Phe Pro Tyr Leu Glu Ala Ser Asp Tyr Lys Asp Phe Tyr Ile	
200 205 210	
TGT GTT AAT GGA TCA TCA GAG AAC AAG CCT ATC AGA TCC AGT TAT TTC	786
Cys Val Asn Gly Ser Ser Glu Asn Lys Pro Ile Arg Ser Ser Tyr Phe	
215 220 225	
ACT TTT CAG CTT CAA AAT ATA GTT AAA CCT TTG CCG CCA GTC TAT CTT	834
Thr Phe Gln Leu Gln Asn Ile Val Lys Pro Leu Pro Pro Val Tyr Leu	
230 235 240	
ACT TTT ACT CGG GAG AGT TCA TGT GAA ATT AAG CTG AAA TGG AGC ATA	882
Thr Phe Thr Arg Glu Ser Ser Cys Glu Ile Lys Leu Lys Trp Ser Ile	
245 250 255 260	
CCT TTG GGA CCT ATT CCA GCA AGG TGT TTT GAT TAT GAA ATT GAG ATC	930
Pro Leu Gly Pro Ile Pro Ala Arg Cys Phe Asp Tyr Glu Ile Glu Ile	
265 270 275	
AGA GAA GAT GAT ACT ACC TTG GTG ACT GCT ACA GTT GAA AAT GAA ACA	978
Arg Glu Asp Asp Thr Thr Leu Val Thr Ala Thr Val Glu Asn Glu Thr	
280 285 290	



```

TAC ACC TTG AAA ACA ACA AAT GAA ACC CGA CAA TTA TGC TTT GTA GTA      1026
Tyr Thr Leu Lys Thr Thr Asn Glu Thr Arg Gln Leu Cys Phe Val Val
      295                      300                      305

AGA AGC AAA GTG AAT ATT TAT TGC TCA GAT GAC GGA ATT TGG AGT GAG      1074
Arg Ser Lys Val Asn Ile Tyr Cys Ser Asp Asp Gly Ile Trp Ser Glu
      310                      315                      320

TGG AGT GAT AAA CAA TGC TGG GAA GGT GAA GAC CTA TCG AAG AAA ACT      1122
Trp Ser Asp Lys Gln Cys Trp Glu Gly Glu Asp Leu Ser Lys Lys Thr
      325                      330                      335                      340

TTG CTA CGT TTC TGG CTA CCA TTT GGT TTC ATC TTA ATA TTA GTT ATA      1170
Leu Leu Arg Phe Trp Leu Pro Phe Gly Phe Ile Leu Ile Leu Val Ile
      345                      350                      355

TTT GTA ACC GGT CTG CTT TTG CGT AAG CCA AAC ACC TAC CCA AAA ATG      1218
Phe Val Thr Gly Leu Leu Leu Arg Lys Pro Asn Thr Tyr Pro Lys Met
      360                      365                      370

ATT CCA GAA TTT TTC TGT GAT ACA TGA AGACTTTCCA TATCAAGAGA      1265
Ile Pro Glu Phe Phe Cys Asp Thr *
      375                      380

CATGGTATTG ACTCAACAGT TTCCAGTCAT GGCCAAATGT TCAATATGAG TCTCAATAAA      1325

CTGAATTTT CTTGCGAAAA AAAAAAAAAA AAATCCGCGG ATCC      1369
    
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5

- (A) LONGITUD: 380 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácidos
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:4:

```

Met Ala Phe Val Cys Leu Ala Ile Gly Cys Leu Tyr Thr Phe Leu Ile
  1          5          10          15

Ser Thr Thr Phe Gly Cys Thr Ser Ser Ser Asp Thr Glu Ile Lys Val
      20          25          30

Asn Pro Pro Gln Asp Phe Glu Ile Val Asp Pro Gly Tyr Leu Gly Tyr
      35          40          45

Leu Tyr Leu Gln Trp Gln Pro Pro Leu Ser Leu Asp His Phe Lys Glu
      50          55          60

Cys Thr Val Glu Tyr Glu Leu Lys Tyr Arg Asn Ile Gly Ser Glu Thr
      65          70          75          80

Trp Lys Thr Ile Ile Thr Lys Asn Leu His Tyr Lys Asp Gly Phe Asp
      85          90          95

Leu Asn Lys Gly Ile Glu Ala Lys Ile His Thr Leu Leu Pro Trp Gln
      100          105          110
    
```

Cys Thr Asn Gly Ser Glu Val Gln Ser Ser Trp Ala Glu Thr Thr Tyr  
 115 120 125

Trp Ile Ser Pro Gln Gly Ile Pro Glu Thr Lys Val Gln Asp Met Asp  
 130 135 140

Cys Val Tyr Tyr Asn Trp Gln Tyr Leu Leu Cys Ser Trp Lys Pro Gly  
 145 150 155 160

Ile Gly Val Leu Leu Asp Thr Asn Tyr Asn Leu Phe Tyr Trp Tyr Glu  
 165 170 175

Gly Leu Asp His Ala Leu Gln Cys Val Asp Tyr Ile Lys Ala Asp Gly  
 180 185 190

Gln Asn Ile Gly Cys Arg Phe Pro Tyr Leu Glu Ala Ser Asp Tyr Lys  
 195 200 205

Asp Phe Tyr Ile Cys Val Asn Gly Ser Ser Glu Asn Lys Pro Ile Arg  
 210 215 220

Ser Ser Tyr Phe Thr Phe Gln Leu Gln Asn Ile Val Lys Pro Leu Pro  
 225 230 235 240

Pro Val Tyr Leu Thr Phe Thr Arg Glu Ser Ser Cys Glu Ile Lys Leu  
 245 250 255

Lys Trp Ser Ile Pro Leu Gly Pro Ile Pro Ala Arg Cys Phe Asp Tyr  
 260 265 270

Glu Ile Glu Ile Arg Glu Asp Asp Thr Thr Leu Val Thr Ala Thr Val  
 275 280 285

Glu Asn Glu Thr Tyr Thr Leu Lys Thr Thr Asn Glu Thr Arg Gln Leu  
 290 295 300

Cys Phe Val Val Arg Ser Lys Val Asn Ile Tyr Cys Ser Asp Asp Gly  
 305 310 315 320

Ile Trp Ser Glu Trp Ser Asp Lys Gln Cys Trp Glu Gly Glu Asp Leu  
 325 330 335

Ser Lys Lys Thr Leu Leu Arg Phe Trp Leu Pro Phe Gly Phe Ile Leu  
 340 345 350

Ile Leu Val Ile Phe Val Thr Gly Leu Leu Leu Arg Lys Pro Asn Thr  
 355 360 365

Tyr Pro Lys Met Ile Pro Glu Phe Phe Cys Asp Thr \*  
 370 375 380

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 17 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) CADENA: única  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: oligonucleótido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:5:

KSRCTCCABK CRCTCCA 17

15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 20 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) CADENA: única  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: oligonucleótido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:6:

ATAGTTAAAC CATTGCCACC 20

30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 20 pares de base  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) CADENA: única  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: oligonucleótido

40

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:7:

CTCCATTTCGC TCCAAATTCC 20

45 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 50 (A) LONGITUD: 21 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) CADENA: única  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: oligonucleótido

55

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:8:

AGTCTATCTT ACTTTTACTC G 21

60 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 22 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 5 (C) CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: oligonucleótido

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:9:

CATCTGAGCA ATAAATATTC AC 22

## REIVINDICACIONES

- 5 1.- El uso de un antagonista de IL-13 para la fabricación de un medicamento para tratar la fibrosis de tejidos en un mamífero, en el que dicho antagonista se selecciona del grupo que consiste en una proteína IL-13bc, una forma soluble de IL-13R $\alpha$ 1, un anticuerpo contra IL-13 o un fragmento de unión a IL-13 de éste, un anticuerpo contra IL-13bc o un fragmento de unión a IL-13bc de éste, y un anticuerpo contra IL-13R $\alpha$ 1 o un fragmento de unión a IL-13R $\alpha$ 1 de éste.
- 10 2.- Un antagonista de IL-13, en el que dicho antagonista se selecciona del grupo que consiste en una proteína IL-13bc, una forma soluble de IL-13R $\alpha$ 1, un anticuerpo contra IL-13 o un fragmento de unión a IL-13 de éste, un anticuerpo contra IL-13bc o un fragmento de unión a IL-13bc de éste, y un anticuerpo contra IL-13R $\alpha$ 1 o un fragmento de unión a IL-13R $\alpha$ 1 de éste, para su uso en el tratamiento de la fibrosis de tejidos en un mamífero.
- 3.- El uso según la reivindicación 1 o el antagonista de IL-13 para su uso según la reivindicación 2, en el que dicho antagonista es un anticuerpo contra IL-13 o un fragmento de unión a IL-13 de éste.
- 4.- El uso según la reivindicación 1 o el antagonista de IL-13 para su uso según la reivindicación 2, en el que dicha proteína IL-13bc comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- 15 (a) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2;
- (b) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 desde el aminoácido 22 al 334;
- (c) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 desde el aminoácido 357 al 383;
- (d) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4;
- (e) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 desde el aminoácido 26 al 341;
- 20 (f) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 desde el aminoácido 363 al 380; y
- (g) los fragmentos (a)-(f) que tienen una actividad biológica de la cadena de unión del receptor de IL-13.
- 5.- El uso según la reivindicación 1 o el antagonista de IL-13 para su uso según la reivindicación 2, en el que dicha fibrosis de tejidos afecta a un tejido seleccionado del grupo que consiste en hígado, epidermis de la piel, endodermis de la piel, músculo, tendón, cartílago, tejido cardíaco, tejido pancreático, tejido pulmonar, tejido uterino, tejido neuronal, testículos, ovario, glándula adrenal, arterias, venas, colon, intestino delgado, tracto biliar e intestino.
- 25 6.- El uso o el antagonista de IL-13 para su uso según la reivindicación 5, en el que dicho tejido es tejido pulmonar.
- 7.- El uso o el antagonista de IL-13 para su uso según la reivindicación 5, en el que dicho tejido es el hígado.
- 8.- El uso o el antagonista de IL-13 para su uso según la reivindicación 7, en el que dicha fibrosis es el resultado de una infección de esquistosoma.
- 30 9.- El uso según la reivindicación 1 o el antagonista de IL-13 para su uso según la reivindicación 2, en el que dicha fibrosis es el resultado de la cicatrización de una herida.
- 10.- El uso o el antagonista de IL-13 para su uso según la reivindicación 9, en el que dicha herida es una incisión quirúrgica.
- 35 11.- El uso según la reivindicación 1 o el antagonista de IL-13 para su uso según la reivindicación 2, para la fabricación de un medicamento para inhibir la formación de fibrosis de tejidos en un mamífero.
- 12.- El uso o el antagonista de IL-13 para su uso según la reivindicación 11, en el que dicha fibrosis de tejidos afecta a un tejido seleccionado del grupo que consiste en hígado, epidermis de la piel, endodermis de la piel, músculo, tendón, cartílago, tejido cardíaco, tejido pancreático, tejido pulmonar, tejido uterino, tejido neuronal, testículos, ovario, glándula adrenal, arterias, venas, colon, intestino delgado, tracto biliar e intestino.

- 13.- El uso o el antagonista de IL-13 para su uso según la reivindicación 12, en el que dicho tejido es tejido pulmonar.
- 14.- El uso o el antagonista de IL-13 para su uso según la reivindicación 12, en el que dicho tejido es el hígado.
- 15.- El uso o el antagonista de IL-13 para su uso según la reivindicación 14, en el que dicha fibrosis es el resultado de una infección de esquistosoma.
- 5 16.- El uso o el antagonista de IL-13 para su uso según la reivindicación 11, en el que dicha fibrosis es el resultado de la cicatrización de una herida.
- 17.- El uso o el antagonista de IL-13 para su uso según la reivindicación 16, en el que dicha herida es una incisión quirúrgica.
- 10 18.- El uso o el antagonista de IL-13 para su uso según la reivindicación 11, en el que dicho antagonista es un anticuerpo contra IL-13 o un fragmento de unión a IL-13 de éste.
- 19.- El uso o el antagonista de IL-13 para su uso según la reivindicación 11, en el que dicha proteína IL-13bc comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- (a) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2;
- (b) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 desde el aminoácido 22 al 334;
- 15 (c) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 desde el aminoácido 357 al 383;
- (d) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4;
- (e) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 desde el aminoácido 26 al 341;
- (f) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 desde el aminoácido 363 al 380; y
- (g) los fragmentos (a)-(f) que tienen una actividad biológica de la cadena de unión del receptor de IL-13.
- 20 20.- El uso o el antagonista de IL-13 para su uso según la reivindicación 11, en el que dicha fibrosis de tejidos afecta a un tejido seleccionado del grupo que consiste en hígado, epidermis de la piel, endodermis de la piel, músculo, tendón, cartílago, tejido cardíaco, tejido pancreático, tejido pulmonar, tejido uterino, tejido neuronal, testículos, ovario, glándula adrenal, arterias, venas, colon, intestino delgado, tracto biliar e intestino.
- 21.- El uso o el antagonista de IL-13 para su uso según la reivindicación 20, en el que dicho tejido es tejido pulmonar.
- 25 22.- El uso o el antagonista de IL-13 para su uso según la reivindicación 20, en el que dicho tejido es el hígado.
- 23.- El uso o el antagonista de IL-13 para su uso según la reivindicación 21, en el que dicha fibrosis es el resultado de una infección de esquistosoma.
- 24.- El uso o el antagonista de IL-13 para su uso según la reivindicación 11, en el que dicha fibrosis es el resultado de la cicatrización de una herida.
- 30 25.- El uso o el antagonista de IL-13 para su uso según la reivindicación 24, en el que dicha herida es una incisión quirúrgica.
- 26.- El uso o el antagonista de IL-13 para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-25, en el que dicho medicamento es para la administración a una dosis de 0,1 µg a 100 mg de proteína IL-13bc o de antagonista de IL-13bc por kg de peso corporal.
- 35 27.- El uso o el antagonista de IL-13 para su uso según la reivindicación 26, en el que dicha dosis es de 20 µg de proteína IL-13bc o de antagonista de IL-13bc por kg de peso corporal.

28.- El uso o el antagonista de IL-13 para su uso según la reivindicación 26, en el que dicha dosis es de 500  $\mu$ g de proteína IL-13bc o de antagonista de IL-13bc por kg de peso corporal.

29.- El uso o el antagonista de IL-13 para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 26-28, en el que dicha administración comprende una inyección cutánea, subcutánea o intravenosa.

Figura 1

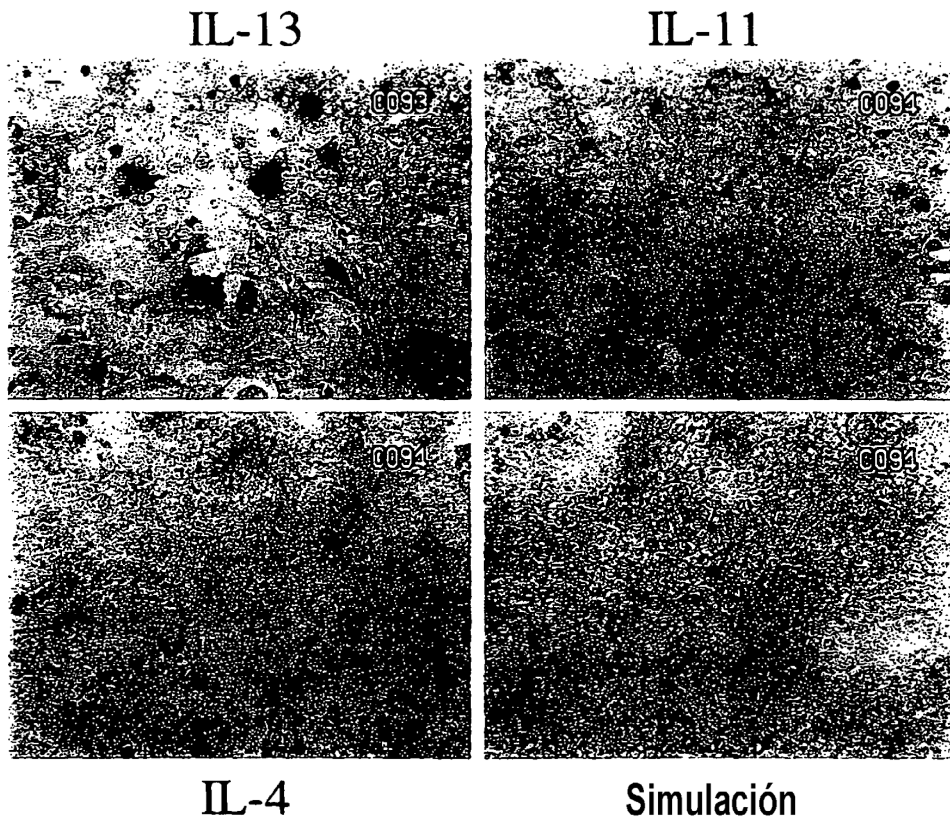




Figura 2

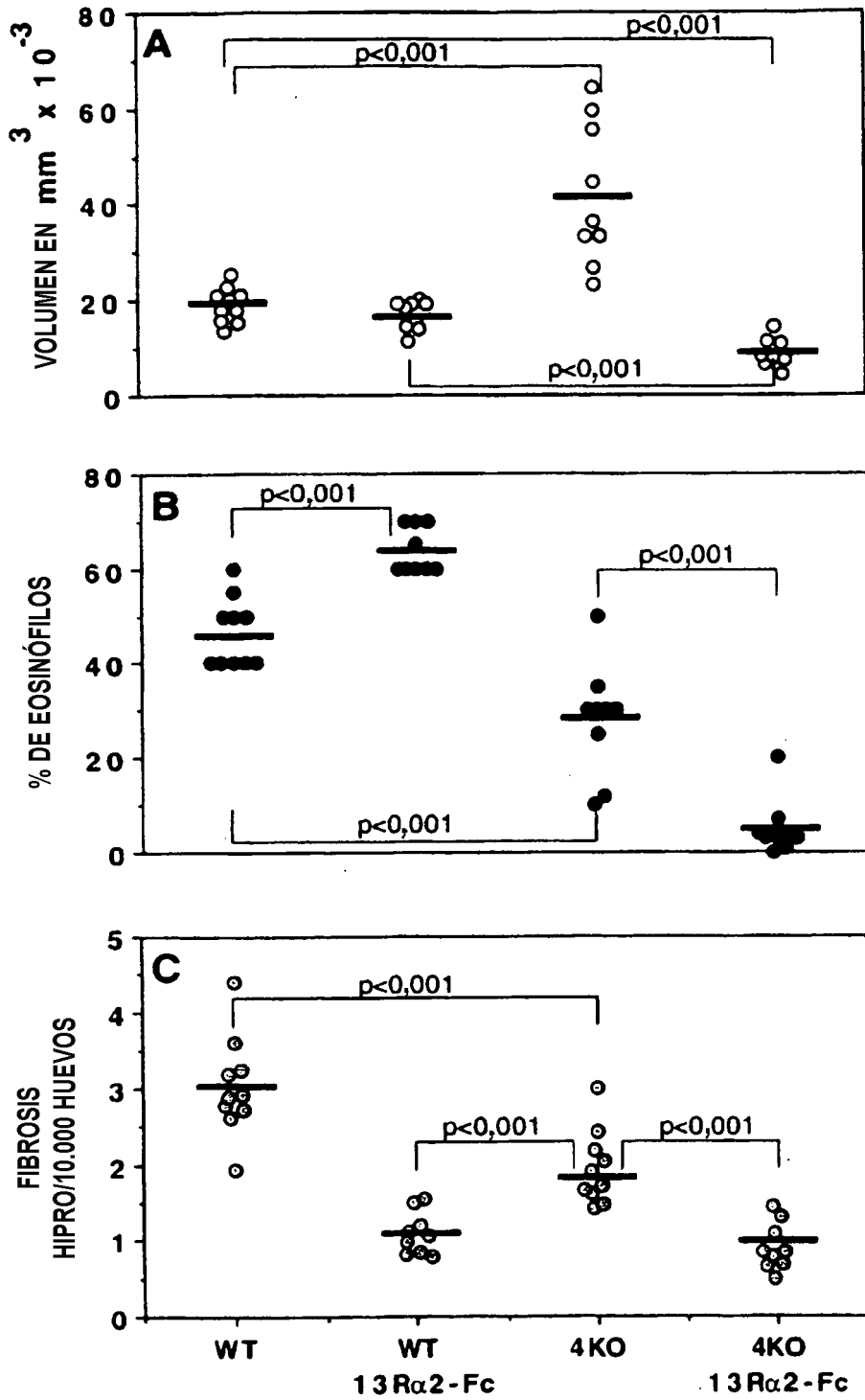


Figura 3

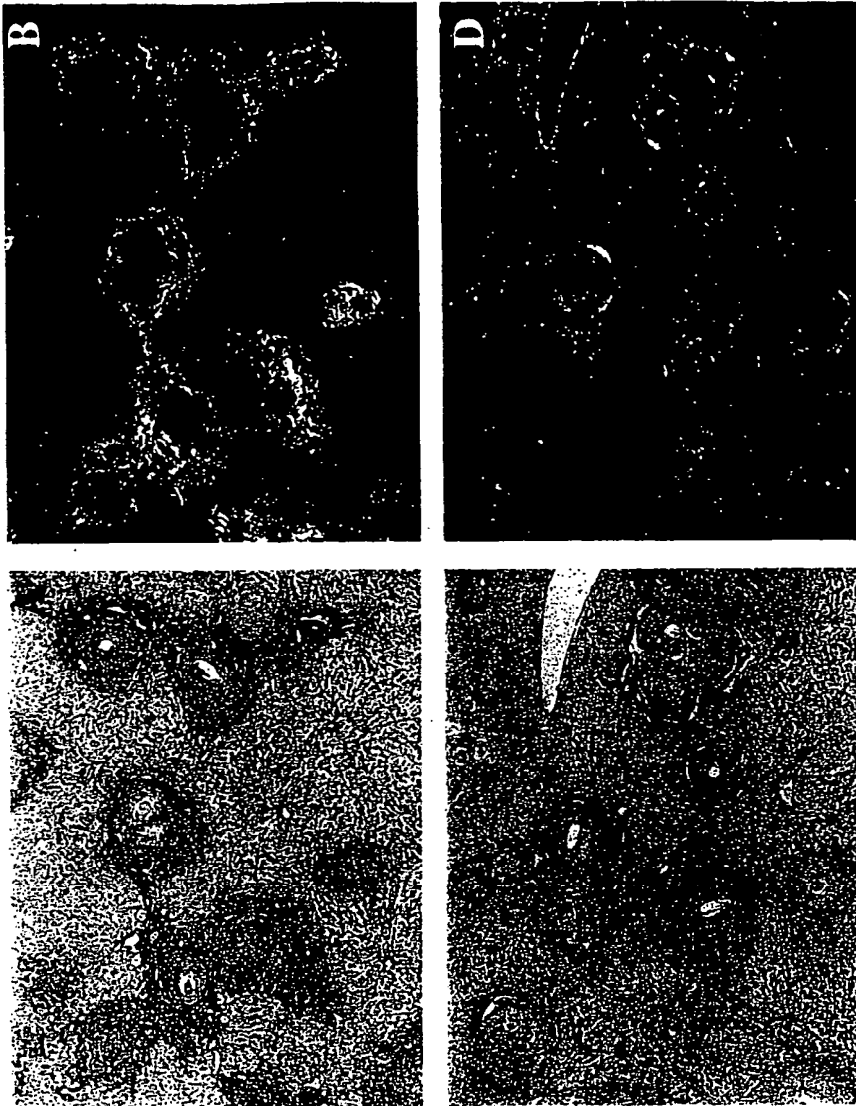


Figura 4A

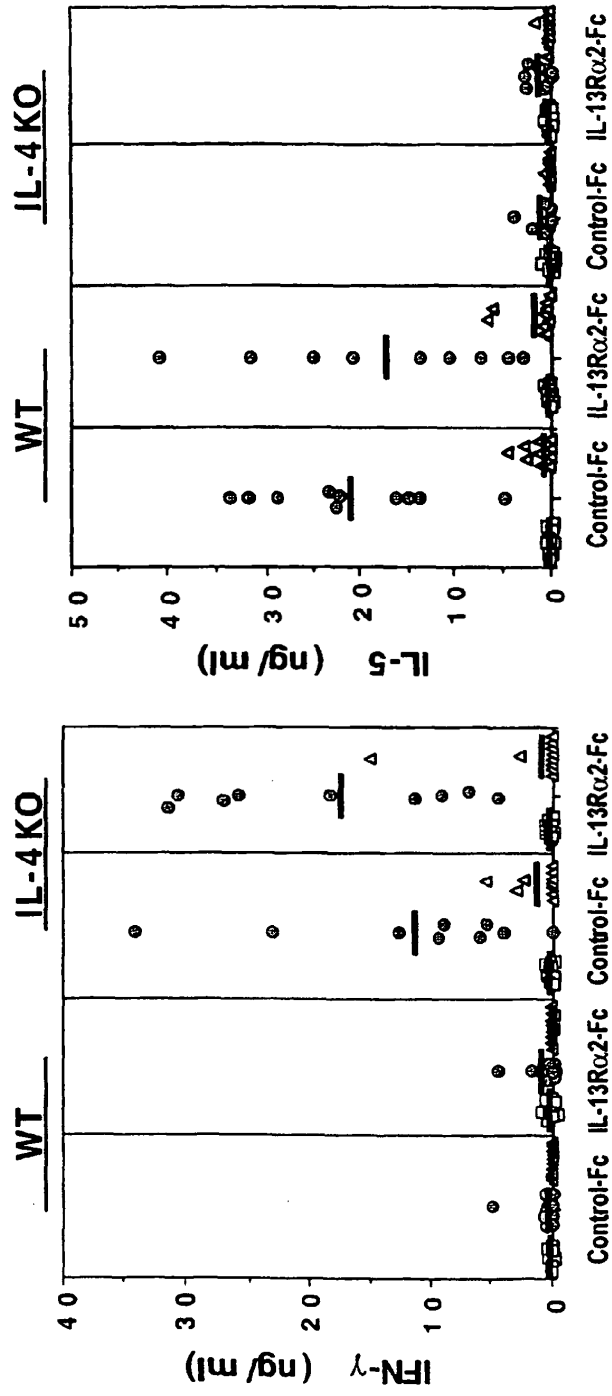


Figura 4B

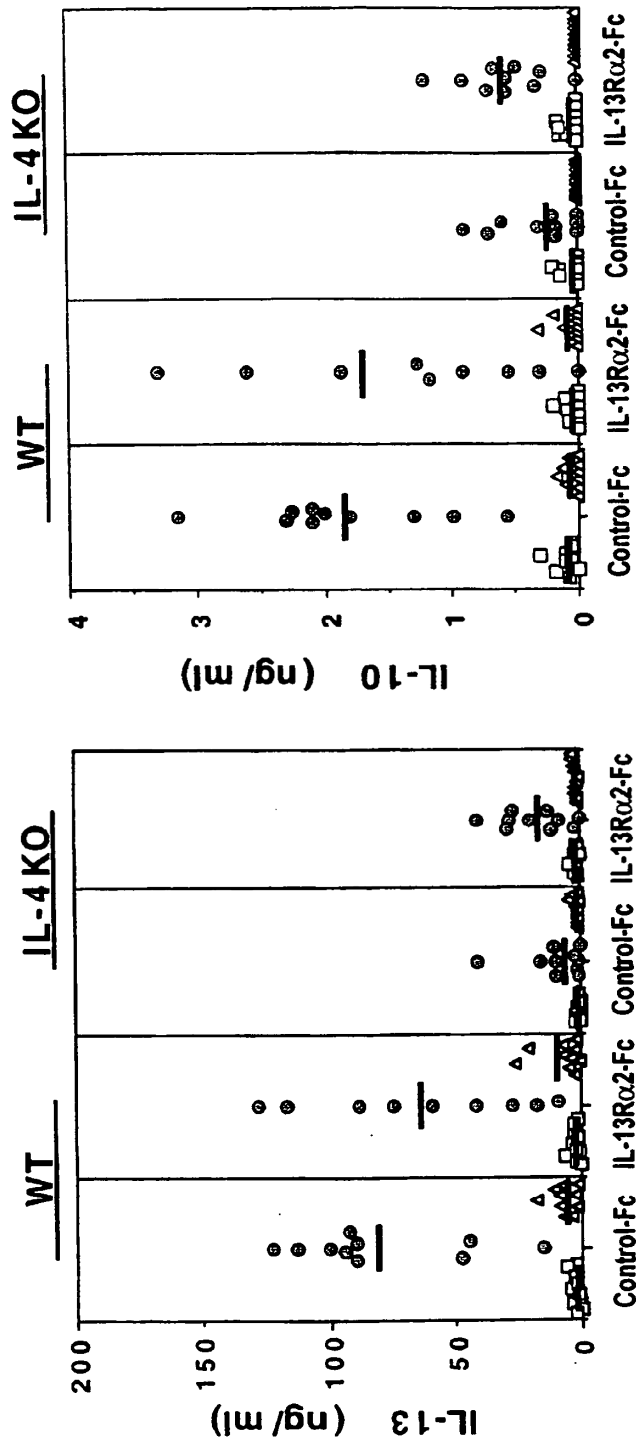


Figura 4C

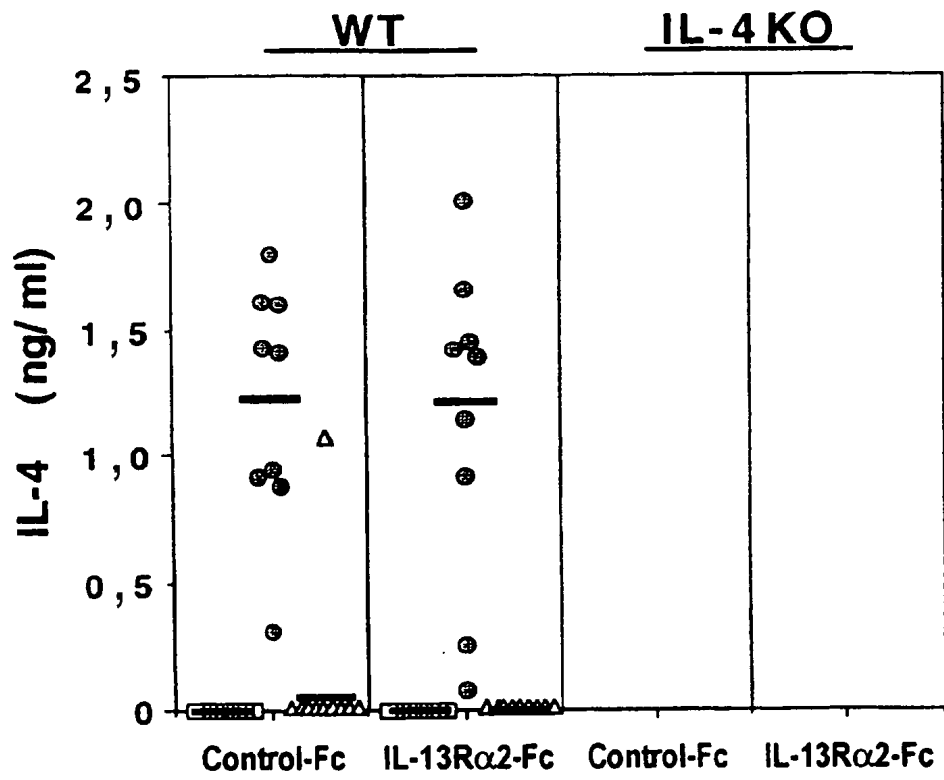


Figura 5

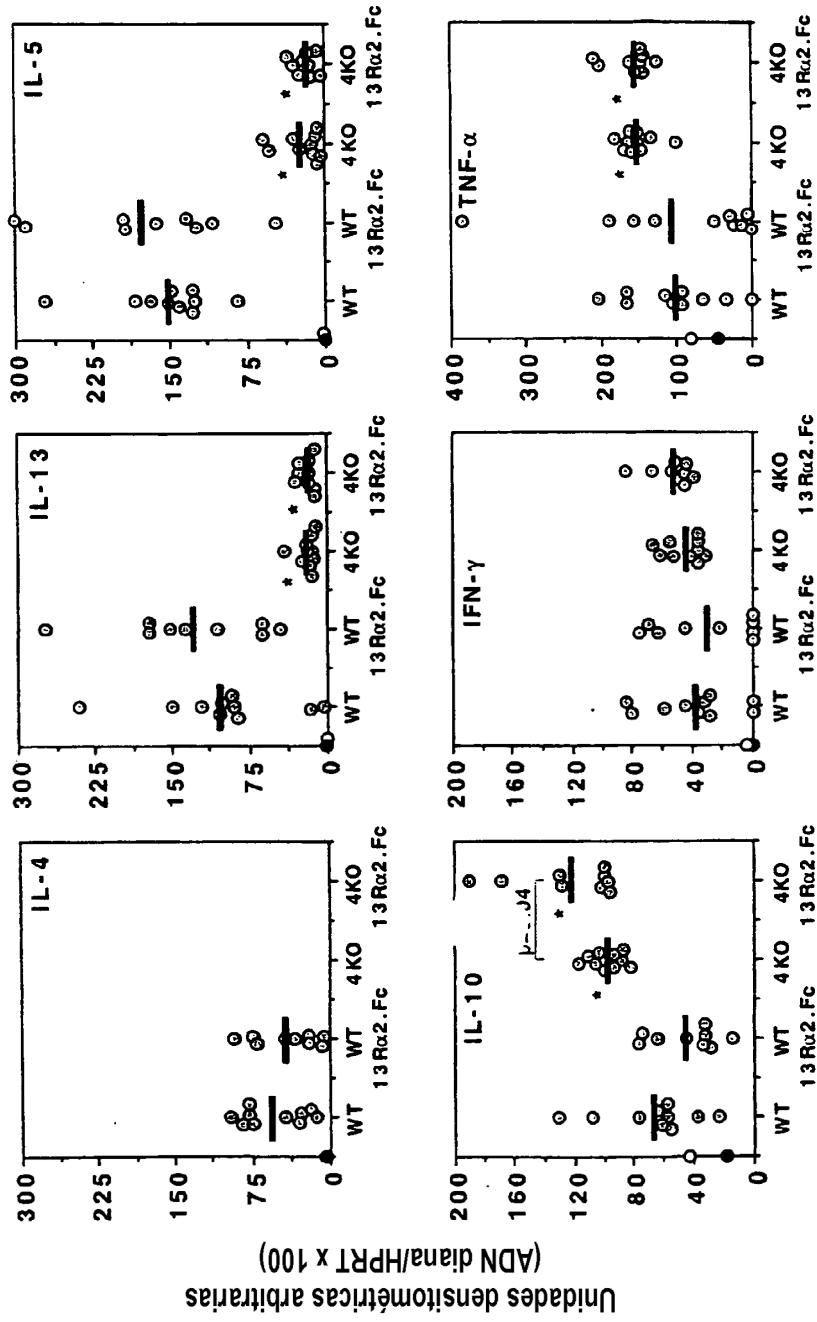


Figura 6

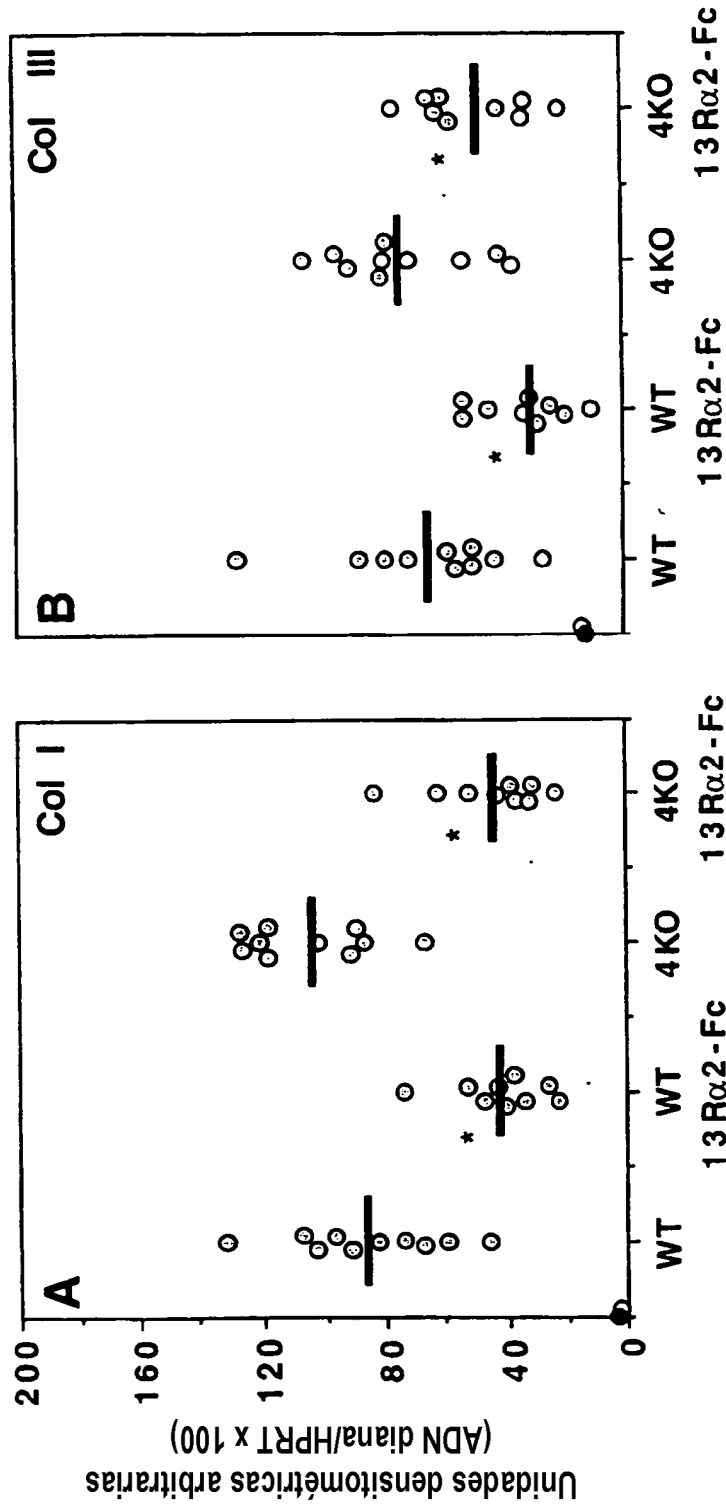
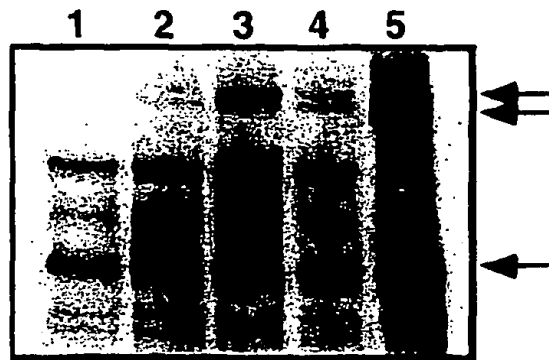


Figura 7

**A**



**B**

