

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 173**

51 Int. Cl.:  
**C07K 16/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05757024 .4**  
96 Fecha de presentación: **30.06.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1802658**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.07.2007**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados contra la interleuquina 13**

30 Prioridad:  
**01.07.2004 GB 0414799**  
**25.10.2004 GB 0423675**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**09.04.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**09.04.2012**

73 Titular/es:  
**GLAXO GROUP LIMITED**  
**GLAXO WELLCOME HOUSE, BERKELEY**  
**AVENUE**  
**GREENFORD, MIDDLESEX UB6 0NN, GB**

72 Inventor/es:  
**ASHMAN, Claire;**  
**CASSIDY, Martin John;**  
**ELLIS, Jonathan Henry y**  
**WATTAM, Trevor Anthony Kenneth**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

**ES 2 378 173 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados contra la interleuquina 13

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a inmunoglobulinas que se unen específicamente a interleuquina 13 (IL-13) y en particular a IL-13 humana (hIL-13). Una forma de realización de la invención se refiere a anticuerpos que se unen específicamente a hIL-13. La presente invención también se refiere a procedimientos para el tratamiento de trastornos o enfermedades con dichas inmunoglobulinas, a composiciones farmacéuticas que comprenden dichas inmunoglobulinas y a procedimientos de fabricación. Otros aspectos de la presente invención serán evidentes de la descripción siguiente.

**Antecedentes de la invención****Interleuquina 13 (IL-13)**

15 La IL-13 es una citoquina secretada de 12 kDa descrita originalmente como una citoquina derivada de las células T que inhibe la producción de citoquinas inflamatorias. Los estudios estructurales indican que tiene una disposición de cuatro hélices en haz sujetas por dos enlaces disulfuro. Aunque IL-13 tiene cuatro sitios de glicosilación potenciales, el análisis de IL-13 nativa de pulmón de rata ha indicado que se produce como una molécula no glicosilada. La expresión de IL-13 humana a partir de células COS-7 y NSO confirma esta observación (Eisenmesser y colaboradores, *J. Mol. Biol.* 2001 310 (1): 231-241, Moy y colaboradores, *J. Mol. Biol.* 2001 310(1):219-230, Cannon-Carlson y colaboradores, *Protein Expression and Purification* 1998 12(2): 239-248). La IL-13 es una citoquina pleiotrópica producida por una variedad de tipos celulares incluyendo células Th2 activadas, mastocitos, basófilos, células dendríticas, queratinocitos y células T NK. También se puede producir por células Th0, Th1, CD8 y células T CD45RA<sup>+</sup> naif. La IL-13 tiene actividades inmunorreguladoras que se superponen parcialmente con aquellas de IL-4, esta redundancia se puede explicar por los componentes compartidos en los receptores para IL-4 y IL-13. La IL-13 se señaliza a través del receptor para IL-4 de tipo II que es un heterodímero que comprende las cadenas IL-4R $\alpha$  e IL-13R $\alpha$ 1. La IL-13R $\alpha$ 1 se une a IL-13 con baja afinidad (Kd = 2-10 nM), pero cuando está emparejado con IL-4R $\alpha$  se une con una afinidad elevada (Kd = 400 pM) y forma un receptor funcional para IL-13 (el receptor humano se denomina en el presente documento "hIL-13R") que señaliza, produciendo la activación de las vías de JAK/STAT e IRS-1/IRS-2. También se ha caracterizado una cadena adicional del receptor para IL-13 (IL-13R $\alpha$ 2) que se une a IL-13 con una afinidad elevada (Kd = 250 pM) pero no señaliza, en su lugar se cree que actúa como un receptor señuelo. Los receptores funcionales para IL-13 se expresan en un amplio intervalo de células incluyendo células del epitelio de las vías aéreas, músculo liso, mastocitos, eosinófilos, basófilos, células B, fibroblastos, monocitos y macrófagos. Las células T no tienen receptores funcionales para IL-13 (Hilton y colaboradores, PNAS 1996 93(1): 497-501; Caput y colaboradores, *J. Biol. Chem* 1996 271(28):16921-16926; Hershey GK, *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003 111(4):677-690).

35 Ambas IL-13 e IL-4 actúan para modificar las respuestas inflamatorias e inmunitarias promoviendo la inflamación asociada a la alergia y suprimiendo la inflamación debida a bacterias, virus y patógenos intracelulares. Los efectos biológicos principales de IL-13 incluyen; inducción de la proliferación de células B y regulación del isotipo cambiando a IgE; inducción del MHC II y expresión de CD23 en células B y monocitos; regulación vía arriba de VCAM-1 en células endoteliales; regulación de la producción de quimioquinas; activación de la función de mastocitos, eosinófilos y neutrófilos así como la inhibición de la expresión de genes pro-inflamatorios en poblaciones de monocitos y macrófagos. La IL-13 no tiene ningún efecto proliferativo sobre las células T. Así, a diferencia de IL-4, IL-13 no parece ser importante en la diferenciación inicial de las células T CD4 a células del tipo Th-2, pero parece ser bastante importante en la fase efectora de la inflamación alérgica (McKenzie y colaboradores, PNAS 1993 90(8):3735-3739; Wynn TA, *Annu. Rev. Immunol.* 2003 21:425-456).

**IL-13 y asma**

45 El asma es una enfermedad pulmonar crónica, provocada por la inflamación de las vías respiratorias inferiores y caracterizada por problemas respiratorios recurrentes. Las vías respiratorias de los pacientes son sensibles y se dilatan o inflaman en algún grado todo el tiempo, incluso cuando no hay síntomas. La inflamación provoca el estrechamiento de las vías respiratorias y reduce el flujo de aire hacia dentro y hacia fuera de los pulmones, haciendo difícil la respiración y dando como resultado respiración sibilante, constricción en el pecho y tos. El asma se desencadena por una sensibilidad inapropiada a alérgenos (por ejemplo, ácaros del polvo, pólenes, mohos), agentes irritantes (por ejemplo, humo, gases, olores fuertes), infecciones respiratorias, ejercicio y clima seco. Los desencadenantes irritan las vías respiratorias y el recubrimiento de las vías respiratorias se dilata para inflamarse aún más, el moco atasca las vías respiratorias y los músculos que rodean las vías respiratorias se tensan hasta que la respiración se vuelve difícil y estresante y aparecen los síntomas del asma.

55 Hay evidencias sólidas de modelos animales y pacientes de que la inflamación asmática y otras patologías se producen por la respuesta de Th2 desreguladas a aeroalérgenos y otros estímulos (Busse y colaboradores, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995 152(1):388-393). En particular, se cree que IL-13 es la citoquina efectora principal que

conduce a una variedad de respuestas celulares en el pulmón, incluyendo hiperreactividad de las vías respiratorias, eosinofilia, metaplasia de las células de Globet e hipersecreción de moco.

#### **Evidencias clínicas del papel de IL-13 en el asma**

5 El gen que codifica para IL-13 está localizado en el cromosoma 5q31. Esta región también contiene genes que codifican para la IL3, IL-4, IL5, IL9 y el GM-CSF, y se ha relacionado con el asma. Las variantes genéticas de IL-13 que se asocian al asma y la atopia se han encontrado tanto en el promotor como en las regiones codificantes (Vercelli D, *Curr. Opin. Allergy. Clin. Immunol.* 2002 2(5):389-393). Están disponibles los datos del estudio funcional para la variante codificante, IL-13 Q130 (denominada en el presente documento "IL-13 Q130"). El polimorfismo de un único nucleótido (SNP) +2044 G a A encontrado en el cuarto exón, produce la sustitución de una arginina por una glutamina en la posición 130 (IL-13 Q130). Nótese también que en la ID SEC N°: 9, esto es equivalente a la posición 110, en la que el primer residuo aminoácido 'G' al comienzo de la secuencia de aminoácidos de IL-13 humana madura es la posición 1. Se ha encontrado que esta variante está asociada al asma, niveles incrementados de IgE y dermatitis atópica en poblaciones europeas y japonesas. Se cree que IL-13 Q130 tiene una estabilidad mejorada comparada con el tipo silvestre de IL-13. También tiene una afinidad ligeramente inferior por el receptor señuelo de IL-13R $\alpha$ 2 y consistente con estas observaciones, se han encontrado niveles séricos medios de IL-13 superiores en pacientes homocigóticos para la variante IL-13 Q130 comparados con pacientes no homocigóticos. Estos resultados indican que IL-13 Q130 podría influir en las concentraciones local y sistémica de IL-13 (Kazuhiko y colaboradores, *J. Allergy. Clin. Immunol.* 2002 109(6):980-987).

20 Se han medido niveles elevados de IL-13 en ambos asmáticos atópicos y no atópicos. En un estudio, se midieron niveles séricos medios de IL-13 de 50 pg/ml en pacientes asmáticos comparados con 8 pg/ml en pacientes control normales (Lee y colaboradores, *J. Asthma* 2001 38(8):665-671). También se han medido niveles incrementados de IL-13 en plasma, fluido de lavado bronco-alveolar, muestras de biopsia de pulmón y esputos (Berry y colaboradores, *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004 114(5):1106-1109; Kroegel y colaboradores, *Eur. J. Respir* 1996 9(5):899-904; Huang y colaboradores, *J. Immunol.* 1995 155(5):2688-2694; Humbert y colaboradores, *J. Allergy Clin. Immunol.* 1997. 99(5):657-665).

#### **Evidencias *in vivo* de la implicación de IL-13 en el asma**

30 Una serie de estudios han definido un papel efector crítico para IL-13 en la conducción a la patología en cualquiera de los dos modelos murinos crónico y agudo de asma alérgica. Se han usado receptores para IL-13 de alta afinidad (IL-13R $\alpha$ 2) o anticuerpos policlonales anti-IL-13 para neutralizar la bioactividad de IL-13 de ratón en estos modelos. El bloqueo de IL-13 en el momento de la exposición al alérgeno inhibe completamente la hiper-respuesta de las vías aéreas inducidas por OVA, la eosinofilia y la metaplasia de las células de Globet. En contraste, la administración de anticuerpos para IL-4 después de la sensibilización y durante la fase de exposición al alérgeno sólo reduce parcialmente el fenotipo del asma. Así, aunque ambas IL-4 e IL-13 exógenas son capaces de inducir un fenotipo similar al asma, la actividad efectora para IL-13 parece ser superior que para IL-4. Estos datos sugieren un papel principal para IL-4 en la inducción inmunitaria (particularmente para el reclutamiento y el desarrollo de las células Th2 en las vías aéreas, y en la producción de IgE), mientras que IL-13 se cree que está ligada principalmente a diversas respuestas efectoras, incluyendo la hiper-respuesta de las vías aéreas, la superproducción de moco y la inflamación celular (Wills-Karp y colaboradores, *Science* 1998, 282:2258-2261; Grunig y colaboradores, *Science* 1998 282:2261-2263; Taube y colaboradores, *J. Immunol.* 2002 169:6482-6489; Blease y colaboradores, *J. Immunol* 2001 166(8):5219-5224).

45 En experimentos complementarios, los niveles de IL-13 pulmonar han sido incrementados por sobre-expresión en ratones transgénicos o por instilación de la proteína IL-13 en la tráquea de ratones de tipo silvestre. En ambos grupos, se indujeron las características similares al asma: hiper-respuesta no específica de las vías aéreas a estimulación colinérgica, eosinofilia pulmonar, hiperplasia de las células epiteliales, metaplasia de las células mucosas, fibrosis sub-epitelial, obstrucción de las vías aéreas y cristales de tipo Charcot-Leyden. Además, se encontró que IL-13 es un potente estimulador de las metaloproteinasas de la matriz y las proteasas catépsina en el pulmón, dando como resultado cambios enfisematosos y metaplasia de la mucosa. Por tanto, IL-13 puede ser una molécula efectora importante tanto en el asma como en los fenotipos de la enfermedad EPOC (Zhu y colaboradores, *J. Clin. Invest.* 1999 103(6):779-788, Zheng y colaboradores, *J. Clin. Invest.* 2000 106(9):1081-1093).

50 Estos datos indican que la actividad de IL-13 es necesaria y suficiente para producir varias de las características patológicas y clínicas principales del asma alérgica en modelos animales bien validados.

#### **Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)**

55 EPOC es un término amplio que cubre varios síndromes clínicos, incluyendo enfisema y bronquitis crónica. Los síntomas son similares al asma y la EPOC se puede tratar con los mismos fármacos. La EPOC se caracteriza por una obstrucción crónica, progresiva y en gran parte irreversible, del flujo de aire. La contribución individual al curso de la enfermedad es desconocida, pero se piensa que fumar cigarrillos provoca el 90% de los casos. Los síntomas incluyen tos, bronquitis crónica, disnea e infecciones respiratorias. En última instancia la enfermedad conducirá a una

incapacidad grave y a la muerte. Se ha diagnosticado la bronquitis crónica en pacientes con un historial de tos y producción de esputos la mayoría de los días, al menos 3 meses durante 2 años sin ninguna otra explicación. El enfisema del pulmón se caracteriza por un anómalo aumento permanente de los espacios de aire y la destrucción de las paredes alveolares.

5 IL-13 puede jugar un papel en el desarrollo de la EPOC. Los humanos fumadores que desarrollan la EPOC tienen muchos tipos de células inflamatorias (neutrófilos, macrófagos, eosinófilos) en el parénquima del pulmón. Por tanto, IL-13 es una citoquina de Th2 pro-inflamatoria en el modelo del desarrollo del enfisema; Zheng y colaboradores fijaron como objetivo la sobre-expresión de IL-13 en el epitelio de las vías aéreas en la IL-13 de ratones transgénicos. Estos animales desarrollaron inflamación y enfisema en las vías aéreas y en el parénquima del  
10 pulmón. También desarrollaron metaplasia de la mucosa, reminiscencia de la bronquitis crónica (J. Clin. Invest. 2000 106(9): 1081-1093).

El polimorfismo promotor de IL-13 (-1055 C a T), que está asociado con el asma alérgica, ha sido también tener una frecuencia en pacientes con EPOC en comparación con los controles de salud. Esto implica un papel funcional para el polimorfismo promotor de IL-13 en el riesgo aumentado de desarrollar la EPOC (Kraan y colaboradores, Genes and Immunity 2002 3:436-439). Además un creciente número de células positivas de IL-13 y IL-4 se observaron en fumadores bronquitis crónica en comparación con fumadores asintomáticos (Miotto y colaboradores. Eur. Resp. J. 2003 22:302-608). Sin embargo un estudio reciente para evaluar el nivel de la expresión IL-13 en los pulmones de pacientes con enfisema grave no encontraron una asociación entre los niveles de IL-13 y la enfermedad (Boutten y colaboradores, Thorax 2004 59:850-854).

20 **Enfermedades alérgicas incluyendo dermatitis atópica y rinitis alérgica**

IL-13 ha estado también implicado en trastornos atópicos, tales como rinitis atópica y dermatitis atópica. La rinitis alérgica es la más común de las enfermedades atópicas en los Estados Unidos y se estima que afecta al 25% de los adultos y a más del 40% de los niños. Existe una estrecha relación entre rinitis alérgica y asma. Ambas enfermedades comparten una inmunopatología y una patofisiología comunes: tienen procesos inmunológicos similares, en los que los eosinófilos y linfocitos de Th2 juegan un papel en el tejido nasal y bronquial. Una producción excesiva de citoquinas de Th2, particularmente IL-4 y IL-5, se ha pensado que es fundamental en la patogénesis de las enfermedades alérgicas. IL-13 comparte varias características y funciones efectoras con IL-4 y ésta, combinada con la superposición funcional en el uso del receptor de IL-4 y IL-13, componentes de señal intracelular, y organización genética proporciona una evidencia convincente para un papel de IL-13 en promover o  
25 mantener la inmediata hipersensibilidad humana in vivo. Esto ha sido corroborado por Li y colaboradores (Li y colaboradores, J. Immunol 1998; 161:7007), quienes demostraron que los sujetos atópicos con rinitis alérgica estacional manifestaban respuestas significativamente más fuertes al IL-13, en respuesta a la activación dependiente de Ag, pero no policlinal.

La dermatitis atópica es una enfermedad común, crónica que afecta a la piel, recayente, con elevada inflamación en forma de prurito. La piel lesionada de los pacientes con dermatitis atópica está histológicamente caracterizada por una célula T inflamatoria infiltrada, que durante fases agudas se asocia con una expresión predominante de IL-4, IL-5 y IL-13 (Simon y colaboradores, J Allergy Clin Immunol 2004; 114:887; Hamid y colaboradores, J. Allergy Clin Immunol 1996; 98:225). Además, Tazawa y colaboradores han demostrado que IL-13 mRNA (pero no IL-4) está significativamente aumentada en lesiones cutáneas subagudas y crónicas de pacientes con dermatitis atópica (Tazawa y colaboradores, Arch Derm Res 2004; 296:459). La frecuencia de IL-13 expresando circulación CD4+ y CD8+, células T, ha aumentado significativamente en estos pacientes (Aleksza y colaboradores, British J Dermatol 2002; 147; 1135). Esta actividad de IL-13 incrementada se pensó para resultar en niveles elevados de suero IgE, contribuyendo de este modo a la patogénesis de la dermatitis atópica. Además la producción incrementada de IL-13 por CD4 + células T neonatales es un marcador útil para identificar recién nacidos en riesgo elevado de desarrollar posteriormente enfermedades alérgicas, especialmente dermatitis atópica (Ohshima y colaboradores. Pediatr Res 2002; 51:195). Una evidencia más de la importancia de IL-13 en la etiología de la dermatitis atópica fue facilitada por Simon y colaboradores (Simon y colaboradores, J Allergy Clin Immunol 2004; 114:887); un tratamiento tóxico con pomada de tacrolimus (un fármaco inmunosupresivo que inhibe las vías de señal intracelular para la producción de citoquina) resultó en una mejora clínica e histológica de las lesiones atópicas de la piel, acompañada de significativas reducciones en la expresión local de las citoquinas de Th2. Incluida IL-13. Además IL-13 R $\alpha$ 1 (una proteína de la superficie de la célula que junto con IL-4 R $\alpha$ 1 forma un receptor funcional para IL-13) ha sido mostrada para ser sobre-expresada en los queratinocitos suprabasales en la piel de pacientes con dermatitis atópica, y IL-13 era capaz de regular a la alta IL-13 R $\alpha$ 1 mRNA in vitro (Wongpiyabovorn y colaboradores, J Dermatol Science 2003: 33:31). Estos datos indican colectivamente que IL-13 fijó como objetivo intervenciones, incluyendo un anticuerpo monoclonal IL-13, puede proporcionar un enfoque efectivo para el tratamiento de enfermedades alérgicas humanas.  
55

**Eosinofilia esofágica**

La acumulación de eosinófilos en el esófago es un problema médico común en pacientes con diversas enfermedades, incluidas las enfermedades de reflujo gastro-esofágico, esofagitis eosinofílica, gastroenteritis eosinofílica, e infecciones parasitarias. La eosinofilia esofágica está asociada con respuestas alérgicas, y repite el

desafío de ratones con aeroalergenos, establece un enlace entre la inflamación alérgica de las vías respiratorias y la eosinofilia esofágica. Las células Th2 están pensadas para inducir inflamación asociada a los eosinófilos, a través de la secreción de una serie de citoquinas, incluidas IL-4 y IL-13, que activan vías inflamatorias y de efector, directa e indirectamente. IL-13 parece ser particularmente importante, porque se produce en elevadas cantidades mediante células Th2 y regula múltiples rasgos de enfermedades alérgicas (por ejemplo producción de IgE, sobre-producción de moco, captación y supervivencia de eosinófilos e hiperreactividad de las vías respiratorias. Los eosinófilos pueden generar funcionalmente activos IL-13, después de exposición a GM-CSF y/o bajo condiciones *in vitro*, *ex vivo*, e *in vivo* en respuestas de inflamación eosinofílica (Schmid-Grendelmeier *J Immunology*, 2002, 169: 1021-1027). IL-13 entregó al pulmón de tipo difícil, STAT-6, eotaxina-1 o IL-5 de ratones defectuosos mediante administración intratraqueal, estableció que la inflamación pulmonar, activada por IL-13, está asociada con el desarrollo de la eosinofilia esofágica (Mishra y colaboradores, *Gastroenterol* 2003; 125:1419). En resumen, estos datos proporcionan evidencias de un papel de IL-13 en la eosinofilia esofágica.

### **Indicaciones oncológicas**

Otra área de interés importante está en fijar como objetivo IL-13 o receptores de IL-13 para inhibir el crecimiento de ciertos tipos de tumores. El tipo 1 de células hospedadoras medias está considerado para mediar un rechazo *in vivo* del tumor, y la desviación a una respuesta de tipo Th2 puede contribuir al bloqueo del rechazo del tumor y/o la promoción de la reaparición del tumor (Kobatachi M y colaboradores, *J. Immunol.* 1998; 160:5869). Varios estudios de animales usando series de células de tumor transplantables apoyan esta idea demostrando que Stat6, IL-4, y IL-13 (producidos en parte por células NKT) eran capaces de inhibir el rechazo del tumor (Teraba y colaboradores, *Nat. Immunol.* 2000;1:515; Kacha y colaboradores, *J. Immunol.* 2000;165:604-28; Ostrand-Rosenberg y colaboradores, *J. Immunol.* 2000;165:6015). La potente actividad anti tumor en la ausencia de Stat-6 parece ser debida a la mejora de la producción IFN $\gamma$  específica de tumor y la actividad CTL. Además una pérdida de células NKT ha sido mostrada para reducir la producción de IL-13 con un aumento concomitante en la reaparición del tumor, indicando que IL-13, producida en parte por células NKT es importante para la inmunovigilancia (Terabe y colaboradores. *Nat. Immunol.* 2000; 1:515). Como tal, estos resultados sugieren que los inhibidores de IL-13 o los novedosos antagonistas IL-13, incluido IL-13 mAb, pueden ser efectivos como inmunoterapéuticos para el cáncer, mediante la interferencia con el regulador negativo IL-13 activa regulando a la baja respuestas inmunes a las células cancerígenas.

Además de aumentar las defensas anti tumor asociadas al tipo 1 de Th, los inhibidores de IL-13 pueden también ser capaces de bloquear el crecimiento de las células cancerígenas más directamente. Por ejemplo en la leucemia linfocítica crónica de célula B (B-CLL) y la enfermedad de Hodgkin, IL-13 o bloquea apoptosis o promueve la proliferación de la célula del tumor (Chaouchi y colaboradores, *Blood* 1996; 87:1022; Kapp y colaboradores *J. Exp. Med.* 1999; 189:1939). B-CLL es una enfermedad clínicamente heterogénea, con origen en los linfocitos B, que implica un defecto apoptótico en las células con leucemia. IL-13 no está pensado para actuar como un factor de crecimiento directo, pero protege a las células del tumor procedentes de la apoptosis espontánea *in vitro* (Chaouchi y colaboradores *Blood* 1996; 87:1022; Lai y colaboradores, *J. Immunol.* 1999; 162:78) y puede contribuir a B-CLL mediante prevención de la muerte de las células neoplásicas.

La enfermedad de Hodgkin es un tipo de linfoma que afecta primero a adultos jóvenes y cuenta con alrededor de 7.500 casos al año en los Estados Unidos. El cáncer se caracteriza por la presencia de gran cantidad de células (H/RS) de múltiples núcleos Hodgkin/Reed-Stemberg. En un gran número de casos la población de células malignas surge de las células B: Varias enfermedades de Hodgkin derivaron series de células, así como también un tejido de nódulo linfático cogido de los pacientes con linfoma Hodgkin, expresa IL-13 y/o receptores IL-13 (Kapp y colaboradores, *J. Exp. Med.* 1999; 189:1939; Billard y colaboradores. *Eur Cytokine Netw* 1997; 8:19; Skinnider y colaboradores. *Blood* 2001; 97:250; Oshima y colaboradores, *Cell Immunol* 2001; 211:37).

Se ha mostrado que la neutralización de mAbs anti-IL-13 o agonistas de IL-13 inhibe la proliferación celular de H/RS de manera dependiente de la dosis (Kapp et al. *J. Exp. Med.* 1999; 189:1939; Oshima et al, *Cell Immunol* 2001; 211:37). De forma similar, la administración de receptor señuelo de IL-13Ra2 soluble para ratones NOD/SCID con una línea celular derivada de enfermedad de Hodgkin implantada retrasó la aparición y el crecimiento de tumor, y potenció la supervivencia, demostrando que la neutralización de IL-13 puede suprimir el crecimiento del linfoma de Hodgkin *in vitro* e *in vivo* (Trieu et al. *Cancer Research* 2004;64:3271). De forma colectiva, estos estudios indicaron que IL-13 estimula la proliferación de células H/RS de forma autocrina (Kapp et al. *J. Exp. Med.* 1999; 189:1939; Ohshima et al. *Histopathology* 2001; 38:368).

Por lo tanto, la neutralización de IL-13 puede representar un tratamiento atractivo y eficaz para la enfermedad de Hodgkin y para otros cánceres asociados a células B inhibiendo el crecimiento celular del tumor y potenciando al mismo tiempo las defensas anti tumor.

### **Enfermedades inflamatorias intestinales**

Existe un posible papel para IL-13 en la patogénesis de la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD). La enfermedad inflamatoria intestinal comprende una serie de enfermedades clasificadas clínicamente como colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y colitis indeterminada. Su manifestación principal en la inflamación intestinal crónica debida a

una respuesta inmunitaria exagerada con un desequilibrio en la activación de linfocitos Th1 y Th2 en la mucosa intestinal. Esto se ha demostrado en modelos animales de la enfermedad de Crohn (Bamias et al. *Gastroenterol* 2005; 128:657) y colitis ulcerosa (Heller et al, *Immunity* 2002; 17: 629). La neutralización de IL-13 por la administración de IL-13R $\alpha$ 2-Fc previno la colitis en un modelo de Th2 murino de colitis ulcerosa humana (Heller et al, *Immunity* 2002; 17:629). Además, la producción de IL-13 reemplaza rápidamente la de IL-4 en este modelo, y la producción de IL-13 se puede inducir por estimulación de células NKT, lo que sugiere que el daño tisular puede resultar de la actividad tóxica de IL-13 en las células del epitelio. Existen algunos datos sobre seres humanos que respaldan estos hallazgos: la frecuencia de especímenes con biopsia rectal positiva para IL-13 de pacientes con colitis ulcerosa fue significativamente mayor que la de los sujetos de control inflamatorio y no inflamatorio, y se observó una expresión de IL-4 y IL-13 de tasa mayor en colitis ulcerosa aguda que en no aguda (Inoue et al. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2441). Además, Akido et al caracterizaron la actividad inmunitaria en la muscularis externa a partir de segmentos intestinales de pacientes con enfermedad de Crohn y hallaron que la hipercontractilidad mediada por IL-4 y IL-13 de las células del músculo liso intestinal por medio de una ruta de STAT-6. Los autores concluyeron que esta ruta puede contribuir a la hipercontractilidad de los músculos intestinales en la enfermedad de Crohn (Akiho et al., *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288:619).

Por tanto, un IL-13 mAb, posiblemente en combinación con moléculas dirigidas a otras citoquinas, puede proporcionar un enfoque para detener o ralentizar la progresión de IBD.

### Psoriasis y artritis psoriásica

La psoriasis es una enfermedad cutánea crónica caracterizada por hiperproliferación de queratinocitos y un infiltrado celular inmunológico, que incluye linfocitos T activados, produciendo diversas citoquinas que pueden influenciar el fenotipo de queratinocitos epidérmicos. CDw60 es una molécula que porta carbohidratos que está regulada por aumento sobre la superficie de queratinocitos basales y suprabasales psoriásicos de piel psoriásica. Se ha demostrado que las IL-4 y IL-13 secretadas de linfocitos T derivados de lesiones psoriásicas regulan por aumento fuertemente la expresión de CDw60 en queratinocitos, (Skov et al., *Am J Pathol* 1997;15:675), mientras que interferón-gamma bloqueó la inducción mediada por IL-4/IL-13 de CDw60 en queratinocitos cultivados (Huang et al., *J Invest Dermatol* 2001;116:305). Por tanto, se cree que la expresión de CDw60 en queratinocitos epidérmicos psoriásicos está inducida, al menos en parte, por IL-13 secretado por linfocitos T activados dentro de la lesión. Además, IL-13 R $\alpha$ 1 y IL-4R $\alpha$ , proteínas de la superficie celular que juntas forman un complejo receptor para IL-13, se expresan de manera diferente en biopsias cutáneas de pacientes con y sin psoriasis (Cancino-Diaz et al., *J Invest Dermatol* 2002; 119:1114; Wongpiyabovorn et al., *J Dermatol Science* 2003;33:31), y experimentos *in vitro* demostraron que IL-13 (pero no IL-4) pudo regular con aumento la expresión de IL-13R $\alpha$ 1 (Wongpiyabovorn et al., *J Dermatol Science* 2003;33:31). Ya que IL-13 tiene un efecto sobre varios tipos de células, estos estudios sugieren que el receptor de IL-13 puede desempeñar una parte en el proceso inflamatorio temprano de la psoriasis.

La artritis psoriásica se caracteriza por sinovitis, que está mediada por citoquinas tanto pro-inflamatorias como anti-inflamatorias. El papel de IL-13 en diversas formas de artritis está suscitando un interés creciente. Spadaro et al han observado niveles significativamente más altos de IL-13 en fluido sinovial de pacientes con artritis psoriásica y artritis reumatoide que en los pacientes con osteoartritis. Además, los niveles de fluido sinovial de IL-13 fueron significativamente más altos que los del suero en pacientes con artritis psoriásica, y la proporción de fluido sinovial de IL-13/suero fue marcadamente más alto en el grupo de artritis psoriásica que en el grupo de artritis reumatoide, lo que sugiere un posible papel para la IL-13 producida localmente en tejidos sinoviales de pacientes con artritis psoriásica (Spadaro et al., *Ann Rheum Dis* 2002; 61:174).

### Papel potencial de IL-13 en otras afecciones

La enfermedad de injerto frente a huésped aguda es un caso grave de morbilidad y mortalidad tras trasplante de células madre y está relacionado directamente con el grado de incompatibilidad de antígenos de leucocitos humanos (HLA) entre el donante y el receptor. Jordan et al identificaron en primer lugar IL-13 como una citoquina de Th2 típica que se produce abundantemente durante MLR no relacionadas, no emparejadas (reacción de linfocitos mezclados; un ensayo *in vitro* para selección de donantes por ajuste después de tipificación de HLA inicial) (Jordan et al. *J Immunol Methods*; 2002;260:1). El mismo grupo mostró posteriormente que la producción de IL-13 por linfocitos T donantes es predictiva de la enfermedad de injerto frente a huésped aguda (aGVHD) tras trasplante de células madre de donadores no relacionados (Jordan et al. *Blood* 2004; 103:717). Todos los pacientes con aGVHD de grado III grave tras trasplante de células madre tuvieron donantes que produjeron respuestas de IL-3 pretrasplante muy altas, demostrando una conexión significativa entre los niveles de IL-13 y aGVHD y aumentando la posibilidad de que IL-13 pueda ser directamente responsable de alguna patología asociada a la aGVHD. En consecuencia, un tratamiento basado en un bloqueo específico de IL-13 puede ser útil para el tratamiento de aGVHD por postrasplante de células madre.

La nefropatía diabética es una de las principales causas de nefropatía terminal en el mundo occidental. Aunque la incidencia de nefropatía perteneciente a diabetes de tipo 1 está decayendo, la diabetes mellitus de tipo 2 es ahora la causa individual más común de insuficiencia renal en EE.UU, Japón y Europa. Además, este grupo de pacientes tiene un pronóstico muy pobre sobre el mantenimiento de diálisis perteneciente a una mortalidad extremadamente

alta provocada por sucesos cardiovasculares. Ahora está cada vez más claro que los cambios hemodinámicos, metabólicos y estructurales están entrelazados, y se ha identificado que diversas enzimas, factores de transcripción y factores de crecimiento desempeñan un papel en la patogénesis de esta enfermedad. En particular, TGF- $\beta$  es importante en el desarrollo de hipertrofia renal y acumulación de componentes de matriz extracelular, y se considera la citoquina fundamental en la mediación de la formación de citoquina en el riñón (Cooper. Diabetologia 2001; 44:1957; Wolf. Eur J Clin Invest 2004; 34 (12): 785). En nefropatía diabética experimental y humana la bioactividad de TGF-1 se incrementa y la administración de anticuerpos de TGF- $\beta$ 1 a un ratón diabético conduce a una mejora en la función renal y a una acumulación de matriz extracelular reducida. Recientemente se mostró que IL-13 en un modelo de ratón transgénico de fibrosis pulmonar media sus efectos al menos en parte regulando la producción y activación de TGF- $\beta$ 1 y el depósito de colágeno (Lee et al. J. Exp. Med. 2001; 194:809; Zhu et al. J. Clin. Invest. 1999; 103:779), estableciendo de este modo una conexión funcional directa entre IL-13 y TGF- $\beta$ . En consecuencia, se puede prever un papel similar para IL-13 en la regulación de la actividad de TGF- $\beta$ 1 en el riñón diabético y las intervenciones dirigidas de IL-13 podrían tener potencialmente un papel en el control de la nefropatía diabética.

### Afecciones fibróticas

La fibrosis pulmonar es una afección por la cicatrización perjudicial e inapropiada de los pulmones, que conduce a una incapacidad y a menudo a la muerte. El término engloba una variedad de dolencias diferentes con distintas etiologías, patologías y respuestas al tratamiento. En algunos casos la causa de la fibrosis está identificada. Las causas incluyen: (1) material profibrótico inhalado tal como asbesto o silicio, o polvo de metales duros (2) material orgánico inhalado al que el paciente tiene una respuesta inmunológica idiosincrásica que conduce a la fibrosis (por ejemplo, pulmón del granjero) (3) fármacos, tales como nitrofurantoina, amiodarona y metotrexato (4) en asociación con una enfermedad inflamatoria sistémica, tal como esclerosis sistémica o artritis reumatoide.

No obstante, en muchos casos la causa o circunstancia subyacente no está identificada. Se han diagnosticado muchos de tales pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (IPF). Esta es una afección relativamente rara (prevalencia 20/100.000). El diagnóstico se basa en la ausencia de una causa identificada combinada con ciertas características patológicas y radiológicas, particularmente el apanelado en el CT o en la biopsia pulmonar. La enfermedad se observa habitualmente en pacientes mayores (>50) y a menudo se sigue de un curso incesante de empeoramiento pulmonar progresivo que conduce a la muerte, con una supervivencia media estimada en 2-5 años. Además, los pacientes tienen la sensación de disnea más desagradable que progresa durante meses o años. Esto restringe inicialmente la actividad física, pero en la fase terminal -que puede durar varios meses- el paciente está sin aliento incluso durante el descanso y además es dependiente de oxígeno.

En el presente no hay tratamiento satisfactorio para esta enfermedad. Los tratamientos actuales generalmente consisten en corticoesteroides e inmunosupresores tales como azatioprina. No obstante, los corticoesteroides pueden ser ineficaces en muchos de los pacientes y sus efectos secundarios pueden empeorar la situación. Hay muchos tratamientos potenciales en investigación incluyendo el interferón gamma, que ha demostrado una tendencia a mejorar la supervivencia en un estudio importante reciente, y la perfinidona.

Hay evidencia de que IL-13 y las citoquinas asociadas con el fenotipo Th2 están implicadas en el proceso de fibrosis en la reparación del tejido (Wynn TA, Nat.Rev.Immunol. 2004 4:583-594; Jakubzick y colaboradores, Am. J. Pathol. 2004 164(6):1989-2001; Jakubzick y colaboradores, Immunol. Res. 2004 30(3):339-349; Jakubzick y colaboradores, J. Clin. Pathol. 2004 57:477-486). IL-13 y IL-4 han estado implicados en una variedad de enfermedades de la fibrosis. La fibrosis hepática inducida por esquistosoma parece ser dependiente de la IL-13 y hay evidencia limitada de que IL-13 está implicada en la patogénesis de escleroderma (Hasegawa y colaboradores, J. Rheumatol. 1997 24:328-332; Riccieri y colaboradores, Clin. Rheumatol. 2003 22:102-106).

En términos de fibrosis pulmonar, los estudios *in vitro* han demostrado que IL-13 promueve el fenotipo fibrogénico. Los estudios con animales han mostrado niveles de expresión elevados de IL-13 en modelos de fibrosis inducidos artificialmente, y que la fibrosis se puede reducir mediante la eliminación de IL-13.

La IL-13 promueve un fenotipo profibrótico. A un nivel celular, hay varios mecanismos mediante los cuales IL-13 puede promover la fibrosis. Las vías de señalización y la importancia de estos diversos mecanismos no están bien definidas.

Hay evidencias de que IL-13 actúa sobre los fibroblastos tanto para promover la producción de colágeno, como para inhibir su ruptura, favoreciendo así un fenotipo fibrótico. Los fibroblastos de la piel poseen receptores para IL-13 (= al receptor para IL-4 de tipo II) y la exposición de fibroblastos de piel cultivados a IL-13 conduce a la regulación vía arriba de la generación del colágeno (Oriente y colaboradores, J. Pharmacol. Exxp. Ther. 200 292:988-994). La IL-4 también tiene un efecto similar, pero más transitorio. Una serie de células de fibroblasto del pulmón humano (ICIG7) expresa el receptor IL-4 de tipo II (Jinnin y colaboradores, J. Biol. Chem 2004 279:41783-41791). La exposición de estas células a IL-13 promueve la secreción de una variedad de mediadores profibróticos e inflamatorios: GM-CSF, G-CSF, integrina VCAM beta1 (Doucet y colaboradores, Int. Immunol. 1998 10(10):1421-1433).

La IL-13 inhibe la producción por los fibroblastos de la piel de las proteínas metaloproteinasas de la matriz 1 y 3

- inducidas por IL-1 $\alpha$  que tendería a reducir la ruptura de la matriz EC. La IL-13 actúa sinérgicamente con el TGF- $\beta$  en fibroblastos humanos obtenidos por biopsia de las vías aéreas asmáticas para promover la expresión del inhibidor tisular de la metaloproteinasa 1 (TIMP-1). La ruptura de la matriz extracelular se lleva a cabo por las metaloproteinasas de la matriz, que se inhiben por la TIMP-1. Esta acción de IL-13 tendería así a reducir la degradación de la matriz (Zhou y colaboradores, Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2005 288:C435-C442).
- La sobre-expresión de IL-13 en ratones transgénicos conduce a fibrosis sub-epitelial, hipertrofia de las células epiteliales, hiperplasia de las células de Globet, deposición de cristales (quitinasa de mamífero ácida), hiper-respuesta de las vías aéreas, fibrosis intersticial, hipertrofia de las células de tipo 2 y acumulación de tensoactivos (Zhu y colaboradores, J. Clin. Invest. 1999 103(6):779-788).
- Las diferentes cepas de ratones tienen diferentes susceptibilidades a la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. Los ratones C57B1/6J, que son susceptibles, presentan una rápida regulación vía arriba de IL-13, IL-13R $\alpha$  e IL-4 (así como el TGF- $\beta$ , TNFR- $\beta$  e IL1Rs) en respuesta a la bleomicina. Los ratones BALB/c, que no son susceptibles, no presentan regulación vía arriba de IL-13, etc.
- Belperio y colaboradores han estudiado la expresión del papel de IL-13, IL-4 y la quimioquina CC C10 en un modelo de fibrosis por bleomicina en ratón. Los niveles tanto de IL-13 como de IL-4 se incrementan en el tejido pulmonar en respuesta a la bleomicina. La neutralización previa de IL-13 usando anticuerpos policlonales anti-IL-13 reduce significativamente la fibrosis pulmonar en respuesta a la bleomicina como se evalúa por los niveles de hidroxiprolina pulmonar. A pesar de la expresión incrementada de IL-4 en el mismo modelo, la neutralización de IL-4 no tuvo efecto sobre la fibrosis pulmonar.
- En otro modelo de fibrosis pulmonar aguda inducida por FITC en ratón BALB/c, la ausencia de IL-13 (en *knockouts*), pero no de IL-4, protegió contra la fibrosis pulmonar. No hay protección añadida de *knockout* para IL-4 en *knockouts* para IL-13. El efecto protector de la ausencia de IL-13 no se debe a la diferencia en el reclutamiento celular en el pulmón: en todos los *knockouts* y BALB/c el número de células totales reclutadas es similar, de manera que el componente inflamatorio inicial parece no estar afectado. El reclutamiento de eosinófilos es inferior en *knockouts* de IL-13 e IL-4 comparado con BALB/c, pero ya que los IL-4 -/- no estaban protegidos contra la fibrosis esto no puede explicar la diferencia en la fibrosis. Quizá sorprendentemente, no había diferencia en los niveles de citoquinas entre los IL-13 +/+ y -/-, incluyendo para IL-10, MCP-1, interferón gamma, TGF- $\beta$ . Además, se aisló el mismo número de fibroblastos de los pulmones de animales diferentes después de la FICT, pero en los ratones IL-13 -/- se redujo la producción de colágeno. Esto indica que la pérdida de IL-13 no previene simplemente la respuesta inflamatoria, sino que tiene un papel anti-fibrótico algo más específico. Se ha sugerido que IL-13 puede ejercer su efecto fibrótico a través del TGF-i. No obstante en este modelo FICT, la expresión del TGF-i no se redujo en ratones *knockout* para IL-13.
- Cabría esperar que la interleuquina 4 ejerciese un efecto similar a IL-13 ya que ambas actúan a través del mismo receptor. La IL-4 se regula significativamente vía arriba en los pulmones de los ratones con fibrosis pulmonar inducida por bleomicina (Gharaee-Kermani y colaboradores, Cytokine 2001 15:138-147). No obstante, comparando la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones C57BL6/J que sobreexpresan IL-4, *knockouts* para IL-4 y el tipo silvestre, Izbicki y colaboradores (Am J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol 2002 283(5):L1110-L1116), no se han encontrado evidencias de que IL-4 esté implicada en la fibrosis pulmonar. La fibrosis no se redujo en *knockouts* para IL-4, y los ratones que sobreexpresan IL-4 presentaron niveles de fibrosis incrementados.
- Los niveles de citoquinas BAL de IL-13 son significativamente elevados en pacientes con una variedad de formas de fibrosis pulmonar, aunque con una variabilidad considerable. La expresión de IL-13 está regulada significativamente vía arriba en los macrófagos alveolares obtenidos de pacientes con fibrosis pulmonar.
- La evidencia clínica más sólida proviene de las investigaciones en la universidad de Michigan. Jakubzick y sus colegas han estudiado la expresión génica de IL-13 y IL-4 y sus receptores en biopsias pulmonares quirúrgicas de pacientes con fibrosis pulmonar. La expresión génica de IL-13 es notablemente superior en especímenes con pulmones afectados por IPF que en pulmones con otras dolencias fibróticas pulmonares o normales. Los cultivos de fibroblastos de pacientes con IPF/UIP presentan una expresión aumentada del receptor para IL-13 y IL-4, comparado con el tejido y los fibroblastos obtenidos de biopsias de pacientes con pulmones normales u otras formas de fibrosis pulmonar. En particular, los focos fibroblásticos, que presumiblemente son el epicentro de la actividad de la enfermedad, se tiñen de manera particularmente potente para estos receptores (Jakubzick y colaboradores, J. Immunol. 2003 171:2684-2693; Jakubzick y colaboradores, Am. J. Pathol. 2003 162:1475-1486; Jakubzick y colaboradores, Am. J. Pathol. 2004 164:1989-2001; Jakubzick y colaboradores, Immunol. Res. 2004 30(3):339-349; Jakubzick y colaboradores, J. Clin. Pathol. 2004 57: 477-486).
- Hay buenas evidencias *in vitro* de que las citoquinas de Th2 en general y IL-13 en particular promueven un fenotipo profibrótico. En al menos dos modelos animales se ha demostrado que la fibrosis inducida químicamente se puede reducir por la eliminación de IL-13 (bien con genes *knockout* o mediante anticuerpos anti-IL-13). Algunas evidencias indican que IL-13 es más importante en la promoción de la fibrosis pulmonar que IL-4. Las evidencias clínicas del papel de IL-13 en la fibrosis pulmonar sugieren que IL-13 y sus receptores no están en los pulmones de los

pacientes con IPF.

Un volumen creciente de datos sugiere un importante papel para las terapias basadas en IL-13 para el tratamiento de una variedad de enfermedades de fibrosis, incluyendo fibrosis hepática inducida por esquistosomiasis, y varias formas de fibrosis pulmonar (por ejemplo IPF) [tratada en otra parte], escleroderma).

- 5 Los experimentos en los que IL-4 y IL-13 eran inhibidos independientemente, se identificaba a IL-13 como la citoquina efectora de la fibrosis dominante en varios modelos (Chiaramonte y colaboradores. *J. Clin. Invest.* 1999; 104:777-785; Blease y colaboradores. *J. Immunol.* 2001; 166: 5219; Kumar y colaboradores. *Clin. Exp. Allergy* 2002; 32:1104). En la esquistosomiasis, aunque la respuesta inflamatoria inducida no estaba afectada por el bloqueo de IL-13, la deposición de colágeno disminuyó en más del 85% en animales infectados crónicamente. (Chiaramonte y colaboradores. *J. Clin. Invest.* 1999; 104:777; Chiaramonte y colaboradores *Hepatology* 2001; 34:273) a pesar de la producción continua y sin disminuir de IL-4.

La secuencia de aminoácidos para la hIL-13 se indica como ID SEC N°: 9. (Ésta es la secuencia de la proteína madura, esto es, no está presente la secuencia señal).

- 15 Un ADNc que codifica para la hIL-13 se indica en ID SEC N°: 10. (Ésta es la secuencia de ADN para la proteína madura, esto es, no está presente la secuencia señal).

Recientemente se han descrito vacunas que incrementan la respuesta inmunitaria contra IL-13 para el tratamiento del asma (documento WO 02/070711). También se ha descrito recientemente un papel para IL-13 en la sensibilización de la piel a los alérgenos medioambientales (Herrick y colaboradores, *The Journal of Immunology*, 2003, 170:2488-2495).

- 20 La presente invención proporciona, entre otros, un anticuerpo denominado 6A1. Como se demuestra a continuación, la unión del 6A1 a la hIL-13 parece depender de la presencia de arginina en la posición 107 de la ID SEC N°: 9. La arginina es un residuo clave en la posición 107 de la ID SEC N°: 9, implicado en la interacción hIL-13/hIL-13R. Thompson J.P y Debinski W (1999) *J. Biol. Chem.*, vol. 24, No: 42 pp29944-29950 indicaron que "ácidos glutámicos en las posiciones 13 y 16 en hIL-13  $\alpha$  – hélice A, arginina y serina en las posiciones 66 y 69 en la hélice C, y arginina en la posición 109 en la hélice D, estaban destinados a ser importantes en la inducción de señalización biológica ya que su mutación específica produce la pérdida de y/o ganancia de fenómenos funcionales" (véase resumen y descripción). La arginina en la posición 109 de este artículo es equivalente a 107 en la ID SEC N°: 9 de la presente descripción debido a una aproximación de recuento diferente, usada por los presentes inventores, a la que han usado los autores de este artículo. Así la unión del 6A1 a la hIL-13 implica uno de los residuos claves en la hIL-13 previamente identificado que es importante en la interacción hIL-13/hIL-13R y por tanto en la señalización biológica de la vía de IL-13.

### **Resumen de la invención**

- 35 La presente invención por tanto proporciona un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a hIL-13 y neutraliza la actividad entre la hIL-13 y la hIL-13R y comprende la siguiente CDRH3: ID SEC N°: 3. Tal inhibición incluye pero no se limita a la inhibición competitiva. En las formas de realización típicas, los anticuerpos de la invención al menos inhiben la interacción entre hIL-13 y hIL-13R y más típicamente bloquean la interacción entre hIL-13 y hIL-13R desacoplando por tanto la vía de señalización hIL-13/hIL-13R.

- 40 El término *une específicamente* como se usa a lo largo de la presente descripción en relación a los anticuerpos y a sus fragmentos de unión al antígeno de la invención significan que el anticuerpo se une a la hIL-13 sin unirse o uniéndose insignificamente a otras proteínas humanas y en particular a IL-4. El término, no obstante, no excluye el hecho de que los anticuerpos de la invención también pueden tener reactividad cruzada con IL-13 de macaco.

- 45 En otro aspecto de la aplicación se proporciona un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a hIL-13 y comprende una CDRH3 que es una variante de la secuencia indicada en ID SEC N°: 3 en la que uno o dos residuos dentro de dicha CDRH3 de dicha variante difiere del residuo en la posición correspondiente en ID SEC N°: 3.

En otro aspecto de la presente invención se proporciona un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a hIL-13, y comprende las siguientes CDR:

CDRH1: ID SEC N°: 1

CDRH2: ID SEC N°: 2

- 50 CDRH3: ID SEC N°: 3

CDRL1: ID SEC N°: 4

CDRL2: ID SEC N°: 5

CDRL3: ID SEC N°: 6

A lo largo de esta descripción, los residuos aminoácido en las secuencias de los anticuerpos se numeran según el esquema de Kabat. De manera similar, los términos "CDR", "CDRL1", "CDRL2", "CDRL3", "CDRH1", "CDRH2", "CDRH3" siguen el sistema de numeración de Kabat indicado en Kabat y colaboradores; *Sequences of proteins of Immunological Interest* NIH, 1987. "CDRH1" se toma por ser el trozo de secuencia que incluye tanto la definición de Kabat de CDRH1 (residuos 31-35B) como también la definición de Chotia de CDRH1 (Chothia y colaboradores (1989); *Conformations of immunoglobulins hypervariable regions*; Nature 342, p877-883) que comprende Kabat 26-32. Por tanto los siguientes definen las CDR según la invención:

CDR:	Residuos
10	CDRH1: 26-35B
	CDRH2: 50-65
	CDRH3: 95-102
	CDRL1: 24-34
	CDRL2: 50-56
15	CDRL3: 89-97

En otro aspecto de la presente invención se proporciona un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende un dominio VH que tiene la secuencia indicada en ID SEC N°: 7 y un dominio VL que tiene la secuencia indicada en ID SEC N°: 8.

En otro aspecto de la solicitud se proporciona un dominio VH aislado de un anticuerpo que comprende (o consiste esencialmente en) ID SEC N°: 7 ó 11, 12, 13, 14.

En otro aspecto de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende un dominio VH seleccionado del grupo constituido por; ID SEC N°: 7 ó 11, 12, 13, 14.

En otro aspecto de la presente solicitud se proporciona un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo que inhibe competitivamente la unión del anticuerpo terapéutico que comprende la CDRH3 de ID SEC N°: 3 a la hIL-13.

En otro aspecto de la solicitud se proporciona un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo que inhibe competitivamente la unión del anticuerpo terapéutico que comprende las CDR de ID SEC N°: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 a la hIL-13.

En otro aspecto de la solicitud se proporciona un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo que inhibe competitivamente la unión del anticuerpo terapéutico que comprende una cadena pesada de ID SEC N°: 18 y una cadena ligera de ID SEC N°: 22 a la hIL-13.

De acuerdo con la presente invención se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado que comprende un dominio VH seleccionado del grupo constituido por: ID SEC N°: 11, 12, 13, 14 y un dominio VL seleccionado del grupo constituido por: ID SEC N°: 15, 16.

También se proporciona el uso de un anticuerpo de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno sensible a la modulación de la interacción entre hIL-13 y hIL-13R.

En otro aspecto de la presente solicitud se proporciona un anticuerpo terapéutico que se une específicamente a IL-13 humana, cuyo anticuerpo se une específicamente a IL-13 humana entre los residuos 97 y 108 de ID SEC N°: 9. Como es evidente para aquellos expertos en la materia en base a los resultados descritos a continuación, "entre los residuos 97 y 108 de ID SEC N°: 9" incluye las posiciones 97 y 108.

En otro aspecto de la presente solicitud se proporciona un anticuerpo terapéutico que inhibe competitivamente la unión del anticuerpo terapéutico que tiene la CDRH3 de ID SEC N°: 3 a IL-13 humana (tal como un anticuerpo terapéutico que comprende una cadena pesada de ID SEC N°: 18 y una cadena ligera de ID SEC N°: 22), cuyo anticuerpo competidor se une específicamente a IL-13 humana entre los residuos 97 y 108 de ID SEC N°: 9.

En otro aspecto de la presente solicitud se proporciona un anticuerpo terapéutico que se une específicamente a IL-13 humana entre los residuos 103 y 107, inclusive, de ID SEC N°: 9 y modula (por ejemplo, inhibe o bloquea) la interacción entre hIL-13 y hIL-13R.

En una forma de realización de la solicitud se proporciona una composición farmacéutica que comprende una pluralidad de anticuerpos terapéuticos monoclonales (que típicamente son humanos o humanizados) que se unen

específicamente a hIL-13 entre los residuos 103 y 107, de ID SEC N°: 9 y modula (por ejemplo, inhibe o bloquea) la interacción entre hIL-13 y hIL-13R y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 Además se proporciona un procedimiento para la producción de un anticuerpo terapéutico que se une específicamente a hIL-13 entre los residuos 103 y 107, de ID SEC N°: 9 y modula (por ejemplo, inhibe o bloquea) la interacción entre hIL-13 y hIL-13R cuyo procedimiento comprende la etapa de cultivar en un medio de cultivo sin suero, una célula hospedadora recombinante que comprende un primer y un segundo vector en el que dicho primer vector comprende un polinucleótido que codifica la cadena pesada de dicho anticuerpo y dicho segundo vector comprende un polinucleótido que codifica la cadena ligera de dicho anticuerpo. Como será evidente para aquella persona experta en base a los resultados a continuación “entre 103 y 107 de ID SEC N°: 9” incluye las posiciones 103 y 107.

10 En otra forma de realización de la solicitud se proporciona un procedimiento para la producción de un anticuerpo terapéutico que se une específicamente a hIL-13 entre los residuos 97 y 108 de ID SEC N°: 9 y modula (por ejemplo, inhibe o bloquea) la interacción entre hIL-13 y hIL-13R cuyo procedimiento comprende la etapa de cultivo en un medio de cultivo sin suero, una célula hospedadora recombinante que comprende un primer y un segundo vector en el que dicho primer vector comprende un polinucleótido que codifica la cadena pesada de dicho anticuerpo y dicho segundo vector comprende un polinucleótido que codifica la cadena ligera de dicho anticuerpo.

15 En otra forma de realización de la solicitud se proporciona un anticuerpo terapéutico intacto que se une a la hIL-13 y modula (por ejemplo, inhibe o bloquea) la interacción entre hIL-13 y hIL-13R cuyo anticuerpo interacciona con el residuo 107 de ID SEC N°: 9.

20 En otra forma de realización de la solicitud se proporciona un anticuerpo terapéutico intacto que se une a la hIL-13 y modula (por ejemplo, inhibe o bloquea) la interacción entre hIL-13 y hIL-13R en la que la unión entre dicho anticuerpo terapéutico y la hIL-13 depende de la presencia de un residuo arginina en la posición 107 de ID SEC N°: 9.

25 En otra realización hay provisto un anticuerpo terapéutico que une específicamente hIL-13 y modula (por ejemplo inhibe o bloquea) la interacción entre hIL-13 y hIL-13R y tiene una disociación de  $k_{off}$  constante en la cadena  $1,4 \times 10^{-4}$  a  $8,22 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  (por ejemplo como medido por Biacore™). Tal anticuerpo comprende un CDRH3 de ID SEC N°: 3 y además puede comprender además de la ID SEC N°: 3, ID SEC N°: 1, 2, 4, 5 y 6.

30 En otra realización hay provisto un anticuerpo que une específicamente hIL-13 e inhibe la interacción entre hIL-13 y hIL-13R, cuyo anticuerpo comprende CDRH3 de ID SEC N°: 3 y opcionalmente comprende además cada uno de CDRH1 de la ID SEC N°: 1, CDRH2 de la ID SEC N°: 2, CDRH1 de la ID SEC N°: 4, CDRH2 de la ID SEC N°: 5, y CDRH3 de la ID SEC N°: 6, en la que dicho anticuerpo es también reactivo con macaco IL-13 (cIL-13).

### **Breve descripción de los dibujos**

Figura 1

ELISA en sándwich que ilustra la unión de el anticuerpo monoclonal 6A1 a IL-13 humana expresada en E. coli recombinante a concentraciones crecientes.

35 Figura 2A

ELISA que ilustra la capacidad del anticuerpo monoclonal 6A1 a concentraciones crecientes para inhibir la unión de IL-13 humana expresada en E. coli recombinante a la cadena  $\alpha 1$  del receptor para IL-13 humana.

Figura 2B

40 ELISA que ilustra la capacidad del anticuerpo monoclonal 6A1 a concentraciones crecientes para inhibir la unión de IL-13 humana expresada en E. coli recombinante a la cadena  $\alpha 2$  del receptor para IL-13 humana.

Figura 3

Ensayo de neutralización que ilustra la capacidad del 6A1 a concentraciones crecientes para inhibir la bioactividad de IL-13 de macaco y humana expresada en E. coli recombinante en un ensayo de proliferación de células TF-1.

Figura 4

45 Ensayo de neutralización que ilustra la capacidad del 6A1 a concentraciones crecientes para inhibir la bioactividad de IL-13 humana expresada en mamífero (células CHO) en un ensayo de proliferación de células TF-1.

Figura 5

Ensayo de neutralización que ilustra la capacidad del 6A1 a concentraciones crecientes para inhibir la bioactividad de IL-13 Q130 humana expresada en E. coli recombinante en un ensayo de proliferación de células TF-1.

Figura 6

ELISA en sándwich que demuestra que el 6A1 no se une a IL-4 humana expresada en E. coli recombinante.

5 Figura 7

Un ensayo de neutralización de IL-5, que demuestra que el 6A1 no inhibe la bioactividad de IL-5 humana expresada en E. coli recombinante en un ensayo de proliferación de células TF-1.

Figura 8

10 ELISA en sándwich que ilustra la unión de Acm 6A1 quimérico a IL-13 de macaco y a IL-13 humana expresada en E. coli recombinante a concentraciones crecientes.

Figura 9

ELISA en sándwich que ilustra la unión de 8 Acsm anti-IL-13 humana humanizados a IL-13 humana expresada en E. coli recombinante a concentraciones crecientes.

Figura 10a

15 ELISA en sándwich que ilustra la unión de 6A1 quimérico, L1+A1 y L2+A1 a IL-13 humana expresada en E. coli recombinante a concentraciones crecientes.

Figura 10b

ELISA en sándwich que ilustra la unión de 6A1 quimérico, L1+A1 y L2+A1 a IL-13 de macaco expresada en E. coli recombinante a concentraciones crecientes.

20 Figura 11

ELISA en sándwich que ilustra la unión de 6A1 quimérico, L1+A1 y L2+A1 a IL-13 humana nativa a concentraciones crecientes.

Figura 12a

25 ELISA que ilustra la capacidad del anticuerpo monoclonal 6A1, 6A1 quimérico, L1+A1 y L2+A1 a concentraciones crecientes para inhibir la unión de IL-13 humana expresada en E. coli recombinante a la cadena  $\alpha$ 1 del receptor para IL-13 humana.

Figura 12b

30 ELISA que ilustra la capacidad del anticuerpo monoclonal 6A1, 6A1 quimérico, L1+A1 y L2+A1 a concentraciones crecientes para inhibir la unión de IL-13 humana expresada en E. coli recombinante a la cadena  $\alpha$ 2 del receptor para IL-13 humana.

Figura 13a

Ensayo de neutralización que ilustra la capacidad del 6A1, 6A1 quimérico, L1+A1 y L2+A1 a concentraciones crecientes para inhibir la bioactividad de IL-13 humana expresada en E. coli recombinante en un ensayo de proliferación de células TF-1.

35 Figura 13b

Ensayo de neutralización que ilustra la capacidad del 6A1, 6A1 quimérico, L1+A1 y L2+A1 a concentraciones crecientes para inhibir la bioactividad de IL-13 de macaco expresada en E. coli recombinante en un ensayo de proliferación de células TF-1.

Figura 13c

40 Ensayo de neutralización que ilustra la capacidad del 6A1, 6A1 quimérico, L1+A1 y L2+A1 a concentraciones crecientes para inhibir la bioactividad de IL-13 Q130 humana expresada en E. coli recombinante en un ensayo de proliferación de células TF-1.

Figura 13d

Ensayo de neutralización que ilustra la capacidad del 6A1, 6A1 quimérico, L1+A1 y L2+A1 a concentraciones crecientes para inhibir la bioactividad de IL-13 humana expresada el mamífero (células CHO) en un ensayo de proliferación de células TF-1.

Figura 14a

- 5 ELISA en sándwich que demuestra que 6A1, 6A1 quimérico, L1+A1 y L2+A1 no se unen a IL-4 humana expresada en E. coli recombinante.

Figura 14b

ELISA en sándwich que demuestra que el 6A1, 6A1 quimérico, L1+A1 y L2+A1 no se unen al GM-CSF humano expresado en E. coli recombinante.

- 10 Figure 14c

Un ensayo de neutralización de IL-5, que demuestra que el 6A1, 6A1 quimérico, L1+A1 y L2+A1 no inhiben la bioactividad de IL-5 humana expresada en E. coli recombinante en un ensayo de proliferación de células TF-1.

Figura 15

Un ELISA del mapeo de epítomos para determinar el epítomo de unión para el 6A1 sobre IL-13 de macaco y humana.

- 15 Figura 16a

Un ELISA del mapeo de epítomos para identificar la especificidad de unión precisa del 6A1 sobre IL-13 humana.

Figura 16b

Un ELISA del mapeo de epítomos para identificar la especificidad de unión precisa del 6A1 sobre IL-13 de macaco.

Figura 17a

- 20 Un ELISA del mapeo de epítomos para determinar los residuos aminoácido claves necesarios para la unión del 6A1 sobre IL-13 humana.

Figura 17b

Un ELISA del mapeo de epítomos para determinar los residuos aminoácidos claves necesarios para la unión del L1+A1 sobre IL-13 humana.

- 25 Figuras 17c y 17d

Son gráficos que ilustran el análisis mediante exploración de analina para el parental (murino) 6A1 (figura 17c) y el anticuerpo L1-A1 humanizado.

## **Descripción detallada de la invención**

### **1. Estructura de los anticuerpos**

- 30 **1.1 Anticuerpos intactos**

Los anticuerpos intactos habitualmente son glicoproteínas heteromultiméricas que comprenden al menos dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Aparte de las IgM, los anticuerpos intactos habitualmente son glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150 kDa, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Normalmente, cada cadena ligera se une a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente mientras que el número de uniones disulfuro entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas varía. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de una serie de regiones constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (VL) y una región constante en su otro extremo; la región constante de la cadena ligera está alineada con la primera región constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Las cadenas ligeras de los anticuerpos de la mayoría de las especies de vertebrados se pueden asignar a uno de los dos tipos denominados Kappa y Lambda en relación a la secuencia de aminoácidos de la región constante. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos humanos se pueden asignar a cinco clases diferentes, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. IgG e IgA se pueden subdividir adicionalmente en subclases, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; e IgA1 e IgA2. Existen variantes de especie en ratón y en rata que tienen al menos IgG2a, IgG2b. El dominio variable del anticuerpo confiere especificidad de unión al anticuerpo con ciertas regiones que presentan una variabilidad particular denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Las porciones más conservadas de

la región variable se denominan regiones marco (FR). Los dominios variables de cada una de las cadenas ligera y pesada comprenden cuatro FR unidas por tres CDR. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en proximidad cercana mediante las regiones FR y con las CDR de la otra cadena contribuyendo a la formación del sitio de unión de los anticuerpos al antígeno. Las regiones constantes no están directamente involucradas en la unión del anticuerpo al antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras tales como la participación de la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), fagocitosis a través de la unión al receptor Fc $\gamma$ , semi-vida/velocidad de aclaramiento a través del receptor Fc neonatal (FcRn) y citotoxicidad dependiente del complemento a través del componente C1q de la cascada del complemento.

En una forma de realización por tanto proporcionamos un anticuerpo terapéutico intacto que se une específicamente a hIL-13, cuyo anticuerpo inhibe la interacción entre hIL-13 y hIL-13R y comprende la siguiente CDRH3: SEC ID N.º: 3. El anticuerpo terapéutico intacto puede comprender una región constante de cualquier isotipo o sus subclases descritas anteriormente. En una forma de realización, el anticuerpo es del isotipo IgG, particularmente IgG1. El anticuerpo puede ser de rata, ratón, conejo, primate o humano. En una forma de realización típica, el anticuerpo es de primate (tal como macaco, mono del viejo mundo o gran simio, véase por ejemplo los documentos WO 99/55369, WO 93/02108) o humano.

En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico intacto que comprende una región variable que tiene CDR de ID SEC N.º: 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

En otra forma de realización, se proporciona un anticuerpo terapéutico intacto murino aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende un dominio VH que tiene la secuencia de ID SEC N.º: 7 y un dominio VL de la secuencia de ID SEC N.º: 8.

### **1.1.2 Anticuerpos humanos**

Los anticuerpos humanos se pueden producir por una serie de procedimientos conocidos por aquellos expertos en la materia. Los anticuerpos humanos se pueden preparar por el procedimiento de hibridoma usando líneas celulares de mieloma humano o de heteromieloma ratón-humano véase Kozbor *J. Immunol* 133, 3001, (1984) y Brodeur, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp51-63 (Marcel Dekker Inc, 1987). Los procedimientos alternativos incluyen el uso de librerías de fagos o ratones transgénicos, de los cuales ambos utilizan repertorios de la región V humana (véase Winter G, (1994), *Annu. Rev. Immunol* 12, 433-455, Green LL (1999), *J. Immunol. Methods* 231, 11-23).

Ahora hay disponibles varias cepas de ratones transgénicos en las que sus *loci* para la inmunoglobulina de ratón han sido reemplazados con segmentos génicos de inmunoglobulina humana (véase Tomizuka K, (2000) *PNAS* 97,722-727; Fishwild D.M (1996) *Nature Biotechnol.* 14,845-851, Mendez MJ, 1997, *Nature Genetics*, 15,146-156). Tras la exposición al antígeno tales ratones son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos a partir del cual se pueden seleccionar los anticuerpos de interés. De nota particular es el sistema Trimer<sup>TM</sup> (véase Eren R. y colaboradores, (1998) *Immunology* 93:154-161) en el que linfocitos humanos se trasplantan a ratones irradiados, el Selected Lymphocyte Antibody System (SLAM, véase Babcook y colaboradores, *PNAS* (1996) 93:7843-7848) en el que linfocitos humanos (o de otras especies) se pasan eficazmente por un procedimiento de generación de anticuerpos *in vitro* de reserva masiva seguido por un procedimiento de desconvulado, dilución limitante y selección y el Xenomouse II<sup>TM</sup> (Abgenix Inc). Una aproximación alternativa está disponible en Morphotek Inc usando la tecnología Morphodoma<sup>TM</sup>.

Se puede usar la tecnología de exposición en fagos para producir anticuerpos humanos (y sus fragmentos), véase McCafferty; *Nature*, 348, 552-553 (1990) y Griffiths AD y colaboradores (1994) *EMBO* 13: 3245-3260. Según esta técnica los genes del dominio V del anticuerpo se clonan en los marcos de cualquiera de los dos genes de las proteínas de la cubierta mayores o menores de un bacteriófago tal como M13 o fd y se exponen (habitualmente con la ayuda de un fago ayudante) como fragmentos de anticuerpos funcionales en la superficie de la partícula fágica. Las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo producen la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta aquellas propiedades. La técnica de exposición en fagos se puede usar para seleccionar anticuerpos específicos para antígenos de librerías hechas a partir de células B humanas tomadas de individuos afectados con una enfermedad o trastorno descrito anteriormente o alternativamente de donantes humanos no inmunizados (véase Marks; *J. Mol. Bio.* 222,581-597, 1991). Cuando se desea un anticuerpo humano intacto que comprenda un dominio Fc es necesario reclonar el fragmento derivado de la exposición al fago en vectores de expresión en mamíferos que comprendan las regiones constantes deseadas y establecer líneas celulares de expresión estables.

La técnica de maduración de afinidad (Marks; *Bio/technol* 10, 779-783 (1992)) se puede usar para mejorar la afinidad de la unión en la que la afinidad del anticuerpo humano primario se mejora sustituyendo secuencialmente las regiones V de las cadenas H y L con variantes de origen natural y seleccionando en relación a las afinidades de unión mejoradas. Ahora también están disponibles variantes de esta técnica tales como "impronta de epitopos", véase el documento WO 93/06213. Véase también Waterhouse; *Nucl. Acids Res* 21, 2265-2266 (1993).

En otro aspecto se proporciona un anticuerpo terapéutico intacto humano aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende una CDRH3 de ID SEC N°: 3 que se une específicamente a hIL-13 y modula (por ejemplo, inhibe o bloquea) la interacción entre hIL-13 y hIL-13R. En otro aspecto se proporciona un anticuerpo terapéutico intacto humano aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende una región variable que tiene CDR de ID SEC N°: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 como se ha definido anteriormente.

### **1.2 Anticuerpos humanizados y quiméricos**

El uso de anticuerpos no humanos intactos en el tratamiento de enfermedades o trastornos humanos conlleva los problemas de inmunogenocidad ahora bien establecidos, esto es, el sistema inmunitario del paciente puede reconocer el anticuerpo intacto no humano como no propio y generar una respuesta de neutralización. Esto es particularmente evidente tras la administración múltiple del anticuerpo no humano a un paciente humano. Se han desarrollado varias técnicas a lo largo de los años para superar estos problemas y generalmente implican la reducción de las secuencias de aminoácidos no humanas en la composición del anticuerpo intacto mientras se conserva la relativa facilidad de la obtención de anticuerpos no humanos a partir de animales inmunizados, por ejemplo, ratón, rata o conejo. Para conseguir esto en líneas generales se han utilizado dos aproximaciones. La primera es con anticuerpos quiméricos, que generalmente comprende un dominio variable no humano (por ejemplo, de roedor tal como ratón) fusionado a una región constante humana. Debido a que el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo está localizado dentro de las regiones variables, el anticuerpo quimérico conserva su afinidad de unión por el antígeno pero adquiere las funciones efectoras de la región constante humana y por tanto son capaces de realizar funciones efectoras tales como las que se han descrito anteriormente. Los anticuerpos quiméricos típicamente se producen usando procedimientos con ADN recombinante. El ADN que codifica los anticuerpos (por ejemplo, ADNc) se aísla y se secuencian usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas H y L del anticuerpo de la invención, por ejemplo ADNc que codifica ID SEC N° 1, 2, 3, 4, 5 y 6 descrito anteriormente). Las células de hibridoma sirven como una fuente típica de tal ADN. Una vez aislado, el ADN se pone en vectores de expresión que a continuación se transfieren en células hospedadoras tales como *E. coli*, células COS, células CHO o células de mieloma que de otra manera no producirían la proteína inmunoglobulina para obtener la síntesis del anticuerpo. El ADN se puede modificar sustituyendo la secuencia codificante para las cadenas L y H humanas por las regiones constantes H y L no humanas (por ejemplo murino) correspondientes, véase por ejemplo, Morrison; *PNAS* 81, 6851 (1984).

La segunda aproximación implica la generación de anticuerpos humanizados en los que el contenido no humano del anticuerpo se reduce humanizando las regiones variables. Han adquirido popularidad dos técnicas de humanización. La primera es la humanización por injerto de CDR. Las CDR hacen bucles cerca del N-término del anticuerpo donde forman una superficie montada en un andamiaje proporcionado por las regiones marco. La especificidad de unión del anticuerpo al antígeno está definida principalmente por la topografía y por las características químicas de la superficie de sus CDR. Estas características en cambio están determinadas por la conformación de las CDR individuales, por la disposición relativa de las CDR, y por naturaleza y la disposición de las cadenas laterales de los residuos que comprenden las CDR. Se puede conseguir una gran disminución en la inmunogenocidad injertando solamente las CDR de anticuerpos no humanos (por ejemplo murino) (anticuerpos "donadores" en el marco humano ("marco aceptor") y las regiones constantes (véase Jones y colaboradores (1986) *Nature* 321,522-525 y Verhoeven M y colaboradores (1988) *Science* 239, 1534-1536). No obstante, el injerto de CDR *per se* puede no resultar en la retención completa de las propiedades de unión al antígeno y frecuentemente se encuentra que algunos residuos del marco (algunas veces denominadas "retromutaciones") del anticuerpo donador necesitan ser preservados en la molécula humanizada si se debe recuperar una afinidad de unión al antígeno importante (véase Queen C y colaboradores (1989) *PNAS* 86, 10,029-10,033, Co, M y colaboradores (1991) *Nature* 351, 501-502). En este caso, se eligen las regiones V humanas que presentan la mayor homología de secuencia al anticuerpo donador no humano de una base de datos para proporcionar el marco humano (FR). La selección de FRs humanas puede ser de cualquiera de los dos anticuerpos humanos individuales o consenso humanos. Cuando sea necesario los residuos clave del anticuerpo donador se sustituyen en el marco aceptor humano para preservar las conformaciones de las CDR. Se puede usar modelización del anticuerpo por ordenador para ayudar a identificar tales residuos estructuralmente importantes, véase el documento WO 99/48523.

Alternativamente, la humanización se puede conseguir mediante un procedimiento de "chapeado". Un análisis estadístico de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulinas murinas y humanas únicas reveló que los patrones precisos de residuos expuestos son diferentes en anticuerpos murinos y humanos, y la mayoría de las posiciones superficiales individuales tienen una enorme preferencia por un pequeño número de residuos diferentes (véase Padlan E.A. y colaboradores; (1991) *Mol. Immunol.* 28, 489-498 y Pedersen J.T. y colaboradores (1994) *J. Mol. Biol.* 235; 959-973). Por tanto es posible reducir la inmunogenocidad de una Fv no humana reemplazando los residuos expuestos en sus regiones marco que difieren de aquellos encontrados habitualmente en anticuerpos humanos. Debido a que la antigenicidad de la proteína se puede correlacionar con la accesibilidad superficial, la sustitución de los residuos superficiales puede ser suficiente para producir una región variable de ratón "invisible" para el sistema inmunitario humano (véase también Mark G.E. y colaboradores (1994) en *Handbook of Experimental Pharmacology vol.113: The pharmacology of monoclonal Antibodies*, Springer-Verlag, pp105-134). Este procedimiento de humanización se denomina "chapeado" debido a que solamente se altera la

superficie del anticuerpo, los residuos de soporte permanecen inalterados.

5 En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico quimérico que comprende una región variable no humana (por ejemplo, de roedor) y una región constante humana (que puede ser de un isotipo IgG, por ejemplo, IgG1) que se une específicamente a hIL-13, cuyo anticuerpo comprende adicionalmente una CDRH3 de ID SEC N°: 3. Tales anticuerpos pueden comprender adicionalmente una región constante humana del isotipo IgG, por ejemplo, IgG1.

En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico quimérico que comprende una región variable no humana (por ejemplo, de roedor) y una región constante humana (que puede ser de un isotipo IgG, por ejemplo, IgG1) que se une específicamente a hIL-13 que tiene las CDR de ID SEC N°: 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

10 En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico quimérico que comprende un dominio VH de ID SEC N°: 7 y un dominio VL de ID SEC N°: 8 y una región constante humana de un isotipo IgG, por ejemplo, IgG1 que se une específicamente a hIL-13 y modula (por ejemplo, inhibe o bloquea) la interacción entre hIL-13 y hIL-13R.

15 En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a hIL-13 y comprende una CDRH3 de ID SEC N°: 3. Tales anticuerpos pueden comprender una región constante humana del isotipo IgG, por ejemplo, IgG1.

En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a hIL-13 y comprende CDR de ID SEC N°: 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Tales anticuerpos pueden comprender una región constante humana del isotipo IgG, por ejemplo, IgG1.

20 De acuerdo con la presente invención se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado cuyo anticuerpo comprende un dominio VH seleccionado del grupo constituido por: ID SEC N°: 11, 12, 13, 14 y un dominio VL seleccionado del grupo constituido por ID SEC N°: 15, 16. Tales anticuerpos pueden comprender una región constante humana del isotipo IgG, por ejemplo, IgG1.

En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado cuyo anticuerpo comprende un dominio VH de ID SEC N°: 11 y un dominio VL de ID SEC N°: 15.

25 En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado cuyo anticuerpo comprende un dominio VH de ID SEC N°: 12 y un dominio VL de ID SEC N°: 15.

En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado cuyo anticuerpo comprende un dominio VH de ID SEC N°: 13 y un dominio VL de ID SEC N°: 15.

30 En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado cuyo anticuerpo comprende un dominio VH de ID SEC N°: 14 y un dominio VL de ID SEC N°: 15.

En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado cuyo anticuerpo comprende un dominio VH de ID SEC N°: 11 y un dominio VL de ID SEC N°: 16.

En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado cuyo anticuerpo comprende un dominio VH de ID SEC N°: 12 y un dominio VL de ID SEC N°: 16.

35 En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado cuyo anticuerpo comprende un dominio VH de ID SEC N°: 13 y un dominio VL de ID SEC N°: 16.

En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado cuyo anticuerpo comprende un dominio VH de ID SEC N°: 14 y un dominio VL de ID SEC N°: 16.

40 En otra forma de realización de la presente invención se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a hIL-13 en la que dicho anticuerpo o fragmento del mismo comprende una CDRH3 (ID SEC N°: 3) que además comprende opcionalmente CDR de ID SEC N°: 1, 2, 4, 5 y 6 en los que los residuos seleccionados del grupo que consiste en 19, 38, 73 y 81 de la región marco de la cadena pesada aceptora humana y el residuo de la posición 85 del marco de la cadena ligera aceptora humana se sustituyen por los residuos correspondientes encontrados en el marco del anticuerpo donador de los  
45 cuales se deriva la CDRH3.

50 Será evidente para aquellos expertos en la materia que el término “deriva” está previsto que defina no sólo la fuente en el sentido de ser el origen *físico* del material sino también que defina el material que es estructuralmente idéntico (en términos de secuencia primaria de aminoácido) al material, pero que no se origina a partir de la fuente de referencia. Así “residuos encontrados en el anticuerpo donador de los cuales se deriva la CDRH3” no necesariamente necesitan haber sido purificados del anticuerpo donador.

En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión al antígeno

del mismo que se une específicamente a hIL-13 en la que dicho anticuerpo o fragmento del mismo comprende la CDRH3 de ID SEC N°: 3 que además comprende opcionalmente las CDR de ID SEC N°: 1, 2, 4, 5 y 6 en los que el marco de la cadena pesada humana comprende uno o más (por ejemplo, todos) de los siguientes residuos (o uno de sus sustitutos conservativos):

5	Posición	Residuo
		38 I
		19 R
		73 T
		81 R

10 y la cadena ligera humana comprende

Posición	Residuo
	85 V

15 Es muy admitido en la técnica que ciertas sustituciones de aminoácidos están consideradas como “conservativas”. Los aminoácidos se dividen en dos grupos en relación a las propiedades comunes de las cadenas laterales y las sustituciones dentro de grupos que mantienen toda o sustancialmente toda la afinidad de unión del anticuerpo de la invención o de su fragmento de unión al antígeno se consideran sustituciones conservativas, véase la tabla siguiente:

Cadena lateral	Miembros
Hidrófoba	met, ala, val, leu, ile
Hidrófila neutra	cys, ser, thr
Ácida	asp, glu
Básica	asn, gln, his, lys, arg
Residuos que influyen en la orientación de la cadena	gly, pro
Aromáticos	trp, tyr, phe

20 De acuerdo con la presente invención se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado que comprende una cadena pesada seleccionada del grupo constituido por: ID SEC N°: 18, 19, 20, 21 y una cadena ligera seleccionada del grupo constituido por: ID SEC N°: 22, 23.

En una forma de realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado que se une específicamente a hIL-13 que comprende una cadena pesada de ID SEC N°: 18 y una cadena ligera de ID SEC N°: 22.

25 En una forma de realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado que se une específicamente a hIL-13 que comprende una cadena pesada de ID SEC N°: 19 y una cadena ligera de ID SEC N°: 22.

30 En una forma de realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado que se une específicamente a hIL-13 que comprende una cadena pesada de ID SEC N°: 20 y una cadena ligera de ID SEC N°: 22.

En una forma de realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado que se une específicamente a hIL-13 que comprende una cadena pesada de ID SEC N°: 21 y una cadena ligera de ID SEC N°: 22.

35 En una forma de realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado que se une específicamente a hIL-13 que comprende una cadena pesada de ID SEC N°: 18 y una cadena ligera de ID SEC N°: 23.

En una forma de realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado que se une

específicamente a hIL-13 que comprende una cadena pesada de ID SEC N°: 19 y una cadena ligera de ID SEC N°: 23.

5 En una forma de realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado que se une específicamente a hIL-13 que comprende una cadena pesada de ID SEC N°: 20 y una cadena ligera de ID SEC N°: 23.

En una forma de realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado que se une específicamente a hIL-13 que comprende una cadena pesada de ID SEC N°: 21 y una cadena ligera de ID SEC N°: 23.

### **1.3 Anticuerpos biespecíficos**

10 Un anticuerpo biespecífico es un anticuerpo que tiene especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes. Los procedimientos de preparación de dichos anticuerpos son conocidos en la materia. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares cadena H-cadena L de la inmunoglobulina, en la que las dos cadenas H tienen diferentes especificidades de unión, véase Millstein y colaboradores, *Nature* 305 537-539 (1983), el documento WO 93/08829 y Traunecker y colaboradores, *EMBO*, 10, 15, 1991, 3655-3659. Debido al repertorio aleatorio de cadenas H y L, se produce una mezcla potencial de 10 estructuras de anticuerpos diferentes de las cuales solamente una tiene la especificidad de unión deseada. Una aproximación alternativa implica la fusión de los dominios variables con las especificidades de unión deseadas a la región constante de la cadena pesada que comprende al menos parte de la región bisagra, las regiones CH2 y CH3. Se prefiere tener presente la región CH1 que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera en al menos una de las fusiones. El ADN que codifica estas fusiones, y si se desea la cadena L, se inserta en vectores de expresión separados y a continuación se cotransfectan en un organismo hospedador adecuado. Es posible sin embargo insertar las secuencias codificantes para dos o para las tres cadenas en un vector de expresión. En una aproximación preferida, el anticuerpo biespecífico está compuesto de una cadena H con una primera especificidad de unión en un brazo y un par de cadena H-L, proporcionando una segunda especificidad de unión en el otro brazo, véase el documento WO 94/04690. Véase también Suresh y colaboradores, *Methods in Enzymology* 121, 210, 1986.

En una forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico biespecífico en la que al menos una especificidad de unión de dicho anticuerpo es para la hIL-13, en la que dicho anticuerpo comprende una CDRH3 de ID SEC N°: 3 y en la que dicho anticuerpo inhibe la interacción entre hIL-13 y hIL-13R. Tales anticuerpos pueden comprender además una región constante humana del isotipo IgG, por ejemplo, IgG1. En algunas formas de 30 realización el anticuerpo terapéutico biespecífico tiene una primera especificidad de unión para la hIL-13, y modula (por ejemplo, inhibe o bloquea) la interacción entre hIL-13 y hIL-13R y una segunda especificidad de unión para la hIL-4, y modula (por ejemplo, inhibe o bloquea) la interacción entre hIL-4 y un receptor para hIL-4.

En una forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico biespecífico en la que al menos una especificidad de unión de dicho anticuerpo es para la hIL-13, en la que dicho anticuerpo comprende al menos CDR de ID SEC N°: 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Tales anticuerpos pueden comprender una región constante humana del isotipo IgG, por ejemplo, IgG1.

### **1.4 Fragmentos de anticuerpos**

En ciertas formas de realización de la invención se proporcionan fragmentos de anticuerpo terapéuticos que modulan la interacción entre hIL-13 y hIL-13R. Tales fragmentos pueden ser fragmentos de unión al antígeno funcionales de anticuerpos intactos y/o humanizados y/o quiméricos tales como fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, ScFv de los anticuerpos descritos anteriormente. Tradicionalmente tales fragmentos se producen mediante la digestión proteolítica de anticuerpos intactos mediante, por ejemplo, digestión con papaina (véase por ejemplo, el documento WO 94/29348) pero se pueden producir directamente a partir de células hospedadoras transformadas recombinantemente. Para la producción de ScFv, véase Bird y colaboradores; (1988) *Science*, 242, 423-426. 45 Además, los fragmentos de anticuerpo se pueden producir usando una variedad de técnicas de ingeniería genética como se describe a continuación.

Los fragmentos Fv parecen tener una energía interacción de sus dos cadenas inferior que los fragmentos Fab. Para establecer la asociación de los dominios VH y VL, se han unido con péptidos (Bird y colaboradores, (1988) *Science* 242, 423-426, Huston y colaboradores, *PNAS*, 85, 5879-5883), puentes disulfuro (Glockshuber y colaboradores, (1990) *Biochemistry*, 29, 1362-1367) y mutaciones por "inserción en el hueco" (Zhu y colaboradores (1997), *Protein Sci.*, 6, 781-788). Los fragmentos ScFv se pueden producir mediante procedimientos muy conocidos por aquellos expertos en la materia, véase Whitlow y colaboradores (1991) *Methods companion Methods Enzymol*, 2, 97-105 y Huston y colaboradores (1993) *Int. Rev. Immunol* 10, 195-217. Los ScFv se pueden producir en células bacterianas tales como *E. coli* pero se producen más preferentemente en células eucariotas. Una desventaja de los SvFc es la monovalencia del producto, que impide una avidéz incrementada debido a la unión polivalente, y a su corta semi-vida. Los intentos para superar estos problemas incluyen (ScFv)<sub>2</sub> bivalentes producidos a partir de ScFv que contienen una cisteína C-terminal adicional por acoplamiento químico (Adams y colaboradores (1993) *Can. Res* 53,

4026-4034 y McCartney y colaboradores (1995) *Protein Eng.* 8, 301-314) o por dimerización específica de sitio espontánea de ScFv que contiene un residuo cisteína C-terminal desapareado (véase Kipriyanov y colaboradores (1995) *Cell. Biophys* 26, 187-204). Alternativamente, se puede forzar a los ScFv a formar multímeros acortando el conector peptídico de 3 a 12 residuos para formar "dianticuerpos", véase Holliger y colaboradores *PNAS* (1993), 90, 6444-6448. La reducción del conector aún puede dar como resultado trímeros de ScFv (trianticuerpos, véase Kortt y colaboradores (1997) *Protein Eng.* 10, 423-433) y tetrámeros (tetrantacuerpos, véase Le Gall y colaboradores (1999) *FEBS Lett.* 453, 164-168). La construcción de moléculas de ScFv bivalentes también se puede conseguir por fusión genética con motivos de dimerización de proteínas para formar minicuerpos (véase Pack y colaboradores (1992) *Biochemistry* 31, 1579-1584) y minicuerpos (véase Hu y colaboradores (1996), *Cancer Res.* 56, 3055-3061). También se pueden producir tándems de ScFv-Sc-Fv ((ScFv)<sub>2</sub>) uniendo dos unidades ScFv mediante un tercer conector peptídico, véase Kurucz y colaboradores (1995) *J. Immunol.* 154, 4576-4582. Los diantacuerpos biespecíficos se pueden producir mediante la asociación no covalente de dos productos de fusión de cadenas individuales que consisten en el dominio VH de un anticuerpo conectado por un conector corto al dominio VL de otro anticuerpo, véase Kipriyanov y colaboradores (1998), *Int. J. Can* 77,763-772. La estabilidad de tales diantacuerpos biespecíficos se puede aumentar mediante la introducción de puentes disulfuro o mutaciones por "inserción en el hueco" como se ha descrito anteriormente y mediante la formación de diantacuerpos de cadena simple (ScDb) en la que dos fragmentos de ScFv híbridos se conectan a través de un conector peptídico, véase Kontermann y colaboradores (1999) *J. Immunol. Methods* 226 179-188. Las moléculas biespecíficas tetravalentes están disponibles, por ejemplo, fusionando un fragmento ScFv al dominio CH3 de una molécula IgG o a un fragmento Fab a través de la región bisagra, véase Coloma y colaboradores (1997) *Nature Biotechnol.* 15, 159-163. Alternativamente, se han creado moléculas biespecíficas tetravalentes mediante la fusión de diantacuerpos biespecíficos de cadena simple (véase Alt y colaboradores, (1999) *FEBS Lett* 454, 90-94). También se pueden formar moléculas biespecíficas tetravalentes más pequeñas mediante la dimerización de cualquiera de los dos tándems ScFv-ScFv con un conector que contiene un motivo hélice-giro-hélice (minianticuerpos DiBi, véase Muller y colaboradores (1998) *FEBS Lett* 432, 45-49) o una molécula de cadena simple que comprende cuatro dominios variables del anticuerpo (VH y VL) en una orientación que previene el apareamiento intramolecular (diantacuerpo en tándem, véase Kipriyanov y colaboradores, (1999) *J. Mol. Biol.* 293, 41-56). Los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> biespecíficos se pueden crear por acoplamiento químico de fragmentos Fab' o por heterodimerización a través de las cremalleras de leucina (véase Shalaby y colaboradores, (1992) *J. Exp. Med.* 175, 217-225 y Kostelny y colaboradores (1992), *J. Immunol.* 148, 1547-1553). También están disponibles dominios VH y VL aislados (Domantis plc), véase los documentos US 6.248.516; US 6.291.158; US 6.172.197.

En una forma de realización se proporciona un fragmento de anticuerpo terapéutico (por ejemplo ScFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>) o un fragmento de anticuerpo por ingeniería genética como se ha descrito anteriormente que se une específicamente a hIL-13 y modula (por ejemplo, inhibe o bloquea) la interacción entre hIL-13 y hIL-13R. El fragmento de anticuerpo terapéutico típicamente comprende una CDRH3 que tiene la secuencia de ID SEC N°: 3 opcionalmente junto con las CDR que tienen la secuencia indicada en ID SEC N°: 1, 2, 4, 5 y 6.

### **1.5 Anticuerpos heteroconjugados**

Los anticuerpos heteroconjugados también forman una forma de realización de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente formados usando cualquier procedimiento de entrecruzamiento conveniente. Véase el documento US 4.676.980.

### **1.6 Otras modificaciones**

La interacción entre la región Fc de un anticuerpo y varios receptores de la Fc (FcγR) se cree que media las funciones efectoras del anticuerpo que incluyen citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), fijación del complemento, fagocitosis y semi-vida/aclaramiento del anticuerpo. Se pueden llevar a cabo varias modificaciones de la región Fc de los anticuerpos de la invención dependiendo de la propiedad deseada. Por ejemplo, las mutaciones específicas en la región Fc para dar sino un anticuerpo lítico, no lítico se detallan en los documentos EP 0629 240B1 y EP 0307 434B2 o uno puede incorporar un epítipo de unión al receptor de reciclaje en el anticuerpo para incrementar su semi-vida en suero, véase el documento US 5,739,277. Actualmente hay cinco receptores Fcγ humanos reconocidos, FcγR (I), FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa y FcRn neonatal. Shields y colaboradores, (2001) *J. Biol. Chem* 276, 6591-6604 han demostrado que un grupo de residuos de la IgG1 frecuente está involucrado en la unión de todos los FcγRs, aunque FcγRII y FcγRIII utilizan sitios distintos fuera de este grupo frecuente. Un grupo de residuos de la IgG1 reduce la unión a todos los FcγRs cuando se alteran a alanina: Pro-238, Asp-265, Asp-270, Asn-297 y Pro-239. Todos están en el dominio CH2 de la IgG y agrupados cerca de la unión en bisagra CH1 y CH2. Aunque el FcγRI utilizar sólo el grupo de residuos de la IgG1 frecuente para la unión, FcγRII y FcγRIII interaccionan con distintos residuos además del grupo frecuente. La alteración de algunos residuos sólo reduce la unión a FcγRII (por ejemplo, Arg-292) o FcγRIII (por ejemplo, Glu-293). Algunas variantes presentan una unión mejorada a FcγRII o FcγRIII pero no afectan a la unión al otro receptor (por ejemplo, Ser-267Ala mejora la unión a FcγRII pero la unión a FcγRIII no está afectada). Otras variantes presentan una unión mejorada a FcγRII o FcγRIII con la reducción en la unión al otro receptor (por ejemplo, Ser-298Ala mejora la unión a FcγRIII y reduce la unión a FcγRII). Para FcγRIIIa, las mejores variantes para la unión de la IgG1 han combinado sustituciones de la alanina en la Ser-298, Glu-333 y

Lys-334. El receptor FcRn neonatal se cree que está involucrado tanto en el aclaramiento del anticuerpo como en la transcitosis a través de los tejidos (véase Junghans R.P (1997) *Immunol. Res* 16, 29-57 y Ghetie y colaboradores (2000) *Annu. Rev. Immunol.* 18, 739-766). Los residuos de IgG1 humana determinados a interactuar directamente con el FcRn humano incluyen Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 e His435. Los cambios en cualquiera de estas posiciones descritos en esta sección pueden permitir el incremento de la semi-vida en suero y/o alterar las propiedades efectoras de los anticuerpos de la invención.

Otras modificaciones incluyen variantes de glicosilación de los anticuerpos de la invención. La glicosilación de anticuerpos en posiciones conservadas en sus regiones constantes es conocida por tener un efecto profundo sobre la función del anticuerpo, particularmente el funcionamiento efector tal como aquellos descritos anteriormente, véase por ejemplo, Boyd y colaboradores (1996), *Mol. Immunol.* 32, 1311-1318. Están contempladas las variantes de glicosilación de los anticuerpos terapéuticos o sus fragmentos de unión al antígeno de la presente invención en las que se añade, se sustituye, se elimina o se modifica una o más fracciones hidrocarbonadas. La introducción de un motivo asparragina-X-serina o asparragina-X-treonina crea un sitio potencial para la unión enzimática de fracciones hidrocarbonadas y por tanto se puede usar para manipular la glicosilación de un anticuerpo. En Raju y colaboradores (2001) *Biochemistry* 40, 8868-8876 se incrementa la sialilación terminal de una inmunoadhesina TNFR-IgG mediante un procedimiento de regalactosilación y/o resialilación usando beta-1,4-galactosiltransferasa y/o alfa-2,3-sialiltransferasa. El incremento de la sialilación terminal se cree que incrementa la semi-vida de la inmunoglobulina. Los anticuerpos, en común con la mayoría de las proteínas, típicamente se producen como una mezcla de glicofomas. Esta mezcla es particularmente evidente cuando los anticuerpos se producen en células eucariotas, particularmente en células de mamífero. Se han desarrollado una variedad de procedimientos para fabricar glicofomas definidas, véase Zhang y colaboradores, *Science* (2004), 303, 371, Sears y colaboradores, *Science*, (2001) 291, 2344, Wacker y colaboradores (2002) *Science*, 298 1790, Davis y colaboradores (2002) *Chem. Rev.* 102, 579, Hang y colaboradores (2001) *Acc. Chem. Res* 34, 727. Así, la invención contempla una pluralidad de anticuerpos (monoclonales) terapéuticos (que pueden ser del isotipo IgG, por ejemplo, IgG1) como se ha descrito anteriormente que comprende un número definido (por ejemplo 7 o menos, por ejemplo 5 o menos tal como dos o una única) de glicofoma(s) de dichos anticuerpos o sus fragmentos de unión al antígeno.

Las formas de realización adicionales de la invención incluyen anticuerpos terapéuticos de la invención o sus fragmentos de unión al antígeno acoplados a un polímero no proteínico tal como polietilenglicol (PEG), polipropileno glicol o polioxialquileno. La conjugación de proteínas al PEG es una técnica establecida para incrementar la semi-vida de las proteínas, así como para reducir la antigenicidad e inmunogenocidad de las proteínas. Se ha investigado el uso de la polietilenglicolilación con diferentes pesos moleculares y formas (lineal o ramificado) con anticuerpos intactos así como con fragmentos Fab', véase Koumenis I.L. y colaboradores (2000) *Int. J. Pharmaceut.* 198:83-95.

### **3. Procedimientos de producción**

Los anticuerpos de la invención se pueden producir como una población policlonal, pero se producen más preferentemente como una población monoclonal (esto es como una población sustancialmente homogénea de anticuerpos idénticos dirigidos contra un sitio de unión antigénico específico). Por supuesto será evidente para aquellos expertos en la materia que una población implica más de una entidad de anticuerpo. Los anticuerpos de la presente invención se pueden producir en organismos transgénicos tales como cabras (véase Pollock y colaboradores (1999), *J. Immunol. Methods* 231:147-157), pollos (véase Morrow KJJ (2000) *Genet. Eng. News* 20:1-55, ratones (véase Pollock y colaboradores) o plantas (véase Doran PM, (2000) *Curr. Opinion Biotechnol.* 11, 199-204, Ma JK-C (1998), *Nat. Med.* 4; 601-606, Baez J y colaboradores, *BioPharm* (2000) 13: 50-54, Stoger E y colaboradores; (2000) *Plant Mol. Biol.* 42:583-590). Los anticuerpos también se pueden producir mediante síntesis química. No obstante, los anticuerpos de la invención típicamente se producen usando tecnología de cultivos celulares recombinantes muy conocida por aquellos expertos en la materia. Se aísla un polinucleótido que codifica el anticuerpo y se inserta en un vector replicable tal como un plásmido para una clonación adicional (amplificación) o expresión. Un sistema de expresión útil es un sistema glutamato sintetasa (tal como el vendido por Lonza Biologics), particularmente cuando la célula hospedadora es CHO o NS0 (véase a continuación). El polinucleótido que codifica el anticuerpo se aísla fácilmente y se secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, sondas de oligonucleótidos). Los vectores que se pueden usar incluyen plásmidos, virus, fagos, transposones, minicromosomas de los cuales los plásmidos son una forma de realización típica. Generalmente tales vectores además incluyen una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y secuencias de terminación de la transcripción unidas de manera operable al polinucleótido de las cadenas pesada y/o ligera para así facilitar la expresión. El polinucleótido que codifica las cadenas pesada y ligera se puede insertar en vectores separados y ser transfectado en la misma célula hospedadora o, si se desea tanto la cadena pesada como la cadena ligera se pueden insertar en el mismo vector para transfección en la célula hospedadora. Así, según un aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento para la construcción de un vector que codifica las cadenas pesada y/o ligera de un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención, cuyo procedimiento comprende la inserción en un vector de un polinucleótido que codifica cualquiera de las dos de la cadena ligera y/o cadena pesada de un anticuerpo terapéutico de la invención.

En otro aspecto de la invención se proporciona un polinucleótido que codifica un dominio VH murino que tiene la secuencia indicada como: ID SEC N°: 24.

En otro aspecto de la invención se proporciona un polinucleótido que codifica un dominio VL murino que tiene la secuencia indicada como: ID SEC N°: 25.

En otro aspecto de la invención se proporciona un polinucleótido que codifica un dominio VH que tiene la secuencia seleccionada del grupo constituido por: ID SEC N°: 26, 27, 28, 29.

- 5 En otro aspecto de la invención se proporciona un polinucleótido que codifica un dominio VL que tiene la secuencia seleccionada del grupo constituido por: ID SEC N°: 30, 31.

De acuerdo con la presente invención se proporciona un polinucleótido que codifica una cadena pesada de la invención cuyo polinucleótido se selecciona del grupo constituido por: ID SEC N°: 32, 33, 34, 35.

- 10 De acuerdo con la presente invención se proporciona un polinucleótido que codifica una cadena ligera de la invención cuyo polinucleótido se selecciona del grupo constituido por: ID SEC N°: 36, 37.

Inmediatamente será evidente para aquellos expertos en la materia que debido a la redundancia del código genético, también están disponibles polinucleótidos alternativos a aquellos descritos en este documento que codificarán los polinucleótidos de la invención.

### **3.1 Secuencias señal**

- 15 Los anticuerpos de la presente invención se pueden producir como una proteína de fusión con una secuencia señal heteróloga que tiene un sitio de ruptura específico en el N-término de la proteína madura. La secuencia señal debería ser reconocida y procesada por la célula hospedadora. Para células hospedadoras procariotas, la secuencia señal puede ser una fosfatasa alcalina, penicilinas, o secuencias conductoras de enterotoxina II estable al calor. Para la secreción de levaduras las secuencias señal pueden ser una secuencia conductora de invertasa de levaduras, secuencia conductora del factor  $\alpha$  o secuencias conductoras de fosfatasa ácida, véase por ejemplo el documento WO 90/13646. En sistemas celulares de mamíferos, están disponibles secuencias conductoras secretoras víricas tales como la señal gD del herpes simplex y una secuencia señal de inmunoglobulina nativa. Típicamente la secuencia señal está ligada al marco de lectura del ADN que codifica el anticuerpo de la invención.
- 20

### **3.2 Origen de replicación**

- 25 Los orígenes de replicación son muy conocidos en la técnica, con el pBR322 adecuado para la mayoría de bacterias gram-negativa, el plásmido 2 $\mu$  para la mayoría de las levaduras y varios orígenes víricos tales como SV40, polioma, adenovirus VSV o BPV para la mayoría de células de mamífero. Generalmente el componente origen de replicación no es necesario para los vectores de expresión en mamíferos pero se puede usar el SV40 ya que contiene el promotor temprano.

### **3.3 Marcador de selección**

- Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina o (b) complementan deficiencias auxiotróficas o suministran nutrientes no disponibles en el medio complejo. El esquema de selección puede implicar la detención del crecimiento de la célula hospedadora. Las células, que se han transformado con éxito con los genes que codifican el anticuerpo terapéutico de la presente invención, sobreviven debido a, por ejemplo, la resistencia a los fármacos conferida por el marcador seleccionable. Otro ejemplo es el denominado marcador seleccionable DHFR en el que los transformantes se cultivan en presencia de metotrexato. En formas de realización típica, las células se cultivan en presencia de cantidades crecientes de metotrexato para amplificar el número de copias del gen exógeno de interés. Las células CHO son una línea celular particularmente útil para la selección DHFR. Un ejemplo adicional es el sistema de expresión glutamato sintetasa (Lonza Biologics). Un gen seleccionable adecuado para su uso en levaduras es el gen *trp1*, véase Stinchcomb y colaboradores, *Nature* 282, 38, 1979.
- 35
- 40

### **3.4 Promotores**

- Los promotores adecuados para la expresión de los anticuerpos de la invención están unidos de manera operable al ADN/polinucleótido que codifica el anticuerpo. Los promotores para células procariotas incluyen el promotor *phoA*, los sistemas promotores lactosa y beta-lactamasa, fosfatasa alcalina, triptófano y promotores híbridos tal como *Tac*. Los promotores adecuados para la expresión en células de levadura incluyen 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, por ejemplo, enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa y glucoquinasa. Los promotores de levaduras inducibles incluyen alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, metalotioneína y enzimas responsables del metabolismo del nitrógeno o de la utilización de maltosa/galactosa.
- 45
- 50

Los promotores para la expresión en sistemas celulares de mamíferos incluyen promotores víricos tales como promotores de polioma, de la viruela aviar y adenovirus (por ejemplo, adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus (en particular el promotor del gen temprano inmediato), retrovirus, virus de la

hepatitis B, actina, virus del sarcoma de Rous (RSV) y el virus simio 40 temprano o tardío. Por supuesto la elección del promotor está basada en la compatibilidad adecuada con la célula hospedadora usada para la expresión. En una forma de realización por tanto se proporciona un primer plásmido que comprende un promotor de RSV y/o SV40 y/o CMV, el ADN que codifica la región V de la cadena ligera (VL) de la invención, la región κC junto con marcadores seleccionables de resistencia a neomicina y ampicilina y un segundo plásmido que comprende un promotor de RSV o SV40, ADN que codifica para la región V de la cadena pesada (VH) de la invención, ADNc que codifica la región constante γ1, DHFR y marcadores de resistencia a ampicilina.

### 3.5 Elemento potenciador

Cuando sea apropiado, por ejemplo, para la expresión en procariotas superiores, se puede usar un elemento potenciador unido de manera operable al elemento promotor en un vector. Secuencias potenciadas de mamífero adecuadas incluyen elementos potenciadores de globina, elastasa, albúmina, fetoproteína e insulina. Alternativamente, se puede usar un elemento potenciador de un virus de células eucariotas tal como el potenciador de SV40 (en los pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma, el potenciador baculovírico o el locus IgG2a murino (véase el documento WO 04/009823). El potenciador preferentemente está localizado en el vector en una posición aguas arriba al promotor.

### 3.6 Células hospedadoras

Las células hospedadoras adecuadas para los vectores de expresión o clonación que codifican los anticuerpos de la invención son células procariotas, levaduras o eucariotas superiores. Las células procariotas adecuadas incluyen eubacterias, por ejemplo, enterobacteriaceae tales como *Escherichia* por ejemplo *E. coli* (por ejemplo ATCC 31.446; 31.537; 27.325), *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella* por ejemplo *Salmonella typhimurium*, *Serratia* por ejemplo *Serratia marcescans* y *Shigella* así como Bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (véase DD 266 710), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. De las células hospedadoras de levaduras, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* (por ejemplo ATCC 16.045; 12.424; 24.178; 56.500), *Yarrowia* (EP 402.226), *Pichia Pastoris* (EP 183.070, véase también Peng y colaboradores, *J. Biotechnol.* 108 (2004) 185-192), también están contemplados hospedadores *Candida*, *Trichoderma reesia* (EP 244.234), *Penicillin*, *Tolypocladium* y *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Aunque las células hospedadoras procariotas y de levaduras están contempladas específicamente por la invención, no obstante preferentemente, las células hospedadoras de la presente invención son células eucariotas superiores. Las células hospedadoras eucariotas superiores adecuadas incluyen células de mamíferos tales como COS-1 (ATCC nº CRL 1650), COS-7 (ATCC CRL 1651), línea de riñón embrionario humano 293, células de riñón de hámster neonato (BHK) (ATCC CRL.1632), BHK570 (ATCC NO: CRL 10314), 293 (ATCC nº CRL 1573), células CHO de ovario de hámster chino (por ejemplo CHO-K1, ATCC NO: CCL 61, línea celular DHFR-CHO tal como DG44 (véase Urlaub y colaboradores, (1986) *Somatic Cell Mol. Genet.* 12, 555-556)), particularmente aquellas líneas celulares CHO adaptadas para los cultivos en suspensión, células de Sertoli de ratón, células de riñón de mono, células de riñón de mono verde africano (ATCC CRL-1587), células HELA, células de riñón de perro (ATCC CCL 34), células pulmonares humanas (ATCC CCL 75), Hep G2 y mieloma o células de linfoma, por ejemplo, NSO (véase el documento US 5.807.715), Sp2/0, Y0. Así en una forma de realización de la invención se proporciona una célula hospedadora transformada establemente que comprende un vector que codifica una cadena pesada y/o una cadena ligera del anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo como se ha descrito anteriormente. Preferentemente tales células hospedadoras comprenden un primer vector que codifica la cadena ligera y un segundo vector que codifica dicha cadena pesada.

### Fermentación bacteriana

Los sistemas bacterianos son particularmente adecuados para la expresión de fragmentos de anticuerpo. Tales fragmentos están localizados intracelularmente o dentro del periplasma. Las proteínas periplasmáticas insolubles se pueden extraer y replegarse para formar proteínas activas según los procedimientos conocidos por aquellos expertos en la materia, véase Sánchez y colaboradores (1999) *J. Biotechnol.* 72, 13-20 y Cupit PM y colaboradores (1999) *Lett Appl Microbiol*, 29, 273-277.

### 3.7 Procedimientos de cultivos celulares

Las células hospedadoras transformadas con vectores que codifican los anticuerpos terapéuticos de la invención o sus fragmentos de unión al antígeno se pueden cultivar mediante cualquier procedimiento conocido por aquellos expertos en la materia. Las células hospedadoras se pueden cultivar en matraces agitados, frascos de rodillo o sistemas de fibra hueca, pero se prefiere para la producción a gran escala el uso de reactores de tanque agitado, particularmente para cultivos en suspensión. Preferentemente los tanques agitados se adaptan para la aireación usando, por ejemplo, aspersores, deflectores o impedidores de baja cizalladura. Para las columnas de burbujeo y los reactores de aerotransporte se puede usar aireación directa con burbujas de aire u oxígeno. Cuando las células hospedadoras se cultivan en un medio de cultivo sin suero se prefiere que el medio esté suplementado con un agente protector celular tal como pluronic F-68 para ayudar a prevenir el daño celular como resultado del proceso de

aireación. Dependiendo de las características de la célula hospedadora, se puede usar cualquiera de los dos microvehículos como sustratos de crecimiento para líneas celulares dependientes del anclaje o las células se pueden adaptar al cultivo en suspensión (que es típico). El cultivo de células hospedadoras, particularmente células hospedadoras de invertebrados puede utilizar una variedad de modos de operación tal como alimentación discontinua, procesamiento en discontinuo repetido (véase Drapeau y colaboradores (1994) *Cytotechnology* 15: 103-109), proceso en discontinuo extendido o cultivo por perfusión. Aunque las células hospedadoras de mamífero transformadas recombinantemente se pueden cultivar en medios que contienen suero tal como suero fetal bovino (FCS), se prefiere que tales células hospedadoras se cultiven en medios sintéticos exentos de suero tal como los descritos en Keen y colaboradores (1995) *Cytotechnology* 17:153-163, o medios disponibles comercialmente tales como ProCHO-CDM o UltraCHO™ (Cambrex NJ, USA), suplementados cuando sea necesario con una fuente energética tal como glucosa y factores de crecimiento sintéticos tales como insulina. El cultivo de células hospedadoras sin suero puede requerir que aquellas células se adapten al crecimiento en las condiciones sin suero. Una aproximación de adaptación es cultivar tales células hospedadoras en medio que contiene suero e intercambiar repetidamente el 80% del medio de cultivo por medio sin suero de manera que las células hospedadoras aprendan a adaptarse a las condiciones sin suero (véase por ejemplo, Scharfenberg K y colaboradores (1995) en *Animal Cell technology: Developments towards the 21st century* (Beuvery E.C. y colaboradores eds), pp 619-623, Kluwer Academic publishers).

Los anticuerpos de la invención secretados al medio se pueden recuperar y purificar usando una variedad de técnicas para dar un grado de purificación adecuado para el uso pretendido. Por ejemplo el uso de los anticuerpos terapéuticos de la invención para el tratamiento de pacientes humanos típicamente exige una pureza de al menos el 95%, más típicamente del 98% o el 99% o una pureza superior (comparado con el medio de cultivo en bruto). En el primer caso, típicamente los restos celulares se eliminan del medio de cultivo usando centrifugación seguida de una etapa de clarificación del sobrenadante usando, por ejemplo, microfiltración, ultrafiltración y/o filtración de profundidad. Están disponibles una variedad de otras técnicas tales como diálisis y electroforesis en gel y técnicas cromatográficas tales como hidroxipatita (HA), cromatografía de afinidad (que opcionalmente implica un sistema de marcaje de afinidad tal como polihistidina) y/o cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, véase el documento US 5.429.746). En una forma de realización, los anticuerpos de la invención, después de varias etapas de clarificación, se capturan usando cromatografía de afinidad con proteína A o G seguida de etapas cromatográficas adicionales tales como intercambio iónico y/o cromatografía HA, intercambio catiónico o aniónico, cromatografía de exclusión molecular y precipitación con sulfato de amonio. Típicamente, también se emplean varias etapas de eliminación de virus (por ejemplo, nanofiltración usando por ejemplo un filtro DV-20). Después de estas diversas etapas, se proporciona una preparación purificada (preferentemente monoclonal) que comprende al menos 75 mg/ml o superior, por ejemplo, 100 mg/ml o superior del anticuerpo de la invención o fragmento de unión al antígeno del mismo y por tanto forma una forma de realización de la invención.

#### 4. Composiciones farmacéuticas

Las preparaciones purificadas de los anticuerpos de la invención (particularmente las preparaciones monoclonales) como se ha descrito anteriormente, se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de trastornos y enfermedades humanas tales como enfermedades atópicas, por ejemplo, asma, rinitis alérgica, EPOC. Típicamente tales composiciones comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable según lo conocido y denominado por práctica farmacéutica aceptable, véase por ejemplo Remingtons Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, (1980), Mack Publishing Co. Los ejemplos de tales vehículos incluyen vehículos esterilizados tales como solución salina, solución de Ringer o solución de dextrosa, tamponados con tampones adecuados a un pH dentro de un intervalo de 5 a 8. Las composiciones farmacéuticas para inyección (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intramuscular o intraportal) o para infusión continua están convenientemente exentas de materia particulada visible y pueden comprender entre 0,1 ng y 100 mg de anticuerpo, preferentemente entre 5 mg y 25 mg de anticuerpo. Los procedimientos para la preparación de tales composiciones farmacéuticas son muy conocidos por aquellos expertos en la materia. En una forma de realización, las composiciones farmacéuticas comprenden entre 0,1 ng y 100 mg de los anticuerpos terapéuticos de la invención en formas de dosificación unitarias, opcionalmente junto con las instrucciones para su uso. Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden liofilizar (secado en congelación) para su reconstitución antes de la administración según los procedimientos muy conocidos o evidentes para aquellos expertos en la materia. Cuando las formas de realización de la invención comprenden los anticuerpos de la invención con un isotipo IgG1, se puede añadir a la composición farmacéutica un quelante de cobre tal como citrato (por ejemplo, citrato sódico) o EDTA o histidina para reducir el grado de degradación de los anticuerpos de este isotipo mediada por cobre, véase el documento EP 0612251. El tratamiento anti-hIL-13 se puede administrar oralmente, por inhalación, tópicamente (por ejemplo, intraocular, intranasal, rectal, en heridas en la piel).

Las dosis efectivas y los regímenes de tratamiento para la administración del anticuerpo de la invención generalmente se determinan empíricamente y dependen de factores tales como la edad, el peso y el estado de salud del paciente y la enfermedad o trastorno a tratar. Tales factores están dentro del ámbito del facultativo que atiende. Se puede encontrar consejo para la selección de las dosis apropiadas en por ejemplo, Smith y colaboradores (1977) *Antibodies in human diagnosis and therapy*, Raven Press, Nueva York, pero en general estarán entre 1 mg y 1000 mg.

Dependiendo de la enfermedad o trastorno a tratar (pero particularmente el asma), las composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la invención se pueden usar simultánea, separada o secuencialmente con una cantidad eficaz de otro medicamento tal como agentes antiinflamatorios (por ejemplo, corticoesteroides o un NSAID), agentes anticolinérgicos (particularmente antagonistas del receptor M1/M2/M3), agonistas del adrenergico  $\beta_2$ , agentes anti-infecciosos (por ejemplo antibióticos, antivíricos), antihistamínicos, inhibidor de la PDE4. Los ejemplos de agonistas del adrenergico  $\beta_2$  incluyen salmeterol, salbutamol, formoterol, salmefamol, fenoterol, terbutalina. Los agonistas del adrenergico  $\beta_2$  de duración prolongada preferidos incluyen aquellos descritos en los documentos WO 02/66422A, WO 02/270490, WO 02/076933, WO 03/024439 y WO 03/072539. Los corticoesteroides adecuados incluyen metil prednisolona, prednisolona, dexametasona, propionato de fluticasona, éster S-fluorometílico del ácido  $6\alpha,9\alpha$ -difluoro- $17\alpha$ -[(2-furanilcarbonil)oxi]- $11\beta$ -hidroxi- $16\alpha$ -metil-3-oxo-androsta-1,4-dien- $17\beta$ -carbotoico, éster S-(2-oxo-tetrahydro-furan-3S-il) del ácido  $6\alpha,9\alpha$ -difluoro- $11\beta$ -hidroxi- $16\alpha$ -metil-3-oxo- $17\alpha$ -propioniloxi-androsta-1,4-dien- $17\beta$ -carbotoico, ésteres de beclometasona (por ejemplo el éster 17-propionato o el éster 17,21-dipropionato), budesonida, flunisolida, ésteres de mometasona (por ejemplo el éster furoato), acetonuro de triamcinolona, rofleponida, ciclesonida ( $16\alpha,17$ -[[*(R)*-ciclohexilmetil]bis(oxi)]- $11\beta,21$ -dihidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona), propionato de butixocort, RPR-106541, y ST-126. Los corticoesteroides preferidos incluyen el propionato de fluticasona, éster S-fluorometílico del ácido  $6\alpha,9\alpha$ -difluoro- $11\beta$ -hidroxi- $16\alpha$ -metil- $17\alpha$ -[(4-metil-1,3-tiazol-5-carbonil)oxi]-3-oxo-androsta-1,4-dien- $17\beta$ -carbotoico y el éster S-fluorometílico del ácido  $6\alpha,9\alpha$ -difluoro- $17\alpha$ -[(2-furanilcarbonil)oxi]- $11\beta$ -hidroxi- $16\alpha$ -metil-3-oxo-androsta-1,4-dien- $17\beta$ -carbotoico, más preferentemente el éster S-fluorometílico del ácido  $6\alpha,9\alpha$ -difluoro- $17\alpha$ -[(2-furanilcarbonil)oxi]- $11\beta$ -hidroxi- $16\alpha$ -metil-3-oxo-androsta-1,4-dien- $17\beta$ -carbotoico.

Los compuestos no esteroideos que tienen agonismo glucocorticoide que pueden poseer selectividad para la trans-represión sobre la trans-activación y que pueden ser útiles en terapia de combinación incluyen aquellos cubiertos en las siguientes patentes: WO 03/082827, WO 01/10143, WO 98/54159, WO 04/005229, WO 04/009016, WO 04/009017, WO 04/018429, WO 03/104195, WO 03/082787, WO 03/082280, WO 03/059899, WO 03/101932, WO 02/025665, WO 01/16128, WO 00/66590, WO 03/086294, WO 04/026248, WO 03/061651, WO 03/08277.

Los agentes antiinflamatorios adecuados incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID).

Los NSAID adecuados incluyen cromoglicato sódico, nedocromil sódico, inhibidores de la fosfodiesterasa (PDE) (por ejemplo, teofilina, inhibidores de la PDE4 o inhibidores de la PDE3/PDE4 mixtos), antagonistas de leucotrienos, inhibidores de la síntesis de leucotrienos, antagonistas de la integrina  $\beta$ -2 y antagonistas o agonistas del receptor de la adenosina (por ejemplo agonistas de la adenosina 2a), agonistas de citoquinas (por ejemplo, antagonistas de quimioquinas, tales como un antagonista de CCR3) o inhibidores de la síntesis de citoquinas, o inhibidores de la 5-lipoxigenasa. Otros agonistas del adrenergico  $\beta_2$  adecuados incluyen salmeterol (por ejemplo como el xinafoato), salbutamol (por ejemplo como el sulfato o la base libre), formoterol (por ejemplo como el fumarato), fenoterol o terbutalina y sus sales. Un inhibidor de la iNOS (inhibidor de la óxido nítrico sintasa inducible) preferentemente es para la administración por vía oral. Los inhibidores de la iNOS adecuados incluyen aquellos descritos en los documentos WO 93/13055, WO 98/30537, WO 02/50021, WO 95/34534 y WO 99/62875. Los inhibidores de CCR3 adecuados incluyen aquellos descritos en el documento WO 02/26722.

De particular interés es el uso de los anticuerpos de la invención en combinación con un inhibidor de la fosfodiesterasa 4 (PDE4). El inhibidor específico de la PDE4 útil en este aspecto de la invención puede ser cualquier compuesto que sea conocido por inhibir la enzima PDE4 o que se descubra que actúa como un inhibidor de la PDE4, y que solamente son inhibidores de la PDE4, no compuestos que inhiban otros miembros de la familia PDE, tal como la PDE3 y la PDE5, así como la PDE4.

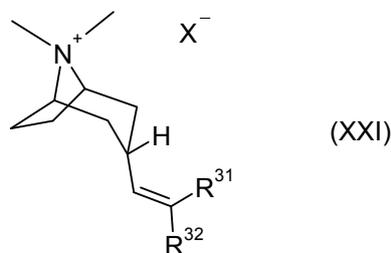
Los compuestos de interés incluyen ácido *cis*-4-ciano-4-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil)ciclohexan-1-carboxílico, 2-carbometoxi-4-ciano-4-(3-ciclopropilmetoxi-4-difluorometoxifenil)ciclohexan-1-ona y *cis*-[4-ciano-4-(3-ciclopropilmetoxi-4-difluorometoxifenil)ciclohexan-1-ol]. También, ácido *cis*-4-ciano-4-[3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil]ciclohexan-1-carboxílico (también conocido como cilomilast) y sus sales, ésteres, profármacos o formas físicas, que se describen en la patente de EE.UU. 5.552.438 expedida el 3 de septiembre de 1996;

AWD-12-281 de Elbion (Hofgen, N. y colaboradores. 15ª *EFMC Int Symp Med Chem* (Sept 6-10, Edinburgh) 1998, Abst P.98; referencia CAS n° 247584020-9); un derivado de la 9-benciladenina denominado NCS-613 (INSERM); D-4418 de Chiroscience and Schering-Plough; un inhibidor de la PDE4 benzodiacepina identificado como CI-1018 (PD-168787) y atribuido a Pfizer; un derivado del benzodioxol descrito por Kyowa Hakko en el documento WO 99/16766; K-34 de Kyowa Hakko; V-11294A de Napp (Landells, L.J. y colaboradores, *Eur Resp J* [Annu Cong Eur Resp Soc (Sept 19-23, Génova) 1998] 1998, 12 (Supl. 28): Abst P2393); roflumilast (referencia CAS No 162401-32-3) y una ftalacinona (WO 99/47505, cuya descripción se incorpora en el presente documento por referencia) de Byk-Gulden; Pumafentrina, (-)-p-[(4aR\*,10bS\*)-9-etoxi-1,2,3,4,4a,10b-hexahidro-8-metox-2-metilbenzo[c][1,6]naftiridin-6-il]-N,N-diisopropilbenzamida que es un inhibidor de la PDE3/PDE4 mixto que ha sido preparado y publicado por Byk-Gulden, ahora Altana; arofilina el desarrollo por Almirall-Prodesfarma; VM554/UM565 de Vernalis; o T-440 (Tanabe Seiyaku; Fuji, K. y colaboradores, *J Pharmacol Exp Ther*, 1998, 284(1): 162), y T2585.

Compuestos de interés adicionales se describen en la solicitud de patente internacional publicada WO 04/024728 (Glaxo Group Ltd), PCT/EP 2003/014867 (Glaxo Group Ltd) y PCT/EP 2004/005494 (Glaxo Group Ltd).

Los agentes anticolinérgicos adecuados son aquellos compuestos que actúan como antagonistas de los receptores muscarínicos, en particular aquellos compuestos que son antagonistas de los receptores  $M_1$  o  $M_3$ , antagonistas dobles de  $M_1/M_3$  o  $M_2/M_3$ , receptores o pan-antagonistas de los receptores  $M_1/M_2/M_3$ . Compuestos ejemplares para la administración por inhalación incluyen ipratropium (por ejemplo como bromuro, CAS 22254-24-6, vendido bajo el nombre Atrovent), oxitropium (por ejemplo como bromuro, CAS 30286-75-0) y tiotropium (por ejemplo como bromuro, CAS 136310-93-5, vendido bajo el nombre Spiriva). También son de interés el revatropato (por ejemplo como clorhidrato, CAS 262586-79-8) y el LAS-34273 que se describe en el documento WO 01/04118. Compuestos ejemplares para la administración por vía oral incluyen pirencepina (CAS 28797-61-7), darifenacina (CAS 133099-04-4, o CAS 133099-07-7 para el bromhidrato vendido bajo el nombre Enablex), oxibutinina (CAS 5633-20-5, vendido bajo el nombre Ditropan), terodilina (CAS 15793-40-5), tolterodina (CAS 124937-51-5, o CAS 124937-52-6 para el tartrato, vendido bajo el nombre Detrol), otilonium (por ejemplo como bromuro, CAS 26095-59-0, vendido bajo el nombre Spasmomen), cloruro de trospium (CAS 10405-02-4) y solifenacina (CAS 242478-37-1, o CAS 242478-38-2 para el succinato también conocido como YM-905 y vendido bajo el nombre Vesicare).

Otros agentes anticolinérgicos adecuados incluyen compuestos de fórmula (XXI), que se describen en la solicitud de patente de EE.UU. 60/487981:



20 en la cual la orientación preferida de la cadena alquílica unida al anillo tropano es endo;

$R^{31}$  y  $R^{32}$  se seleccionan, independientemente, del grupo que consiste en grupos alquilo inferiores de cadena lineal o ramificada que preferentemente tienen entre 1 y 6 átomos de carbono, grupos cicloalquilo que tienen entre 5 y 6 átomos de carbono, cicloalquil-alquilo que tienen entre 6 y 10 átomos de carbono, 2-tienilo, 2-piridilo, fenilo, fenilo sustituido con un grupo alquilo que no excede de 4 átomos de carbono y fenilo sustituido con un grupo alcoxilo que no excede de 4 átomos de carbono;

$X^-$  representa un anión asociado a la carga positiva del átomo de N.  $X^-$  puede ser, pero no está limitado a, cloruro, bromuro, yoduro, sulfato, bencenosulfonato, y toluensulfonato, incluyendo, por ejemplo:

Bromuro de (3-endo)-3-(2,2-di-2-tieniletetil)-8,8-dimetil-8-azoniabicyclo[3.2.1]octano;

bromuro de (3-endo)-3-(2,2-difeniletetil)-8,8-dimetil-8-azoniabicyclo[3.2.1]octano;

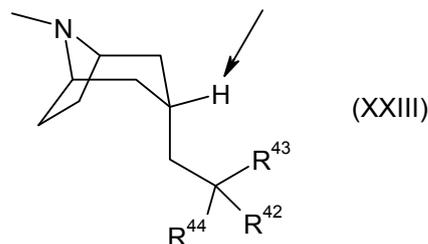
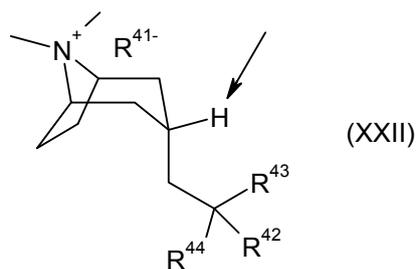
30 4-metilbencenosulfonato de (3-endo)-3-(2,2-difeniletetil)-8,8-dimetil-8-azoniabicyclo[3.2.1]octano;

bromuro de (3-endo)-8,8-dimetil-3-[2-fenil-2-(2-tienil)etenil]-8-azoniabicyclo[3.2.1]octano; y/o

bromuro de (3-endo)-8,8-dimetil-3-[2-fenil-2-(2-piridinil)etenil]-8-azoniabicyclo[3.2.1]octano.

Los agentes anticolinérgicos adecuados adicionales incluyen compuestos de fórmula (XXII) o (XXIII), que se describen en la solicitud de patente de EE.UU. 60/511009:

35



en las que:

el átomo de H indicado está en posición exo;

R<sup>41-</sup> representa un anión asociado a la carga positiva del átomo de N.

5 R<sup>1-</sup> puede ser, pero no está limitado a, cloruro, bromuro, yoduro, sulfato, bencenosulfonato y toluensulfonato;

R<sup>42</sup> y R<sup>43</sup> se seleccionan, independientemente, del grupo que consiste en grupos alquilo inferiores de cadena lineal o ramificada (que preferentemente tienen entre 1 y 6 átomos de carbono), grupos cicloalquilo (que tienen entre 5 y 6 átomos de carbono), cicloalquil-alquilo (que tienen entre 6 y 10 átomos de carbono), heterocicloalquilo (que tienen entre 5 y 6 átomos de carbono) y N u O como heteroátomo, arilo, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo, y heteroarilo opcionalmente sustituido; y N u O como el heteroátomo, heterocicloalquil-alquilo (que tiene de 6 a 10 átomos de carbono);

R<sup>44</sup> se selecciona del grupo que consiste en alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>), heterocicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), alquil(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)cicloalquilo(C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>), alquil(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)heterocicloalquilo(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), arilo, heteroarilo, alquil(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)arilo, alquil(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)heteroarilo, -OR<sup>45</sup>, -CH<sub>2</sub>OR<sup>45</sup>, -CH<sub>2</sub>OH, -CN, -CF<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>O(CO)R<sup>46</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>47</sup>, -CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>N(R<sup>47</sup>)SO<sub>2</sub>R<sup>45</sup>, -SO<sub>2</sub>N(R<sup>47</sup>)(R<sup>48</sup>), -CON(R<sup>47</sup>)(R<sup>48</sup>), -CH<sub>2</sub>N(R<sup>48</sup>)CO(R<sup>46</sup>), -CH<sub>2</sub>N(R<sup>48</sup>)SO<sub>2</sub>(R<sup>46</sup>), -CH<sub>2</sub>N(R<sup>48</sup>)CO<sub>2</sub>(R<sup>45</sup>), -CH<sub>2</sub>N(R<sup>48</sup>)CONH(R<sup>47</sup>);

R<sup>45</sup> se selecciona del grupo que consiste en alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquil(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)cicloalquilo(C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>), alquil(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)heterocicloalquilo(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), alquil(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)arilo, alquil(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)heteroarilo;

R<sup>46</sup> se selecciona del grupo que consiste en alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>), heterocicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), alquil(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)cicloalquilo(C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>), alquil(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)heterocicloalquilo(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), arilo, heteroarilo, alquil(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)arilo, alquil(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)heteroarilo;

R<sup>47</sup> y R<sup>48</sup> se seleccionan, independientemente, del grupo que consiste en H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>), heterocicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), alquil(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)cicloalquilo(C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>), alquil(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)heterocicloalquilo(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), alquil(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)arilo, y alquil(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)heteroarilo, incluyendo, por ejemplo,:

25 Yoduro de (*endo*)-3-(2-metoxi-2,2-di-tiofen-2-il-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano;

3-((*endo*)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propionitrilo;

(*endo*)-8-metil-3-(2,2,2-trifenil-etil)-8-aza-biciclo[3.2.1]octano;

3-((*endo*)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propionamida;

ácido 3-((*endo*)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propiónico;

30 yoduro de (*endo*)-3-(2-ciano-2,2-difenil-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano;

bromuro de (*endo*)-3-(2-ciano-2,2-difenil-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano;

3-((*endo*)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propan-1-ol;

N-bencil-3-((*endo*)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propionamida;

yoduro de (*endo*)-3-(2-carbamoil-2,2-difenil-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano;

35 1-bencil-3-[3-((*endo*)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propil]-urea;

1-etil-3-[3-((*endo*)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propil]-urea;

N-[3-((*endo*)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propil]-acetamida;

*N*-[3-((*endo*)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propil]-benzamida;

3-((*endo*)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-di-tiofen-2-il-propionitrilo;

yoduro de (*endo*)-3-(2-ciano-2,2-di-tiofen-2-il-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano;

*N*-[3-((*endo*)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propil]-bencenosulfonamida;

5 [3-((*endo*)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propil]-urea;

*N*-[3-((*endo*)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propil]-metanosulfonamida; y/o

bromuro de (*endo*)-3-{2,2-difenil-3-[(1-fenil-metanoil)-amino]-propil}-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano.

Los compuestos más preferidos útiles en la presente invención incluyen:

Yoduro de (*endo*)-3-(2-metoxi-2,2-di-tiofen-2-il-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano;

10 yoduro de (*endo*)-3-(2-ciano-2,2-difenil-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano;

bromuro de (*endo*)-3-(2-ciano-2,2-difenil-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano;

yoduro de (*endo*)-3-(2-carbamoil-2,2-difenil-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano;

yoduro de (*endo*)-3-(2-ciano-2,2-di-tiofen-2-il-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano; y/o

bromuro de (*endo*)-3-{2,2-difenil-3-[(1-fenil-metanoil)-amino]-propil}-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano.

15 Los antihistamínicos adecuados (también denominados antagonistas del receptor H1) incluyen cualquiera de uno o más de los numerosos antagonistas conocidos que inhiben los receptores H1, y son seguros para su uso en humanos. Los antagonistas de primera generación, incluyen derivados de etanolaminas, etilendiaminas, y alquilaminas, por ejemplo difenilhidramina, pirilamina, clemastina, clorfeniramina. Los antagonistas de segunda generación, que son no sedantes, incluyen loratidina, desloratidina, terfenadina, astemizol, acrivastina, azelastina, levocetirizina, fexofenadina y cetirizina.

20 Los ejemplos de antihistamínicos preferidos incluyen loratidina, desloratidina, fexofenadina y cetirizina.

Otras combinaciones contempladas incluyen el uso de los anticuerpos de la invención en combinación con un agente anti-IL-4 (por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-4 tal como pascolizumab) y/o un agente anti-IL-5 (por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-5 tal como mepolizumab) y/o un agente anti-IgE (por ejemplo, un anticuerpo anti-IgE tal como omalizumab (Xolair™) o talizumab).

25 Convenientemente, también está contemplada por la presente invención una composición farmacéutica que comprende un kit de partes del anticuerpo de la invención o sus fragmentos de unión al antígeno junto con otros medicamentos opcionalmente junto con las instrucciones para su uso.

30 La invención además contempla una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo terapéutico monoclonal o sus fragmentos de unión al antígeno como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento de enfermedades sensibles a la modulación de la interacción entre hIL-13 y hIL-13R.

35 De acuerdo con la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo terapéutico humanizado monoclonal cuyo anticuerpo comprende un dominio VH seleccionado del grupo constituido por: ID SEC N°: 11, 12, 13, 14 y un dominio VL seleccionado del grupo constituido por: ID SEC N°: 15, 16.

40 De acuerdo con la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo terapéutico monoclonal que comprende una cadena pesada seleccionada del grupo constituido por: ID SEC N°: 18, 19, 20, 21 y una cadena ligera seleccionada del grupo constituido por: ID SEC N°: 22, 23.

De acuerdo con la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo terapéutico monoclonal que comprende una cadena pesada de ID SEC N°: 18 y una cadena ligera de ID SEC N°: 22 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 De acuerdo con la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal que comprende (o que consiste esencialmente de) una cadena pesada de SEC.ID.N.º: 18 y una cadena ligera de SEC.ID.N.º: 22 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de una población monoclonal de anticuerpo terapéutico cuyo anticuerpo terapéutico comprende una cadena pesada de ID SEC N°: 18 y una cadena ligera de ID SEC N°: 22.

## 5 5. Usos clínicos

Los anticuerpos de la invención se pueden usar en el tratamiento de enfermedades/trastornos atópicos y enfermedades/trastornos inflamatorios crónicos. De particular interés es su uso en el tratamiento del asma, tal como asma alérgica, particularmente asma grave (esto es, asma que no es sensible al tratamiento habitual, incluyendo corticoides administrados sistémicamente; véase Busse WW y colaboradores, *J Allergy Clin. Immunol* 2000, 106: 1033-1042), asma "difícil" (definido como el fenotipo asmático caracterizado por el fallo para conseguir el control a pesar de dosis máximas recomendadas de esteroides inhalados prescritos, véase Barnes PJ (1998), *Eur Respir J* 12:1208-1218), asma "inestable" (define un subgrupo de pacientes con asma inestable grave que mantienen una variabilidad del flujo expiratorio máximo amplio (PEF) a pesar de dosis elevadas de esteroides inhalados, véase Ayres JG y colaboradores (1998) *Thorax* 58:315-321), asma nocturna, asma premenstrual, asma resistente a esteroides (véase Woodcock AJ (1993) *Eur Respir J* 6:743-747), asma dependiente de esteroides (definido como el asma que sólo se puede controlar con dosis elevadas de esteroides orales), asma inducida por aspirina, asma de inicio en el adulto, asma pediátrica. Los anticuerpos de la invención se pueden usar para prevenir, reducir la frecuencia de, o aliviar los efectos de los episodios asmáticos agudos (*status asthmaticus*). Los anticuerpos de la invención también se pueden usar para reducir la dosificación necesaria (tanto en términos de cantidad administrada como de frecuencia de dosificación) de otros medicamentos usados en el tratamiento del asma. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención se pueden usar para reducir la dosificación necesaria para el tratamiento del asma con esteroides tal como tratamiento con corticoesteroides ("ahorro de esteroides"). Otras enfermedades o trastornos que se pueden tratar con los anticuerpos de la invención incluyen dermatitis atópica, rinitis alérgica, enfermedad de Crohn, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), esofagitis eosinófila, trastornos o enfermedades fibróticas tales como fibrosis pulmonar idiopática, esclerosis sistémica progresiva (esclerodermia), fibrosis hepática, granulomas hepáticos, esquistosomiasis, leishmaniasis, y enfermedades de la regulación del ciclo celular, por ejemplo, enfermedad de Hodgkin, leucemia linfocítica crónica de las células B. Además las enfermedades o trastornos que pueden ser tratados con anticuerpos de la invención están detallados en los antecedentes de la invención, sección anterior.

En una forma de realización de la invención se proporciona un procedimiento para el tratamiento de un paciente humano afectado de una afección asmática que no responde al tratamiento con corticoesteroides cuyo procedimiento comprende la etapa de administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención.

En otra forma de realización se proporciona un procedimiento para la prevención de un ataque asmático agudo en un paciente humano cuyo procedimiento comprende la etapa de administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención.

En otra forma de realización se proporciona un procedimiento para la reducción de la frecuencia de y/o alivio de los efectos de un ataque asmático agudo en un paciente humano cuyo procedimiento comprende la etapa de administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención.

En otra forma de realización de la invención se proporciona un procedimiento para predisponer la respuesta de las células T ayudantes hacia una respuesta de tipo Th1 después de un ataque alérgico o inflamatorio en un paciente humano cuyo procedimiento comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o sus fragmentos de unión al antígeno de la invención.

En otra forma de realización de la invención se proporciona un procedimiento para el tratamiento de un paciente humano que tiene la variante hIL-13 Q130 cuyo paciente está afectado de asma, tal como asma grave, dicho procedimiento comprende la etapa de administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o sus fragmentos de unión al antígeno de la invención.

Aunque la presente invención se ha descrito principalmente en relación al tratamiento de enfermedades o trastornos humanos, la presente invención también puede tener aplicaciones en el tratamiento de enfermedades o trastornos similares en mamíferos no humanos.

La presente invención ahora se describe por medio de un único ejemplo.

### Ejemplificación

#### 1. Generación de anticuerpos monoclonales y caracterización del anticuerpo monoclonal 6a1 de ratón

Los anticuerpos monoclonales (Acsm) se producen por células de hibridoma generalmente de acuerdo con el procedimiento indicado en E Harlow y D Lane, *Antibodies a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory,

1988. El resultado de la fusión de células de mieloma de ratón con linfocitos B de ratones inmunizados con el antígeno diana. La célula de hibridoma se inmortaliza mediante la pareja de fusión mieloma mientras que la capacidad para producir anticuerpos se proporciona mediante el linfocito B.

5 Se inmunizaron cinco ratones SJL por inyección intraperitoneal con 2 µg cada uno de IL-13 humana recombinante derivada de *E. coli* (Cambridge Bioscience, N° cat. CH-013). Se usó un esquema de inmunización para desarrollar una elevada titulación de anticuerpos anti-IL-13 humana por la respuesta inmunitaria en los ratones. Después de cinco inmunizaciones durante 64 días, los ratones se sacrificaron selectivamente y se recogieron las células del bazo. Las células del bazo de 3 de los ratones se retiraron y los linfocitos B se fusionaron con células de mieloma de ratón derivadas de células P3X usando PEG1500 (Boehringer) para generar hibridomas. Las líneas celulares de hibridoma individuales se clonaron por dilución limitante (E Harlow y D Lane). Se identificó microscópicamente los pocillos que contenían colonias únicas y los sobrenadantes se probaron para su actividad. Las células de la mayoría de los clones activos se expandieron para criopreservación, producción de anticuerpos, etc.

15 Inicialmente, los sobrenadantes de hibridoma se examinaron para su actividad de unión frente a una proteína IL-13 humana marcada con det-1 recombinante expresada en *E. coli* (elaboración propia) en un formato de ensayo en sándwich. Se completó un examen secundario de estos positivos usando un procedimiento BIAcore™ para detectar la unión a la proteína IL-13 humana marcada con det-1. A continuación las muestras de estos hibridomas se probaron para su capacidad para neutralizar la bioactividad de IL-13 humana recombinante expresada en *E. coli* (Cambridge Bioscience, cat. no CH-013) en un bioexperimento con células TF-1.

20 Se subclonaron seis positivos identificados del bioexperimento de neutralización de IL-13 humana por dilución limitante para generar líneas celulares monoclonales estables. Las inmunoglobulinas de estos hibridomas, crecidas en factorías celulares en condiciones exentas de suero, se purificaron usando columnas de proteína A inmovilizada. Estos Acsm purificados a continuación se re-examinaron en los siguientes sistemas experimentales;

- Unión a IL-13 humana recombinante expresada en *E. coli* (en un formato ELISA en sándwich)
- 25 - Inhibición de la unión de IL-13 humana marcada con det-1 recombinante expresada en *E. coli* a ambas cadenas del receptor para IL-13 (en un formato ELISA en sándwich)
- Neutralización de cualquiera de las dos IL-13 humana o de macaco recombinantes expresadas en *E. coli* (en un bioexperimento con células TF-1)
- Neutralización de IL-13 humana expresada en mamífero (en un bioexperimento con células TF-1)
- 30 - Neutralización de una variante de IL-13 humana Q130 recombinante expresada en *E. coli* (en un bioexperimento con células TF-1)
- Especificidad para la unión a IL-13 humana por evaluación de la reactividad cruzada del Acm para IL-4 humana en un ELISA anti-IL-4 y evaluación de la reactividad cruzada del Acm para IL-5 en un bioexperimento de neutralización de IL-5
- Análisis BIAcore™ para las medidas de afinidad de unión a IL-13 humana

35 El anticuerpo 6A1 monoclonal se identificó como el anticuerpo más potente que neutraliza las bioactividades de ambas IL-13 humana y de macaco. Los siguientes análisis describen el perfil para el anticuerpo 6A1 monoclonal en estos ensayos.

#### 1.1 Unión a IL-13 humana recombinante expresada en *E. coli*

40 El 6A1 unido a IL-13 humana recombinante expresada en *E. coli* en un ELISA en sándwich, procedimiento descrito en la sección 7. Véase Figura 1.

#### 1.2 Inhibición de la unión de IL-13 humana marcada con det-1 recombinante expresada en *E. coli* a IL-13Rα1 e IL-13Rα2 en un formato ELISA

45 El 6A1 inhibió la unión de IL-13 humana marcada con det-1 recombinante expresada en *E. coli* a ambas cadenas del receptor para IL-3. Además, inhibió la unión más eficazmente que reactivos de anticuerpos policlonales anti-IL-13 humana y de anticuerpos monoclonales anti-IL-13 humana disponibles comercialmente (obtenidos de R&D Systems). Se calculó un valor  $CI_{50}$  de 0,165 µg/ml para la inhibición de la unión de IL-13 humana al IL-13Rα1 humano para el anticuerpo 6A1 monoclonal. Se calculó un valor  $CI_{50}$  de 0,056 µg/ml para la inhibición de la unión de IL-13 humana al IL-13Rα2 humano para el anticuerpo 6A1 monoclonal. Véase Figuras 2A y 2B. Un control de IgG de especificidad irrelevante no presentó actividad.

### **1.3 Neutralización de IL-13 humana y de macaco recombinante expresada en *E. coli* en un bioexperimento de proliferación con células TF-1**

Las células TF-1 proliferan en respuesta a IL-13 humana e IL-13 de macaco. Se desarrolló un bioexperimento para asegurar la capacidad de neutralización de un Acm anti-IL-13 sobre la proliferación de células TF-1 inducida por IL-13 humana y de macaco. El 6A1 neutralizó la bioactividad de ambas IL-13 recombinantes humana y de macaco en un bioexperimento con células TF-1. Además, neutralizó ambas IL-13 humana y de macaco más potentemente que reactivos de anticuerpos policlonales anti-IL-13 humana y de anticuerpos monoclonales anti-IL-13 humana disponibles comercialmente (obtenidos de R&D Systems). Véase Figura 3.

Se calculó un valor DN<sub>50</sub> medio de 0,0783 µg/ml para la neutralización de 5 ng/ml de la bioactividad de IL-13 humana recombinante expresada en *E. coli* en un bioexperimento con células TF-1 para el anticuerpo 6A1 monoclonal. Se calculó un valor DN<sub>50</sub> de 0,04 µg/ml para la neutralización de 5 ng/ml de la bioactividad de IL-13 de macaco recombinante expresada en *E. coli* en un bioexperimento con células TF-1 para el anticuerpo 6A1 monoclonal. [El valor de DN<sub>50</sub> (dosis de neutralización) es la concentración de anticuerpo monoclonal necesario para reducir la proliferación de células TF-1 al 50%, en respuesta a una concentración fija de IL-13].

### **1.4 Neutralización de IL-13 humana expresada en mamífero (células CHO) en un bioexperimento de proliferación con células TF-1**

Se evaluó la capacidad de neutralización del anticuerpo 6A1 monoclonal para IL-13 humana expresada en células CHO en un ensayo de proliferación con células TF-1. El 6A1 neutralizó IL-13 humana expresada en mamífero más potentemente que un reactivo policlonal anti-IL-13 humana disponible comercialmente. Se calculó un valor DN<sub>50</sub> de 0,037 µg/ml para la neutralización de ~ 50 ng/ml de IL-13 humana expresada en mamífero en un bioexperimento con células TF-1 para el anticuerpo 6A1 monoclonal. Véase Figura 4.

### **1.5 Neutralización de la variante IL-13 humana Q130 recombinante en un bioexperimento de proliferación con células TF-1**

Se evaluó la capacidad de neutralización del anticuerpo 6A1 monoclonal para IL-13 humana Q130 recombinante expresada en *E. coli* (Peprotech, N° cat. 200-13A) en un ensayo de proliferación con células TF-1. El 6A1 neutralizó IL-13 humana Q130 más potentemente que un reactivo policlonal anti-IL-13 humana disponible comercialmente. Se calculó un valor DN<sub>50</sub> de 0,11 µg/ml para la neutralización de 60 ng/ml de la bioactividad de IL-13 humana Q130 en un bioexperimento con células TF-1 para el anticuerpo 6A1 monoclonal. Véase Figura 5.

### **1.6 Especificidad para la unión a IL-13 humana**

Como IL-4 humana comparte la mayoría de la identidad con IL-13 humana tanto estructural como funcionalmente, se evaluó la especificidad del anticuerpo 6A1 monoclonal para IL-13 humana en un ELISA de unión de IL-4 humana. El 6A1 no se unió a IL-4 humana recombinante expresada en *E. coli*, indicando el alto nivel de especificidad de este anticuerpo monoclonal para IL-13. Además, el 6A1 no neutralizó de manera cruzada la bioactividad de IL-5 humana recombinante expresada en *E. coli* en un bioexperimento con células TF-1. Véase Figuras 6 y 7.

### **1.7 Análisis BIAcore™**

Se evaluó la afinidad del 6A1 para IL-13 recombinante humana y de macaco por análisis BIAcore™. Véase Tabla 1.

**Tabla 1**

Muestra de IL-13	Velocidad de asociación Ka (1/Ms)	Velocidad de disociación Kd (1/Ms)	Constante de afinidad kD
IL-13 humana marcada con det-1	2,25 x 10 <sup>6</sup>	7,2 x 10 <sup>-5</sup>	32 pM
IL-13 humana (CA)	6,82 x 10 <sup>5</sup>	1,84 x 10 <sup>-4</sup>	270 pM
IL-13 cyno (CA)	9,14 x 10 <sup>5</sup>	5,6 x 10 <sup>-5</sup>	61,2 pM

Estos datos indican que el 6A1 tiene una muy alta afinidad por ambas IL-13 humana y de macaco. [Se usaron dos muestras de IL-13 humana diferentes (ambas generadas en *E. coli*) para este análisis. La IL-13 es insoluble cuando se produce en *E. coli* y se debe solubilizar y a continuación replegarse *in vitro*. Las diferencias en la calidad de las dos muestras de IL-13 replegadas pueden explicar la diferencia en las afinidades de unión para cada una de estas muestras de IL-13 humana].

## **2. Clonación de las regiones variables del clon 6a1**

5 Se extrajo el ARN total del clon de células de hibridoma 6A1 y el ADNc de los dominios variables ligero y pesado se produjo por transcripción inversa usando cebadores específicos para la secuencia conductora murina y las regiones constantes del anticuerpo según el isotipo pre-determinado (IgG1/ $\kappa$ ). El ADNc de los dominios ligero y pesado a continuación se clonó en el vector pCR2.1 para su secuenciación.

### **2.1 Extracción del ARN**

El ARN total se extrajo de sedimentos de  $10^6$  células del clon de hibridoma 6A1 usando el SV Total RNA Isolation System de Promega según las instrucciones del fabricante.

### **2.2 Transcripción inversa**

10 El ARN se sometió a transcripción inversa para producir el ADNc de los dominios variables ligero y pesado usando cebadores específicos para las secuencias conductoras murinas y las regiones constantes IgG1/ $\kappa$  murinas. La mezcla de cebadores usados se indica en Jones ST y Bendig MM *Bio/technology* 9:88-89 (1991)

Se prepararon reservas de cebadores directos de la secuencia conductora de  $V_H$  y  $V_L$  murinas a 50  $\mu$ M. También se prepararon disoluciones de los cebadores inversos de la región constante  $\kappa$  y la IgG1 murinas a 50  $\mu$ M.

### **2.3 PCR de transcripción inversa (RT-PCR)**

15 La transcripción inversa del ARN que codifica las regiones variables ligera y pesada se llevó a cabo por duplicado usando el Access RT-PCR System de Promega según las instrucciones del fabricante. Los cebadores inversos y directos de  $V_H$  y  $V_L$  son como se ha descrito anteriormente.

### **2.4 Purificación en gel del producto de la RT-PCR**

20 Los productos de la RT-PCR ( $2xV_H$  y  $2xV_L$ ) se cargaron en una disolución de carga de gel en un gel de agarosa al 1% preparativo que contiene el 0,01% de bromuro de etidio y se corrió en un tampón TAE a 100 V durante 1 hora y se separaron las bandas de la región V. También se corrió en el gel una escalera de ADN de 100 pb para permitir la identificación de las bandas  $V_H$  y  $V_L$ .

25 Los fragmentos de ADN se extrajeron y purificaron del gel usando un kit de extracción QIAquick™Gel de Qiagen según las instrucciones del fabricante.

### **2.5 Ligación**

Los fragmentos de la RT-PCR purificados ( $2xV_H$  y  $2xV_L$ ) se clonaron en el vector pCR2.1 usando un kit de clonación TA de Invitrogen según las instrucciones del fabricante.

### **2.6 Transformación**

30 Los plásmidos ligados se transformaron en células TOP10F' según las instrucciones del kit de clonación TA. Se repartieron 50  $\mu$ l y 200  $\mu$ l de células transformadas en placas de L-agar que contenían 100  $\mu$ g/ml de ampicilina y se cubrieron con 8  $\mu$ l de una disolución de IPTG 500 mM y 16  $\mu$ l de una disolución de X-Gal 50 mg/ml en DMF. Las placas se incubaron durante toda la noche a 37°C.

### **2.7 Secuenciación**

35 Las colonias se seleccionaron y se cultivaron durante toda la noche a 37°C en 5 ml de medio LB suplementado con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina.

Los plásmidos pCR2.1 que contenían los dominios  $V_H$  y  $V_L$  de 6A1 se extrajeron y purificaron usando el kit Qiagen QIAprep Spin Miniprep según las instrucciones del fabricante. Los dominios  $V_H$  y  $V_L$  se secuenciaron usando los cebadores T7, M13 directo y M13 inverso.

40 La secuencia de aminoácidos de la región  $V_H$  de 6A1 (consenso de 10 clones de dos reacciones RT-PCR):

ID SEC N°: 7

La secuencia de aminoácidos de la región  $V_L$  de 6A1 (consenso de 10 clones de dos reacciones RT-PCR):

ID SEC N°: 8

## **3. Anticuerpo quimérico**

45 Se injertó un anticuerpo quimérico compuesto de regiones V murinas parentales (descritas en la sección 2.7) en las

regiones C de IgG1/k de tipo silvestre, esto se diseñó para confirmar la clonación de las regiones V murinas correctas y también para usarse como una referencia cuando se probaron las construcciones humanizadas. El anticuerpo quimérico se expresó en células CHO, se purificó y se probó para la unión a IL-13 humana por ELISA.

### **3.1 Amplificación por PCR**

5 Las regiones V murinas clonadas se amplificaron por PCR para introducir los sitios de restricción necesarios para la clonación en los vectores de expresión en mamíferos RId y RIn. Los sitios Hind III y Spe I se diseñaron para encuadrar el dominio V<sub>H</sub> y permitir la clonación en un vector RId modificado que contiene la región C  $\gamma$ 1 humana de tipo silvestre. Los sitios Hind III y BsiW I se diseñaron para encuadrar el dominio V<sub>L</sub> y permitir la clonación en un vector RIn modificado que contiene la región C  $\kappa$  humana.

10 Cebador directo de V<sub>H</sub>:

5'-GAT GAA GCT TGC CAC CAT GAA ATG CAG CTG GGT CAT C-3' (ID SEC N°: 86)

El sitio de restricción Hind III está subrayado y la secuencia Kozak está en negrita.

Cebador inverso de V<sub>H</sub>:

5'-GAT GGA CTA GTG TTC CTT GAC CCC AGT A -3' (ID SEC N°: 87)

15 El sitio de restricción Spe I está subrayado.

Cebador directo de V<sub>L</sub>:

5'-GAT GAA GCT TGC CAC CAT GAA GTT GCC TGT TAG GCT G-3' (ID SEC N°: 88)

El sitio de restricción Hind III está subrayado y la secuencia Kozak está en negrita.

Cebador inverso de V<sub>L</sub>:

20 5'-GAT GCG TAC GTT TGA TTT CCA GCT TGG TGC C-3' (ID SEC N°: 89)

El sitio de restricción BsiW I esta subrayado.

	Reacción de PCR:	agua	66 $\mu$ l
		Tampón de PCR 10x	10 $\mu$ l
		dNTP (2 mM)	10 $\mu$ l
25		cebador 1 (5 $\mu$ M)	4 $\mu$ l
		cebador 2 (5 $\mu$ M)	4 $\mu$ l
		polimerasa AmpliTaq	2 $\mu$ l
		plásmido purificado	4 $\mu$ l
		vol total	100 $\mu$ l

30 Cebador 1: cebador directo V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub>

Cebador 2: cebador inverso V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub>

Plásmido purificado: plásmido pCR2.1 V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> purificado por Qiagen Minipreps (200x diluido)

	Ciclos de PCR:	1- 95°C durante 4 min
		2- 95°C durante 1 min
35		3- 55°C durante 1 min
		4- 72°C durante 1 min
		5- 72°C durante 7 min

Las etapas 2 a 4: se repitieron 30 veces

**3.2 Clonación en vectores de expresión en mamíferos**

Los productos de la PCR se purificaron usando el kit MinElute PCR Purification de Qiagen según las instrucciones del fabricante.

El producto de la PCR V<sub>H</sub> y el vector de expresión en mamíferos RId hC<sub>γ</sub>1wt se digirieron con Hind III-Spe I:

5	Tampón 10x (NEBuffer2)	5 µl
	BSA 100x (NEB)	0,5 µl
	ADN	5 µl
	Hind III (Promega)	2 µl
	Spe I (NEB)	2 µl
10	agua	35,5 µl
	vol total	50 µl

ADN: producto de la PCR V<sub>H</sub> purificado o el vector RId hC<sub>γ</sub>1wt (a 0,25 mg/ml)

Incubado a 37°C durante 2 horas.

El producto de la PCR V<sub>L</sub> y el vector de expresión en mamíferos RIn hC<sub>κ</sub> se digirieron con Hind III-BsiW I:

15	Tampón 10x (NEBuffer2)	5 µl
	ADN	5 µl
	Hind III (Promega)	2 µl
	agua	38 µl
	vol total	50 µl

20 ADN: producto de la PCR V<sub>L</sub> purificado o el vector RIn hC<sub>κ</sub> (a 0,25 mg/ml)

Incubado a 37°C durante 2 horas. Se añadió 2 µl de BsiW I (NEB) y se incubó a 55°C durante 2 horas.

25 Los productos de las digestiones de restricción se cargaron en una disolución de carga de gel en un gel de agarosa al 1% preparativo que contenía bromuro de etidio al 0,01% y se corrió en un tampón TAE a 100 V durante 1 hora y se separaron las bandas de los fragmentos de la PCR V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> así como el vector RId y RIn. También se corrió en el gel una escalera de ADN de 100 pb para permitir la identificación de las bandas V<sub>H</sub>, V<sub>L</sub> y del vector. El ADN se extrajo y se purificó del gel usando el kit de extracción QIAquick Gel de Qiagen según las instrucciones del fabricante.

30 El fragmento de la PCR V<sub>H</sub> digerido con Hind III-Spe I se ligó al vector RId hC<sub>γ</sub>1wt digerido con Hind III-Spe I. El fragmento de la PCR V<sub>L</sub> digerido con Hind III- BsiW I se ligó al vector RIn hC<sub>κ</sub> digerido con Hind III-BsiW I. La ligación se llevó a cabo usando el LigaFast Rapid DNA Ligation System de Promega según las instrucciones del fabricante proporcionando:

V<sub>H</sub>: vector: RId hC<sub>γ</sub>1wt digerido con Hind III-Spe I  
 inserto: fragmento de la PCR V<sub>H</sub> digerido con Hind III-Spe I

V<sub>L</sub>: vector: RIn hC<sub>κ</sub> digerido con Hind III-BsiW I

35 inserto: fragmento de la PCR V<sub>L</sub> digerido con Hind III-BsiW I

40 Los productos ligados se transformaron en células competentes DH5 $\alpha$ . Se descongelaron viales de DH5 $\alpha$  de 200 µl en hielo. Se prepararon alícuotas de 50 µl en tubos de transformación. Se añadió 2 µl de la mezcla de ligación y se agitó suavemente con una punta de pipeta seguido de incubación durante 30 minutos en hielo. La mezcla se incubó durante 45 segundos a 42°C sin agitación. A continuación ésta se transfirió a hielo durante 2 minutos. Se añadió 450 µl de medio SOC y los tubos se incubaron durante 1 h a 37°C en un incubador agitador. Se repartió a 100 µl del cultivo en placas de L-agar suplementadas con 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron durante toda la noche a 37°C.

**3.3 Secuenciación**

5 Los clones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se cultivaron durante toda la noche a 37°C en 5 ml de medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina. Los plásmidos RId y RIn que contenían los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> respectivamente se extrajeron y purificaron usando el kit Qiagen QIAprep Spin Miniprep según las instrucciones del fabricante. La región V<sub>H</sub> se secuenció usando cebadores directos en el vector RId y la secuencia señal y el cebador inverso en la región C<sub>γ1</sub> humana.

La región V<sub>L</sub> se secuenció usando cebadores directos en el vector RIn y la secuencia señal y el cebador inverso en la región C<sub>κ</sub> humana. Se identificaron los clones con las secuencias V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> correctas y los plásmidos se prepararon para su expresión en células CHO.

**3.4 Expresión del anticuerpo quimérico en células CHO**

10 Los plásmidos RId y RIn que contenían los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de 6A1 respectivamente se co-transfectaron de manera transitoria en células CHO y se expresaron. El anticuerpo quimérico producido se purificó del sobrenadante del cultivo celular por cromatografía de afinidad con proteína A en sefarosa

**3.4.1 Purificación del plásmido**

15 Las células DH5α que contenían los plásmidos RId-6A1V<sub>H</sub> y RIn-6A1V<sub>L</sub> se cultivaron en 5 ml de medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina durante 8 horas a 37°C en un incubador agitador. Se inoculó 200 ml de medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina con 1 ml de cultivo de día y se incubó durante toda la noche a 37°C en un incubador agitador. Los plásmidos se extrajeron y purificaron usando el kit QIAfilter Plasmid Maxi de Qiagen según las instrucciones del fabricante. El sedimento de etanol se resuspendió en 200 µl de tampón TE y se midió la concentración del plásmido por absorbancia a 260 nm después de diluir 100 veces la disolución stock.

**3.4.2 Transfección**

20 Las células CHO se cultivaron hasta confluencia en medio MEM de Dulbecco con Glutamax-1 (DMEM) suplementado con Ultra Low Fetal Bovine Serum y penicilina-estreptomina al 1% en 4 x 175 cm<sup>2</sup> frascos de cultivo de tejidos BD Falcon a 37°C.

Para cada frasco, en un tubo Falcon de 50 ml, se añadió y se mezcló lo siguiente:

- 25            8 ml de Optimem 1 con Glutamax-1  
               20 µg de plásmido purificado RId-6A1V<sub>H</sub>  
               20 µg de plásmido purificado RIn-6A1V<sub>L</sub>  
               240 µl TransFast Transfection Reagent en vórtex

30 La mezcla se incubó durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el medio DMEM del frasco y a continuación la mezcla se pasó por el vórtex y se añadió al frasco. La mezcla se incubó a 37°C durante 1 h. Se añadió 32 ml de Optimem al frasco y se incubó a 37°C durante 48-72 h.

**3.4.3 Purificación del anticuerpo quimérico**

35 El medio de todos los frascos de 175 cm<sup>2</sup> se reunió y se centrifugó a 1500 rpm durante 3 minutos en un MSE Mistral 2000 y el sobrenadante se pasó a través de un Filter System 0,22 µm CA de 500 ml. El anticuerpo se purificó del sobrenadante clarificado en un Amersham Biosciences Akta Explorer usando el software Unicorn. La columna usada fue una HiTrap rProtein A Sepharose FF de 1 ml. La velocidad de flujo fue de 1 ml/min.

40 La columna se equilibró con 10 VC de PBS de Dulbecco y a continuación se cargó con el sobrenadante clarificado a través de la bomba A. La columna se lavó con 20 VC de PBS de Dulbecco, la bomba A se lavó para el material sobrante y se pasó 10 VC de PBS de Dulbecco adicionales a través de la columna para asegurar una clarificación completa del sobrenadante.

El anticuerpo se eluyó con 10 VC de ImmunoPure IgG Elution Buffer (Pierce) y se recogió en fracciones de 1 ml que contenían 100 µl de tampón de neutralización Trizma-HCl 1 M a pH 8,0. La columna se re-equilibró con 5 VC de PBS de Dulbecco.

45 Se cuantificó el anticuerpo en las fracciones eluidas leyendo la absorbancia a 280 nm frente a un blanco que contenía 10 volúmenes de ImmunoPure IgG Elution Buffer + 1 volumen de Trizma-HCl 1 M a pH 8,0 y las fracciones con cantidades suficientes del anticuerpo puro se reunieron y se almacenaron en alícuotas de 100 µl a -20°C.

**3.4.4 Análisis del anticuerpo quimérico**

Se analizó el sobrenadante y el anticuerpo quimérico 6A1 purificado (6A1c) en ELISAs de unión de IL-13 de macaco y humana.

5 El sobrenadante de las células CHO se transfectó transitoriamente con anticuerpo monoclonal 6A1 quimérico, unido a ambas IL-13 recombinante humana y de macaco expresadas en *E. coli* en un ELISA en sándwich. El anticuerpo purificado también se unió a ambas IL-13 recombinante humana y de macaco expresadas en *E. coli* en el ELISA en sándwich (datos no mostrados). Véase Figura 8.

La secuencia de aminoácidos y la secuencia del ADNc para IL-13 de macaco (incluyendo la secuencia señal) se indican como ID SEC N°: 90 y 91 respectivamente.

10 Estos resultados confirman que se habían clonado con éxito las regiones variables de 6A1 correctas para producir un anticuerpo quimérico de unión al antígeno capaz de unirse a ambas IL-13 humana y de macaco.

#### **4. Humanización del clon 6a1**

##### **4.1 Estrategia de humanización**

###### **4.1.1 Búsqueda de las bases de datos de ratón**

15 Se identificaron 12 secuencias de ratón con la homología más alta para la secuencia de aminoácidos V<sub>H</sub> de 6A1 y 11 secuencias de ratón con la homología más alta para la secuencia de aminoácidos V<sub>L</sub> buscando en una base de datos de péptidos (Genbank).

La secuencia de aminoácidos V<sub>H</sub> de 6A1 se comparó con todas las 12 secuencias de ratón de la búsqueda en la base de datos y se identificaron como significativos los siguientes residuos marco:

	Posición	VH de 6A1	ratón	suceso
20	19	R	K	12/12
	38	I	K	12/12
	81	R	Q	12/12

La posición es según el sistema de numeración de Kabat y colaboradores.

25 La secuencia de aminoácidos V<sub>L</sub> de 6A1 se comparó con 11 secuencias de ratón de la búsqueda en la base de datos que no identificó ningún residuo marco como significativo.

###### **4.1.2. Búsqueda de la base de datos humana**

Se identificaron las secuencias marco humanas con la homología más alta para los marcos de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de 6A1 usando el EasyBlast en una base de datos de péptidos.

30 Se identificó un grupo de secuencias humanas para la V<sub>H</sub> de 6A1 del cual se seleccionó el siguiente marco para su humanización

ID SEC N°: 92

Se identificó los siguientes residuos marco como potencialmente importantes en la afinidad de recuperación y que puede ser necesario retromutar:

	Posición (Kabat#)	V <sub>H</sub> de 6A1	V <sub>H</sub> humana
35	19		K R
	38		R I
	73		E T
	81		E R

40 Se diseñaron 4 construcciones V<sub>H</sub> humanizadas con diferentes retromutaciones, una como un injerto directo según las definiciones de CDR dada anteriormente (A1), las otras con diversas retromutaciones (A2, A3, A4).

Por tanto

A2 es A1 más R38I

A3 es A2 más E73T

A4 es A3 más K19R más E81R

Se identificó un grupo de secuencias humanas para la V<sub>L</sub> de 6A1 del cual se seleccionó el siguiente marco para su humanización

5 ID SEC N°: 93

Se identificó los siguientes residuos marco como potencialmente importantes en la afinidad de recuperación y que puede ser necesario retromutar:

Posición (Kabat#)	V <sub>L</sub> de 6A1 de ratón	V <sub>L</sub> humana
	85	V I

10 Se diseñaron dos construcciones, una como un injerto directo (L1), la otra con la retromutación (L2) (es decir, L1 con I85V).

**Construcción A1 de V<sub>H</sub> humanizada:**

ID SEC N°: 11

**Construcción A2 de V<sub>H</sub> humanizada:**

15 ID SEC N°: 12

**Construcción A3 de V<sub>H</sub> humanizada:**

ID SEC N°: 13

**Construcción A4 de V<sub>H</sub> humanizada:**

ID SEC N°: 14

20 **Construcción L1 de V<sub>L</sub> humanizada:**

ID SEC N°: 15

**Construcción L2 de V<sub>L</sub> humanizada:**

ID SEC N°: 16

**4.2 Humanización de 6A1**

25 Las construcciones de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se prepararon *de novo* por formación de oligonucleótidos solapados que incluyen los sitios de restricción para la clonación en los vectores de expresión en mamíferos RId y RIn así como una secuencia señal humana. Se introdujeron los sitios de restricción Hind III y Spe I para el marco del dominio V<sub>H</sub> que contiene la secuencia señal humana para la clonación en RId que contiene la región constante  $\gamma$ 1 humana de tipo silvestre. Se introdujeron los sitios de restricción Hind III y BsiW I para el marco del dominio V<sub>L</sub> que contiene la secuencia señal humana para la clonación en RIn que contiene la región constante kappa humana.

30 Secuencia señal humana: ID SEC N°: 17

Se diseñó 4 construcciones V<sub>H</sub> humanizadas y dos construcciones V<sub>L</sub> humanizadas. Esto daría como resultado 8 combinaciones diferentes de cadena pesada-cadena ligera.

35 Se diseñó la formación de 10 oligonucleótidos aproximadamente de 60 bases de largo aproximadamente con un solapamiento de 18 bases aproximadamente.

**4.2.1 Formación de oligonucleótidos**

Se prepararon disoluciones de reserva de oligonucleótidos a partir de 5  $\mu$ l de cada disolución de stock de oligos a 100  $\mu$ M. La síntesis de los genes V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> para la formación de los oligonucleótidos solapados se llevó a cabo de manera general según Stemmer WP y colaboradores (1995) *Gene* 164(1):49-53 usando el software descrito en Ertl PF y colaboradores (2003) *Methods* 31:199-206.

40

**4.2.1.1 Reacción de PCR de ensamblaje representativa:**

agua 41,5  $\mu$ l

	tampón de PCR 10xProofStart	5 µl
	dNTP (10 mM)	1,5 µl
	reserva de oligos	1 µl
	ADN polimerasa ProofStart	1 µl
5	vol total	50 µl
	Ciclos de la PCR de ensamblaje	1- 94°C durante 2 min
		2- 94°C durante 30 sec
		3- 40°C durante 2 min
		4- 72°C durante 10 sec
10		5- 94°C durante 15 sec
		6- 40°C durante 30 sec
		7- 72°C durante 20 sec + 3 sec/ciclo
		Las etapas 4 a 7 se repitieron 25 veces

**4.2.1.2 PCR de recuperación representativa**

15 Los cebadores 1 y 2 fueron los primeros oligonucleótidos superior e inferior usados en la PCR de ensamblaje. La PCR de recuperación permite la amplificación del gen V completo.

Reacción de PCR de recuperación:

	agua	42 µl
	tampón de PCR 10xProofStart	4 µl
20	dNTP (10 mM)	1,5 µl
	cebador 1 (100 µM)	0,5 µl
	cebador 2 (100 µM)	0,5 µl
	reacción de PCR de ensamblaje	1 µl
	ADN polimerasa ProofStart	0,5µl
25	total vol	50µl

	Ciclos de PCR de recuperación:	1- 94°C durante 2 min
		2- 94°C durante 45 sec
		3- 60°C durante 30 sec
		4- 72°C durante 2 min
30		5- 72°C durante 4 min
		Las etapas 2 a 4 se repitieron 25 veces

Los productos de la PCR de recuperación se purificaron usando el kit MinElute PCR Purification de Qiagen según las instrucciones del fabricante.

**4.2.2 Digestiones de restricción**

35 Las construcciones A1, A2, A3, A4 de V<sub>H</sub> de 6A1 humanizadas se digirieron con Hind III-Spe I, las construcciones L1, L2 de V<sub>L</sub> de 6A1 humanizadas se digirieron con Hind-III-BsiW I como se ha descrito de manera similar para la sección 3.

**4.2.3 Purificación en gel**

Los productos de la digestión de restricción se purificaron de manera similar a la sección 3.

**4.2.4 Ligación**

5 Los fragmentos de  $V_H$  de 6A1 humanizados digeridos con Hind III-Spe I se ligaron en el vector RId hC $\gamma$ 1wt digerido con Hind III-Spe I.

Los fragmentos de  $V_L$  de 6A1 humanizados digeridos con Hind III-BsiW I se ligaron en el vector RIn hC $\kappa$  digerido con Hind III-BsiW I

La ligación se llevó a cabo usando el LigaFast Rapid DNA Ligation System de Promega según las instrucciones del fabricante.

**10 4.2.5 Transformación**

De manera similar a como se ha descrito previamente para la sección 3

**4.2.6 Procedimiento de secuenciación representativo**

15 Las colonias de cada placa de reacción se cultivaron durante toda la noche a 37°C en 5 ml de medio LB suplementado con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina. Los plásmidos se extrajeron y purificaron usando el kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen según las instrucciones del fabricante y se secuenciaron usando los cebadores descritos previamente en la sección 3. Se identificaron los clones con las secuencias  $V_H$  y  $V_L$  humanizadas correctas y los plásmidos se prepararon para su expresión en células CHO.

**5. EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS HUMANIZADOS**

20 Se prepararon cuatro construcciones  $V_H$  humanizadas (A1, A2, A3, A4) y dos construcciones  $V_L$  humanizadas (L1 y L2) en los vectores de expresión en mamíferos RId hC $\gamma$ 1wt y RIn hC $\kappa$ . Se co-transfectaron transitoriamente ocho plásmidos de combinaciones de cadena ligera-cadena pesada (A1L1, A1L2, A2L1, A2L2, A3L1, A3L2, A4L1, A4L2) en células CHO y se expresaron a pequeña escala para dar 8 anticuerpos humanizados diferentes. Los anticuerpos producidos en el sobrenadante de las células CHO se analizaron en el ELISA de unión de IL-13 humana.

**5.1 Procedimiento de purificación de plásmidos representativo**

25 Se cultivó células DH5 $\alpha$  que contenían uno de los plásmidos descritos anteriormente el 5 ml de medio LB suplementado con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina durante 8 horas a 37°C en un incubador agitador. Se inoculó 200 ml de medio LB suplementado con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina con 1 ml de cultivo de día y se incubó durante toda la noche a 37°C en un incubador agitador. Los plásmidos se extrajeron y purificaron usando el kit QIAfilter Plasmid Maxi de Qiagen según las instrucciones del fabricante. El sedimento de etanol se resuspendió en 200  $\mu$ l de tampón TE y se midió la concentración del plásmido por absorbancia a 260 nm después de diluir 100 veces la disolución stock.

**5.2 Procedimiento de transfección representativo**

Se sembró 9 pocillos de placas Corning Costar 3506 de 6 pocillos con 10<sup>6</sup> células CHO y se cultivaron durante toda la noche en medio MEM de Dulbecco con Glutamax-1 (DMEM) suplementado con Ultra Low Fetal Bovine Serum y penicilina-estreptomina al 1% a 37°C.

35 Para cada pocillo, se añadió lo siguiente en un Bijou de 5 ml de manera que cada transformación contenía una combinación diferente de cadenas pesada y ligera.

1 ml de Optimem 1 con Glutamax-1

5  $\mu$ g de plásmido se lleva  $V_H$  humanizada

5  $\mu$ g de plásmido se lleva  $V_L$  humanizada

40 30  $\mu$ g TransFast Transfection Reagent pasado por vórtex

La incubación tuvo lugar durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el medio DMEM de los pocillos y a continuación la mezcla se pasó por el vórtex y se añadió al pocillo apropiado. La incubación tuvo lugar a 37°C durante 1 h. Se añadió 2 ml de Optimem por pocillo y se incubó a 37°C durante 48-72 h.

**5.3 Análisis de los anticuerpos humanizados**

45 Se recuperó el medio de cada pocillo y se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 min en una centrifuga Eppendorf 5415R

y el sobrenadante se pasó a través de un filtro de jeringa de 25 mm Pall Acrodisc de 0,2  $\mu\text{m}$ . El sobrenadante de células se evaluó para la unión a IL-13 humana en un ELISA. Los 8 anticuerpos humanizados se unieron a IL-13 humana con un perfil similar al anticuerpo quimérico 6A1 en el ELISA de unión a IL-13 humana. Véase Figura 9.

- 5 Los anticuerpos humanizados L1+A1 y L2+A1 se seleccionaron para su expresión a una escala mayor, purificación y análisis posterior.

## **6. EVALUACIÓN DE LOS ANTICUERPOS L1+A1 Y L2+A1 ANTI- IL-13 HUMANA HUMANIZADOS**

### **6.1 Actividad en los ELISAs de unión de IL-13 humana y de macaco**

Se generaron con éxito L1+A1 y L2+A1 de la expresión a mayor escala y se evaluaron para la unión a IL-13 humana y de macaco expresadas en *E.coli* mediante ELISA. Véase Figuras 10a y 10b y tabla B

#### 10 **Tabla B**

<b>ELISA</b>	<b>Acm</b>	<b>CE<sub>50</sub> (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
<b>Unión a IL-13 humana</b>	Acm 6A1 parental	0,049
	6A1 quimérico	0,015
	L1+A1	0,018
	L2+A1	0,024
<b>Unión a IL-13 de macaco</b>	Acm 6A1 parental	0,039
	6A1 quimérico	0,018
	L1+A1	0,021
	L2+A1	0,028

Ambos L1+A1 y L2+A1 se unieron a IL-13 humana y de macaco expresadas en *E.coli* con un perfil similar. Los valores de CE<sub>50</sub> (generados usando una función de ajuste a una curva 'Robosage' en Excel) indicaron que la actividad de unión es muy similar al Acm 6A1 quimérico patrón.

#### 15 **6.2 Evaluación de L1+A1 y L2+A1 para la unión a IL-13 humana nativa (derivada de PBMC)**

Se usó el sobrenadante de células Th2 CD4+ (generadas a partir de cultivos de PBMC humanas) estimuladas con anti-CD3 y anti-CD28 para evaluar la unión del Acm 6A1 quimérico, L1+A1 y L2+A1 a IL-13 humana nativa (derivada de PBMC). En un ELISA, los 3 anticuerpos se unieron a IL-13 humana nativa en el sobrenadante de células Th2 con un comportamiento muy similar a aquel del Acm 6A1 parental. Véase Figura 11

- 20 Además, se generó una curva patrón usando los reactivos disponibles comercialmente, para determinar el nivel de IL-13 humana nativa presente en el sobrenadante de las células Th2. Los 3 anticuerpos y el Acm anti-IL-13 humana disponible comercialmente detectaron cantidades equivalentes de IL-13 en la muestra de sobrenadante de Th2. Véase Tabla 2 a continuación.

#### **Tabla 2**

<b>Acm</b>	<b>IL-13 nativa (ng/ml)</b>
Acm 6A1 parental	22,5
6A1 quimérico	19,6
L1+A1	25,1
L2+A1	22,7
Acm control +	28,0

**6.3 Actividad inhibidora de L1+A1 y L2+A1 para IL-13 en ELISAs de unión al receptor para IL-13**

Se evaluó el Acm 6A1 parental de ratón, 6A1 quimérico, L1+A1 y L2+A1, para su capacidad para inhibir la unión de IL-13 humana a las cadenas IL-13R $\alpha$ 1 y IL-13R $\alpha$ 2 en un ELISA de competición. Véase Figuras 12a y 12b y Tabla 3 a continuación.

**Tabla 3**

ELISA	Acm	CI <sub>50</sub> (µg/ml)
Competición por el IL-13R $\alpha$ 1 humano	Acm 6A1 parental	0,039
	6A1 quimérico	0,034
	L1+A1	0,044
	L2+A1	0,056
Competición por el IL-13R $\alpha$ 2 humano	Acm 6A1 parental	0,020
	6A1 quimérico	0,040
	L1+A1	0,113
	L2+A1	0,117

5

Todos los anticuerpos inhibieron la unión de IL-13 humana marcada con det-1 expresada en *E. coli* al IL-13R $\alpha$ 1 humano con un perfil similar. De manera similar, todos los anticuerpos inhibieron la unión de IL-13 humana marcada con det-1 expresada en *E. coli* al IL-13R $\alpha$ 2 humano, aunque con alguna reducción en la eficacia para L1+A1 y L2+A1 en este ensayo (los valores de CI<sub>50</sub> se generaron usando una función de ajuste a una curva 'Robosage' en Excel)

**6.4 Evaluación de la afinidad de L1+A1 y L2+A1 para la unión a IL-13 humana**

Se evaluó las cinéticas de unión de L1+A1 y L2+A1 para IL-13 humana usando el sistema BIAcore™. Véase Sección 7 a continuación para el procedimiento usado.

**Análisis 1:**

Completado para ambas IL-13 humana y de macaco (proteína expresada en *E. coli*). Los valores de K<sub>D</sub> indicados son el promedio de las 5 curvas de concentración diferentes de IL-13 (realizadas por triplicado). Nótese que las distribuciones de transferencia total eran evidentes en este análisis y que se ha completado un protocolo experimental modificado (para corregir esta distribución) en el Análisis 4 (en el que no están presentes las distribuciones de transferencia total). Véase Tabla 4.

**Tabla 4**

Muestra de IL-13	Acm	Velocidad de asociación Ka (Ms <sup>-1</sup> )	Velocidad de disociación (s <sup>-1</sup> )	Constante de afinidad K <sub>D</sub> (pM)
IL-13 humana	Acm 6A1 parental	1,96 x 10 <sup>6</sup>	6,78 x 10 <sup>-5</sup>	35
	6A1quimérico	4,64 x 10 <sup>5</sup>	2 x 10 <sup>-5</sup>	43
	L1+A1	5,07 x 10 <sup>5</sup>	1,55 x 10 <sup>-4</sup>	300
	L2+A1	5,07 x 10 <sup>5</sup>	1,56 x 10 <sup>-4</sup>	310
IL-13 de macaco	Acm 6A1 parental	9,14 x 10 <sup>5</sup>	5,6 x 10 <sup>-5</sup>	61
	6A1quimérico	5,92 x 10 <sup>5</sup>	3,27 x 10 <sup>-5</sup>	55
	L1+A1	4,46 x 10 <sup>5</sup>	1,55 x 10 <sup>-5</sup>	35
	L2+A1	5,77 x 10 <sup>5</sup>	5,58 x 10 <sup>-5</sup>	97

20

**Análisis 2:**

Completado para la unión de IL-13 humana (proteína expresada en *E. coli*) a L1+A1. Véase Tabla 5.

**Tabla 5**

Muestra de IL-13	Acm	Velocidad de asociación $K_a$ ( $M s^{-1}$ )	Velocidad de disociación $K_d$ ( $s^{-1}$ )	Constante de afinidad $K_D$ ( $\mu M$ )
IL-13 humana	L1+A1	$4,66 \times 10^5$	$6,95 \times 10^{-5}$	149

**Análisis 3:**

5 Completado para el péptido número 24 16-mero de IL-13 humana biotilado (identificado como el epítipo de unión lineal para el Acm 6A1 parental, véase sección 6.7). Nótese los valores de  $K_D$  absolutos obtenidos para la unión a ligandos peptídicos a menudo son bastante diferentes de aquellos observados para la unión a la proteína diana completa. No obstante, estos datos son coherentes con los datos de la proteína completa y los datos de neutralización de IL-13 (en el bioexperimento con TF-1) en que indican una reducción en la afinidad de tres veces aproximadamente entre el 6A1 quimérico y el L1+A1. Véase Tabla 6.

**Tabla 6**

Muestra de IL-13	Acm	Velocidad de asociación $K_a$ ( $M s^{-1}$ )	Velocidad de disociación $K_d$ ( $s^{-1}$ )	Constante de afinidad $K_D$ ( $\mu M$ )
Péptido 24	Acm 6A1 parental	$2,95 \times 10^6$	$9,15 \times 10^{-4}$	3,11
	6A1 quimérico	$2,57 \times 10^5$	$9,19 \times 10^{-4}$	3,58
	L1+A1	$1,95 \times 10^5$	$1,7 \times 10^{-3}$	9,03
	L2+A1	$1,79 \times 10^5$	$1,67 \times 10^{-3}$	9,35

10

**Análisis 4:**

Completado para ambas IL-13 humana y de macaco (proteína expresada en *E. coli*). Los valores de  $K_D$  indicados son el promedio de las 5 curvas de concentración diferentes de IL-13 (realizadas por triplicado). Nótese que las distribuciones de transferencia total no eran evidentes para este grupo de datos. Véase Tabla 7.

15

**Tabla 7**

Muestra de IL-13	Acm	Velocidad de asociación $K_a$ ( $M s^{-1}$ )	Velocidad de disociación $K_d$ ( $s^{-1}$ )	Constante de afinidad $K_D$ ( $\mu M$ )
IL-13 humana	6A1 quimérico	$1,05 \times 10^6$	$4 \times 10^{-5}$	38
	L1+A1	$8,24 \times 10^5$	$1,4 \times 10^{-4}$	170
	L2+A1	$9,07 \times 10^5$	$1,39 \times 10^{-4}$	153
IL-13 de macaco	6A1 quimérico	$8,85 \times 10^5$	$2,65 \times 10^{-5}$	30
	L1+A1	$7,3 \times 10^5$	$5,86 \times 10^{-5}$	80
	L2+A1	$7,72 \times 10^5$	$4,25 \times 10^{-5}$	55

Los resultados indican una diferencia significativa entre las construcciones humanizadas L1+A1 y L2+A1.

20 L1+A1 presenta una afinidad por IL-13 humana de 168  $\mu M$  aproximadamente. Las cinéticas están dominadas por una velocidad de disociación excepcionalmente baja, como se podría predecir de la potente actividad de neutralización del anticuerpo. Los datos para la constante de asociación  $k_{on}$  están sistemáticamente alrededor de  $6 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ . Las estimaciones de la constante de disociación  $k_{off}$  son más variables, cubriendo el intervalo de  $1,4 \times 10^{-4}$  a  $8,22 \times 10^{-5} s^{-1}$ , reflejando el desafío técnico para la obtención de una cuantificación precisa para velocidades de

disociación lentas.

### **6.5 Actividad de L1+A1 y L2+A1 en los bioexperimentos de neutralización de IL-13**

5 Se evaluaron el Acm 6A1 parental de ratón, 6A1 quimérico, L1+A1 y L2+A1 para su actividad de neutralización de IL-13 en un bioexperimento con células TF-1 *in vitro* (este bioexperimento es el patrón de la industria para la evaluación de la bioactividad de IL-13 y para la evaluación de la capacidad de neutralización de anticuerpos anti-IL-13 suministrados comercialmente). Se evaluaron una serie de variantes de IL-13 en este ensayo, incluyendo IL-13 humana expresada en *E.coli*, IL-13 de macaco expresada en *E.coli*, IL-13 humana Q130 expresada en *E.coli* (la variante asociada al asma), y IL-13 humana expresada en células CHO de mamífero (nota: IL-13 humana nativa en la muestra del sobrenadante de células Th2 no se podría usar en este bioexperimento, ya que este sobrenadante también contiene otras citoquinas que son capaces de proliferar células TF-1). Véase Figuras 13a, 13b, 13c y 13d.

10 Todos los anticuerpos neutralizaron la bioactividad de todas las variantes de IL-13 en este sistema bioexperimental; se determinó la capacidad de neutralización de cada anticuerpo para cada variante de IL-13 y se expresó como un valor de DN<sub>50</sub>. Véase Tabla 8.

**Tabla 8**

<b>Variante de IL-13</b>	<b>Acm</b>	<b>DN<sub>50</sub> medio para dos ensayos (µg/ml)</b>
IL-13 humana expresada en <i>E.coli</i>	6A1 quimérico	0,119
	L1+A1	0,428
	L2+A1	0,608
	Acm 6A1 parental	0,193
IL-13 de macaco expresada en <i>E.coli</i>	6A1 quimérico	0,059
	L1+A1	0,078
	L2+A1	0,120
	Acm 6A1 parental	0,078
IL-13 humana Q130 expresada en <i>E.coli</i>	6A1 quimérico	0,128
	L1+A1	0,438
	L2+A1	0,705
	Acm 6A1 parental	0,213
IL-13 humana expresada en células CHO	6A1 quimérico	0,285
	L1+A1	0,975
	L2+A1	1,200
	Acm 6A1 parental	0,440

15 Nota: como son necesarias cantidades diferentes de cada variante de IL-13 para proliferar hasta el mismo grado las células TF-1 en este bioexperimento, no es apropiado comparar los valores de DN<sub>50</sub> generados por un anticuerpo particular a través de cada variante de IL-13 usada. No obstante, es apropiado comparar los valores de DN<sub>50</sub> generados por cada anticuerpo para una única variante de IL-13.

20 En general, el nivel de neutralización conseguido por el Acm 6A1 parental y el 6A1 quimérico fue muy similar, indicando que no hubo pérdida de eficacia entre el Acm parental y la quimera. No obstante, las eficacias de L1+A1 y L2+A1 se redujeron ligeramente en comparación con ambos Acm 6A1 parental y 6A1 quimérico un promedio de 3 a 4 veces aproximadamente para cada variante de IL-13 individual probada. Estos datos están muy de acuerdo con aquellos obtenidos de la evaluación con BIAcore™.

25

**6.6 Especificidad de L1+A1 y L2+A1 para la unión a IL-13 humana**

Las especificidades de L1+A1 y L2+A1 para IL-13 humana se evaluaron por análisis de la reactividad cruzada potencial frente a IL-4 humana y el GM-CSF humano en ELISAs de unión. Véase Figuras 14a y 14b.

5 Se encontró que estos Acm son altamente específicos para su unión a IL-13, sin reactividad cruzada para IL-4 humana o el GM-CSF humano a concentraciones de Acm de hasta 30 µg/ml. Además, estos Acm no neutralizaron de manera cruzada la bioactividad de IL-5 humana en un bioexperimento con IL-5. Véase Figura 14c.

**6.7 Mapeo del epítipo de 6A1 usando péptidos biotinilados**

10 Las proteínas IL-13 humana e IL-13 de macaco se corrieron en un gel SDS-PAGE desnaturizante. La transferencia Western con Acm 6A1 de ratón detectó las bandas de los tamaños esperados para ambas proteínas IL-13 humana (expresada en *E. coli*, elaboración propia) y de macaco (expresada en *E. coli*, elaboración propia). El 6A1 no detectó la hIL-13 (expresada en *E. coli*, Cambridge Bioscience), debido probablemente a un fallo técnico. Este análisis sugiere que el Acm 6A1 reconoce un epítipo del péptido lineal dentro de las secuencias de IL-13 humana y de macaco (datos no mostrados).

15 Se sintetizaron péptidos 16-meros biotinilados compensados por 4 para mapear la localización del epítipo de la célula B reconocido por el Acm 6A1 en ambas IL-13 humana y de macaco. Se usó el método de ELISA para detectar la unión del péptido biotinilado inmovilizado al Acm 6A1 parental.

Detalles de los péptidos diseñados de encargo 16 mer: 88 x 16 mers, compensados por 4 (suministrados por Mimotopes, Australia).

Formato: Péptidos 25 y 44 = Biotina-SGSG-PÉPTIDO-ácido

20 Péptidos 2-24 y 27-43 = Biotina-SGSG-PÉPTIDO-amida

#	Hidro	P. Mol.	N-térm.	Secuencia C-térm.
2	0,42	2311,66	Biotina-	ID SEC N°: 38-NH <sub>2</sub>
3	0,27	2453,82	Biotina-	ID SEC N°: 39-NH <sub>2</sub>
4	0,38	2326,70	Biotina-	ID SEC N°: 40-NH <sub>2</sub>
25 5	0,31	2231,58	Biotina-	ID SEC N°: 41-NH <sub>2</sub>
6	0,43	2289,66	Biotina-	ID SEC N°: 42-NH <sub>2</sub>
7	0,59	2190,57	Biotina-	ID SEC N°: 43-NH <sub>2</sub>
8	0,57	2260,64	Biotina-	ID SEC N°: 44-NH <sub>2</sub>
9	0,62*	2255,64	Biotina-	ID SEC N°: 45-NH <sub>2</sub>
30 10	0,51	2197,56	Biotina-	ID SEC N°: 46-NH <sub>2</sub>
11	0,56	2144,52	Biotina-	ID SEC N°: 47-NH <sub>2</sub>
12	0,46	2090,38	Biotina-	ID SEC N°: 48-NH <sub>2</sub>
13	0,29	2219,54	Biotina-	ID SEC N°: 49-NH <sub>2</sub>
14	0,29	2180,53	Biotina-	ID SEC N°: 50-NH <sub>2</sub>
35 15	0,36	2318,70	Biotina-	ID SEC N°: 51-NH <sub>2</sub>
16	0,32	2303,73	Biotina-	ID SEC N°: 52-NH <sub>2</sub>
17	0,47	2209,57	Biotina-	ID SEC N°: 53-NH <sub>2</sub>
18	0,48	2257,60	Biotina-	ID SEC N°: 54-NH <sub>2</sub>
19	0,17	2273,57	Biotina-	ID SEC N°: 55-NH <sub>2</sub>
40 20	0,27	2300,60	Biotina-	ID SEC N°: 56-NH <sub>2</sub>
21	0,29	2383,77	Biotina-	ID SEC N°: 57-NH <sub>2</sub>

## ES 2 378 173 T3

	22	0,35	2401,83	Biotina-	ID SEC N°: 58-NH <sub>2</sub>
	23	0,45	2407,92	Biotina-	ID SEC N°: 59-NH <sub>2</sub>
	24	0,42	2541,08	Biotina-	ID SEC N°: 60-NH <sub>2</sub>
	25	0,33	2513,97	Biotina-	ID SEC N°: 61-OH
5	27	0,42	2283,64	Biotina-	ID SEC N°: 62-NH <sub>2</sub>
	28	0,27	2425,81	Biotina-	ID SEC N°: 63-NH <sub>2</sub>
	29	0,57	2228,57	Biotina-	ID SEC N°: 64-NH <sub>2</sub>
	30	0,62*	2223,57	Biotina-	ID SEC N°: 65-NH <sub>2</sub>
	31	0,51	2165,49	Biotina-	ID SEC N°: 66-NH <sub>2</sub>
10	(continuación)				
	32	0,56	2112,45	Biotina-	ID SEC N°: 67-NH <sub>2</sub>
	33	0,27	2207,56	Biotina-	ID SEC N°: 68-NH <sub>2</sub>
	34	0,33	2345,73	Biotina-	ID SEC N°: 69-NH <sub>2</sub>
	35	0,29	2330,76	Biotina-	ID SEC N°: 70-NH <sub>2</sub>
15	36	0,45	2236,60	Biotina-	ID SEC N°: 71-NH <sub>2</sub>
	37	0,43	2276,64	Biotina-	ID SEC N°: 72-NH <sub>2</sub>
	38	0,12	2292,62	Biotina-	ID SEC N°: 73-NH <sub>2</sub>
	39	0,22	2319,64	Biotina-	ID SEC N°: 74-NH <sub>2</sub>
	40	0,24	2402,82	Biotina-	ID SEC N°: 75-NH <sub>2</sub>
20	41	0,33	2387,80	Biotina-	ID SEC N°: 76-NH <sub>2</sub>
	42	0,43	2393,90	Biotina-	ID SEC N°: 77-NH <sub>2</sub>
	43	0,39	2527,05	Biotina-	ID SEC N°: 78-NH <sub>2</sub>
	44	0,35	2471,88	Biotina-	ID SEC N°: 79-OH

(\* indica un valor de hidrofobicidad elevado)

25 **Ejemplo: una placa de 96 pocillos típica dispuesta para este ensayo.**

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
<b>A</b>	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<b>B</b>	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<b>C</b>	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
<b>D</b>	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
<b>E</b>	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38

ES 2 378 173 T3

<b>F</b>	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
<b>G</b>	39	39	40	40	41	41	42	42	43	43	44	44
<b>H</b>	+VE (4)	+VE (16)	+VE (32)	+VE (4)	+VE (16)	+VE (32)	-VE (4)	-VE (16)	-VE (32)	-VE (4)	-VE (16)	-VE (32)

NB: los números indican el péptido en cada pocillo

Los números entre paréntesis indican en el factor de dilución del anticuerpo control.

Absorbancia a 490 nm de los 96 pocillos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	0,057	0,067	0,079	0,063	0,072	0,061	0,084	0,061	0,075	0,064	0,075	0,066
<b>B</b>	0,068	0,070	0,105	0,065	0,075	0,072	0,071	0,070	0,064	0,061	0,062	0,063
<b>C</b>	0,119	0,081	0,099	0,064	0,073	0,077	0,060	0,061	0,090	0,144	2,109	2,200
<b>D</b>	0,115	0,129	0,141	0,060	0,090	0,063	0,104	0,078	0,076	0,135	2,148	2,210
<b>E</b>	0,060	0,074	0,098	0,062	0,064	0,071	0,088	0,082	0,089	0,073	0,068	0,067
<b>F</b>	0,082	0,078	0,071	0,062	0,056	0,057	0,084	0,067	0,090	0,074	0,063	0,056
<b>G</b>	0,057	0,055	0,060	0,060	0,058	0,058	0,104	0,108	2,236	2,237	2,229	2,229
<b>H</b>	1,499	1,197	0,739	1,548	1,209	0,976	0,077	0,080	0,072	0,072	0,082	0,103

5

Este resultado (uno de una serie de intentos) tiene correlación con un resultado positivo para los péptidos 24, 25, 43 y 44 como se muestra a continuación (así como los péptidos control positivo). Véase Figura 15. Todos los intentos demuestran que los péptidos 24, 25, 43 y 44 eran positivos.

Péptido 24: QFVKDLLLHLKLFRE (ID SEC N°: 80)

10 Péptido 25: DLLLHLKLFREGRFN (ID SEC N°: 81)

Péptido 43: QFVKDLLVHLKLFRE (ID SEC N°: 82)

Péptido 44: DLLVHLKLFREGQFN (ID SEC N°: 83)

Los péptidos 24 y 25 se derivan de la hIL-13. Los péptidos 43 y 44 derivan de la cynoIL-13.

15 Además y como cabría esperar, todos los Acsm 6A1 quimérico, L1+A1 y L2+A1 se unen al mismo epítipo lineal de la región C-terminal en ambas IL-13 humana y de macaco (datos para los Acsm 6A1 quimérico, L1+A1 y L2+A1 no mostrados).

En resumen, los resultados del ELISA indican que el Acsm 6A1 parental de ratón, el 6A1 quimérico, los Acms L1+A1 y L2+A1 se unen todos dentro de la siguiente secuencia de la proteína IL-13 humana:

DLLLHLKLFRE (ID SEC N°: 84)

20 Y dentro de la siguiente secuencia de la proteína IL-13 de macaco:

DLLVHLKLFRE (ID SEC N°: 85)

NB: **LA NEGRITA** indica diferencias de residuo entre IL-13 humana y ortólogo de IL-13 de macaco.

Por consiguiente se ha determinado que el Acm 6A1 parental de ratón, el 6A1 quimérico, los Acsm L1+A1 y L2+A1 se unen inmunoespecíficamente a IL-13 humana entre los residuos 97 y 108 de ID SEC N°: 9

**6.8 Mapeo preciso del epítipo de 6A1 usando péptidos biotinilados**

5 Se determinó el epítipo de unión exacto para el Acm 6A1 usando un grupo de péptidos basados en torno a KDLLLHLKLFREG para la unión a IL-13 humana y a KDLLVHLKLFREG para la unión a IL-13 de macaco. Los péptidos se ordenaron con un aminoácido eliminado secuencialmente de cualquiera de los dos N o C-término de estas secuencias peptídicas parentales (es decir, KDLLLHLKLFREG o KDLLVHLKLFREG), para definir el epítipo de unión lineal preciso para el Acm 6A1.

Se usó un método de ELISA para detectar la unión del péptido biotinilado inmovilizado al Acm 6A1 parental.

10 El número de identificación del péptido (413 a 447) y sus secuencias correspondientes se muestran a continuación.

Secuencias de los péptidos:

	<u>Péptido #</u>	<u>N-Térm.</u>	<u>Secuencia</u>	<u>C- Térm.</u>
	413	Biotina-	ID SEC N°: 94	-NH <sub>2</sub>
	414	Biotina-	ID SEC N°: 95	-NH <sub>2</sub>
15	415	Biotina-	ID SEC N°: 96	-NH <sub>2</sub>
	416	Biotina-	ID SEC N°: 97	-NH <sub>2</sub>
	417	Biotina-	ID SEC N°: 98	-NH <sub>2</sub>
	418	Biotina-	ID SEC N°: 99	-NH <sub>2</sub>
	419	Biotina-	ID SEC N°: 100	-NH <sub>2</sub>
20	420	Biotina-	ID SEC N°: 101	-NH <sub>2</sub>
	421	Biotina-	ID SEC N°: 102	-NH <sub>2</sub>
	422	Biotina-	ID SEC N°: 103	-NH <sub>2</sub>
	423	Biotina-	ID SEC N°: 104	-NH <sub>2</sub>
	424	Biotina-	ID SEC N°: 105	-NH <sub>2</sub>
25	425	Biotina-	ID SEC N°: 106	-NH <sub>2</sub>
	426	Biotina-	ID SEC N°: 107	-NH <sub>2</sub>
	427	Biotina-	ID SEC N°: 108	-NH <sub>2</sub>
	428	Biotina-	ID SEC N°: 109	-NH <sub>2</sub>
	429	Biotina-	ID SEC N°: 110	-NH <sub>2</sub>
30	430	Biotina-	ID SEC N°: 111	-NH <sub>2</sub>
	431	Biotina-	ID SEC N°: 112	-NH <sub>2</sub>
	432	Biotina-	ID SEC N°: 113	-NH <sub>2</sub>
	433	Biotina-	ID SEC N°: 114	-NH <sub>2</sub>
	434	Biotina-	ID SEC N°: 115	-NH <sub>2</sub>
35	435	Biotina-	ID SEC N°: 116	-NH <sub>2</sub>
	436	Biotina-	ID SEC N°: 117	-NH <sub>2</sub>
	437	Biotina-	ID SEC N°: 118	-NH <sub>2</sub>
	438	Biotina-	ID SEC N°: 119	-NH <sub>2</sub>

ES 2 378 173 T3

	439	Biotina-	ID SEC N°: 120	-NH <sub>2</sub>
	440	Biotina-	ID SEC N°: 121	-NH <sub>2</sub>
	441	Biotina-	ID SEC N°: 122	-NH <sub>2</sub>
	442	Biotina-	ID SEC N°: 123	-NH <sub>2</sub>
5	443	Biotina-	ID SEC N°: 124	-NH <sub>2</sub>
	444	Biotina-	ID SEC N°: 125	-NH <sub>2</sub>
	445	Biotina-	ID SEC N°: 126	-NH <sub>2</sub>
	446	Biotina-	ID SEC N°: 127	-NH <sub>2</sub>
	447	Biotina-	ID SEC N°: 128	-NH <sub>2</sub>
10	44 (Control)	Biotina-	ID SEC N°: 79	-OH

**Ejemplo: una placa de 96 pocillos típica dispuesta para este ensayo**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424
B	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424
C	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436
D	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436
E	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	044
F	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	044
G	BLANK											
H	BLANK											

NB: Los números indican el péptido en cada pocillo

Absorbancia a 490 nm de los 96 pocillos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,456	2,501	2,434	2,419	2,746	2,661	2,224	2,407	0,059	0,052	0,052	2,527
B	2,480	2,452	2,444	2,624	2,639	3,106	2,188	2,473	0,059	0,055	0,052	2,568
C	2,472	0,099	0,065	0,059	0,070	0,058	0,053	0,054	0,162	2,479	2,389	2,883
D	2,399	0,100	0,067	0,053	0,049	0,051	0,052	0,047	0,485	2,838	2,783	2,640
E	2,582	2,359	2,585	2,512	0,096	0,052	0,054	0,048	0,049	0,183	0,051	2,424
F	2,431	2,872	2,522	2,243	0,097	0,059	0,052	0,049	0,057	0,047	0,050	2,342
G	0,056	0,051	0,058	0,065	0,056	0,067	0,049	0,047	0,053	0,057	0,052	0,056
H	0,047	0,052	0,050	0,070	0,054	0,047	0,056	0,053	0,049	0,050	0,052	0,049

15

Véase Figuras 16a y 16b. Los resultados indican que el Acm 6A1 parental se une al epítipo lineal de aminoácidos KKLFR en la región C-terminal de ambos IL-13 humana y el ortólogo de IL-13 de macaco.

Además y como cabría esperar el 6A1 quimérico y los Acsms L1+A1 y L2+A1 se unen todos al mismo epítipo lineal

(es decir, KKLFR) en la región C-terminal de IL-13 humana (datos para los Acm 6A1 quimérico, L1+A1 y L2+A1 no mostrados). Posteriormente se demostró que el Acm 6A1 parental se une al mismo epítipo en IL-13 de macaco.

En resumen, los resultados del ELISA indican que el Acm 6A1 parental de ratón, el 6A1 quimérico, los Acm L1+A1 y L2+A1 se unen todos dentro de la siguiente secuencia de la proteína IL-13 humana: **KKLFR**

5 **6.9 Exploración de alanina del epítipo de unión del 6A1 usando péptidos biotinilados**

10 Para identificar los residuos claves involucrados en la interacción de IL-13 con el Acm 6A1, se adoptó una aproximación de exploración de alanina usando una secuencia péptica parental que contiene el epítipo de unión KKLFR (es decir, QFVKDLLLHLKFLREGRFN). Para este análisis, se generaron péptidos (suministrados por AnaSpec Inc) en los que uno de los aminoácidos se sustituyó secuencialmente por un residuo alanina en cada posición del aminoácido en el epítipo KKLFR (y también para cada uno de los aminoácidos que bordean directamente este epítipo).

Se usó un método de ELISA para detectar la unión del péptido biotinilado inmovilizado al Acm 6A1 y L1+A1.

Los péptidos generados para este análisis y el número de identificación del péptido correspondiente se muestran a continuación:

15

<u>Péptido #</u>	<u>N-Térm.</u>	<u>Secuencia</u>			
1	Biotina	ID SEC N°: 129			
62	Biotina	ID	SEC	N°:	130
63	Biotina	ID	SEC	N°:	131
64	Biotina	ID	SEC	N°:	132
20 65	Biotina	ID	SEC	N°:	133
66	Biotina	ID	SEC	N°:	134
67	Biotina	ID	SEC	N°:	135
68	Biotina	ID SEC N°: 136			

Resultados: Absorbancia a 490 nm

25 Resultados de prueba promedio (n = 2).

Para el Acm 6A1 parental (murino):

Número de péptido	1	62	63	64	65	66	67	68
A <sub>490</sub> promedio	3,543	3,489	3,2795	1,468	3,8495	3,5995	0,595	3,581

Para L1+A1:

Número de péptido	1	62	63	64	65	66	67	68
A <sub>490</sub> promedio	2,8535	2,832	2,6535	1,8175	3,0165	2,84	0,816	2,8085

Véase Figuras 17a y 17b.

30 Estos datos sugieren que los residuos aminoácido claves implicados en la interacción del Acm 6A1 o L1+A1 con IL-13 son la arginina (R) en la posición 107, y la lisina (K) en la posición 103.

Este análisis se repitió, pero usando Acm 6A1 y L1+A1 a un intervalo de concentraciones para confirmar este efecto sobre un intervalo de dilución de Acm.

35 El ratón parental Acm 6A1 (figura 17c) y el candidato humanizado L1+A1 (figura 17d) se probaron para unirse a la exploración de alanina de los péptidos (ID SEC N°s: 129, 131-135) en varias concentraciones. Como los péptidos tuvieron que ser divididos a través de dos placas de 96 pocillos, la secuencia parental del péptido que no contiene sustituciones de alanina (ID SEC N°:129) se probó en ambas placas - por tanto dos resultados por gráfico. Esto fue para determinar si había mayor variación placa a placa y en ambos casos, no había variación aparente.

5 Los péptidos que contienen las sustituciones K103A, L105A y F106A ((ID SEC N<sup>os</sup>: 131, 133 Y 134 respectivamente, numeración de resto como se expone en ID SEC N<sup>o</sup>:9) mostraron un enlace muy similar a los Acsm como los péptidos parentales (ID SEC N<sup>o</sup>:129), por lo tanto estos restos no son críticos para el enlace 6A1/L1 +A1 con IL-13. Los péptidos que contienen las sustituciones K104A y R107A ((ID SEC N<sup>os</sup>: 132 y 135 respectivamente, numeración de resto como se expone en ID SEC N<sup>o</sup>:9), muestran sin embargo enlace reducido de 6A1/L1 +A1 comparado con el péptido parental (ID SEC N<sup>o</sup>:129), particularmente en las concentraciones más bajas, indicando que estos restos son críticos para un enlace óptimo de 6A1/L1 +A1 con IL-13.

Véase Figuras 17c y 17d.

10 Estos datos confirman que los residuos aminoácido claves implicados en la interacción del 6A1 parental (es decir, murino) o L1+A1 con IL-13 son la arginina (R) en la posición 107, y la lisina (K) en la posición 103 de ID SEC N<sup>o</sup>: 9.

### **SECCIÓN 7. - MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS**

En la siguiente sección se usaron los siguientes materiales y procedimientos donde fuese apropiado. Estos materiales y procedimientos son representativos. Se pueden haber producido cambios menores de los materiales y procedimientos en experimentos repetidos.

#### **15 MATERIALES**

SV Total RNA Isolation System: Promega Z3100

Access RT-PCR System: Promega A1250

Kit QIAquick Gel Extraction: Qiagen 28704

Disolución de carga de gel: Sigma G7654

20 Agarosa: Invitrogen 15510-019

Bromuro de etidio: Sigma E1510

Tampón TAE: Elaboración propia

Escalera de ADN de 100 pb: New England Biolabs N3231S

Kit de clonación TA: Invitrogen 45-0046

25 Células TOP10F': Invitrogen 44-0300

L-agar + 100 µg/ml de ampicilina: Elaboración propia

X-Gal, 50 mg/ml en DMF: Promega V394A

ADN polimerasa AmpliTaq: Applied Biosystems

Tampón de PCR 10x: Applied Biosystems

30 E-Gel de agarosa al 1,2%: Invitrogen G501801

Medio LB + 100 µg/ml de ampicilina: Elaboración propia

Kit QIAprep Spin Miniprep: Qiagen 27106

Kit MinElute PCR Purification: Qiagen 28004

NEBuffer2 10x conc: New England Biolabs B7002S

35 BSA purificado 100x conc: New England Biolabs B9001S

BsiW I: New England Biolabs R0553L

Hind III: Promega R604A

Spe I: New England Biolabs R0133S

LigaFast Rapid DNA Ligation System: Promega M8225

40 Células MAX Efficiency DH5α Chemically Competent: Invitrogen 18258-012

Medio SOC: Elaboración propia

Kit QIAfilter Plasmid Maxi: Qiagen 12263

MEM de Dulbecco con Glutamax-1: Invitrogen 31966-021

Optimem 1 con Glutamax-1: Invitrogen 51985-026

5 TransFast Transfection Reagent: Promega E2431

1ml HiTrap rProtein A Sepharose FF: Amersham Biosciences 17-5079-01

PBS de Dulbecco: Sigma D8537

Tampón ImmunoPure IgG Elution: Pierce 21009

Trizma-HCl 1M pH 8,0: Sigma T2694

10 ADN polimerasa ProofStart: Qiagen 1016816

Tampón de PCR ProofStart: Qiagen 1016961

### **7.1. ELISA de unión a IL-13 humana o de macaco**

Este ensayo describe un ELISA que detecta la unión de un anticuerpo a IL-13 humana o de macaco. Es un formato de ELISA en sándwich.

#### **7.1.1 Materiales**

1. Nunc Immunoplate 1 F96 Maxisorp (Life Technologies, 4-39454A)
2. IL-13 humana (Cambridge Biosciences, n° cat. CH1-013)
3. IL-13 de macaco (fabricado por GlaxoSmithkline)
4. Anticuerpo policlonal de cabra anti-IL-13 humana (R+D Systems, n° cat. AF-213-NA)
- 20 5. Anti-IgG-HRP humana (Sigma, N° cat. A-6029)
6. Anti-IgG-HRP de ratón (Sigma, N° cat. A-9309)
7. Tampón carbonato/bicarbonato (Sigma; n° cat. C-3041)
8. TBST [solución salina Tris tamponada (6,06 g Tris + 8,06 g NaCl + 0,2 g KCl + H<sub>2</sub>O hasta 1L) + Tween 20 al 0,05%]
- 25 9. BSA (Sigma A-7030)
10. OPD (Sigma, N° cat. P-9187)
11. Ácido sulfúrico

#### **7.1.2 Procedimiento**

1. La disolución de bloqueo es BSA al 3%+TBST
- 30 2. La disolución de lavado es TBST
3. Cubrir las placas de ELISA 'Nunc Maxisorp' con 50 µl de anticuerpo policlonal de cabra anti-IL-13 humana 5 µg/ml (R+D Systems, n° cat. AF-213-NA. Preparado a una concentración de stock de 500 µg/ml según las instrucciones del fabricante, y almacenado en alícuotas a -20°C) en tampón carbonato/bicarbonato (Sigma; n° cat. C-3041, preparado según las instrucciones del fabricante), cubrir con un precinto de la placa e incubar durante toda la noche a 4°C.
- 35 4. Bloquear con 100 µl de BSA al 3%/TBST, incubar a temperatura ambiente durante 1 h.
5. Lavar X3 en TBST (al menos 200 µl de disolución de lavado por pocillo y por lavado).
6. Añadir 20 ng **por pocillo** (en un volumen de 50 µl) de IL-13 humana (Cambridge Bioscience, n° cat. CH1-013. Preparado a una concentración de stock de 100 ng/µl según las instrucciones del fabricante, y almacenado en

alícuotas a -20°C) o 20 ng **por pocillo** de IL-13 de macaco, en disolución de bloqueo e incubar a temperatura ambiente durante 1 h.

7. Lavar X3 en TBST.

5 8. Añadir 50 µl de muestra de anticuerpo (titulado para obtener los datos de titulación del último punto, si fuese necesario) en disolución de bloqueo, incubar a temperatura ambiente durante 1 h.

9. Lavar X3 en TBST.

10 10. Para el anticuerpo humanizado o el anticuerpo 6A1 quimérico, detectar la unión usando 50 µl por pocillo de anti-IgG-HRP humana (Sigma, N° cat. A-6029) a una dilución 1/2000 en disolución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Para el anticuerpo monoclonal 6A1 de ratón, detectar la unión usando 50 µl por pocillo de anti-IgG-HRP de ratón (Sigma, N° cat. A-9309) a una dilución 1/1000 en disolución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente.

11. Lavar X3 en TBST.

12. Revelar con 100 µl de OPD (Sigma, N° cat. P-9187. Preparado según las instrucciones del fabricante), detener con 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 M, leer a una absorbancia de 490 nm. El tiempo de revelado es de ~ 12 minutos.

## 15 **7.2. ELISA de la unión de IL-13 humana a la cadena IL-13Rα1 humana**

Este ELISA determina si un anticuerpo puede inhibir la unión de IL-13 humana a la cadena IL-13Rα1 humana.

### **7.2.1 Materiales**

1. Nunc Immunoplate 1 F96 Maxisorp (Life Technologies, 4-39454A)

2. IL-13Rα1-Fc humana (R&D Systems, cat.no. 146-IR)

20 3. IL-13 humana marcada con Det-1 (elaboración propia)

4. Anti-IL-13 humana biotinilada (R&D Systems, n° cat. BAF213)

5. Estreptavidina-HRP

6. Tampón carbonato/bicarbonato (Sigma; n° cat. C-3041)

25 7. TBST [solución salina Tris tamponada (6,06 g Tris + 8,06 g NaCl + 0,2 g KCl + H<sub>2</sub>O hasta 1 L) + 0.05% Tween 20]

8. BSA (Sigma A-7030)

9. OPD (Sigma, N° cat. P-9187)

10. Ácido sulfúrico

### **7.2.2 Procedimiento**

30 1. La disolución de bloqueo es BSA al 3%+TBST

2. La disolución de lavado es TBST

3. Cubrir las placas de ELISA 'Nunc Maxisorp' con 50 µl de IL-13Rα1-Fc humana 5 ng/µl en tampón carbonato/bicarbonato. Cubrir con un precinto de la placa e incubar durante toda la noche a 4°C.

4. Bloquear con 100 µl de BSA al 3%/TBST, incubar a temperatura ambiente durante 1 h.

35 5. Lavar X3 en TBST (al menos 200 µl de disolución de lavado por pocillo y por lavado).

6. En un volumen total de 50 µl, pre-incubar IL-13 humana marcada con det-1 0,04 ng/µl con la muestra de anticuerpo (titulado) en disolución de bloqueo durante 30 minutos. Añadir la muestra pre-incubada a la placa del ELISA cubierta con el receptor e incubar a temperatura ambiente durante 1 h.

7. Lavar X3 en TBST.

40 8. Detectar cualquier unión a IL-13 humana usando 50 µl por pocillo de anti-IL-13 humana biotinilada diluida a 1 µg/ml. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.

9. Lavar X3 en TBST.

10. Añadir 50 µl por pocillo de conjugado estreptavidina-HRP a una dilución 1/1000. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.

11. Lavar X3 en TBST.

5 12. Revelar con 100 µl de OPD (Sigma, N° cat. P-9187. Preparado según las instrucciones del fabricante), detener con 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 M, leer a una absorbancia de 490 nm. El tiempo de revelado es de ~ 2 minutos.

### **7.3. ELISA de unión de IL-13 humana a la cadena IL-13Rα2 humana**

Este ELISA determina si un anticuerpo puede inhibir la unión de IL-13 humana a la cadena IL-13Rα2 humana.

#### **7.3.1 Materiales**

- 10 1. Nunc Immunoplate 1 F96 Maxisorp (Life Technologies, 4-39454A)
- 2. Anti-IgG humana (Sigma, n° cat. I-3382)
- 3. IL-13Rα2-Fc humana (R&D Systems, cat.no. 614-IR)
- 4. IL-13 humana marcada con Det-1 (elaboración propia)
- 5. Anti-IL-13 humana biotinilada (R&D Systems, n° cat. BAF213)
- 15 6. Estreptavidina-HRP
- 7. Tampón carbonato/bicarbonato (Sigma; n° cat. C-3041)
- 8. TBST [solución salina Tris tamponada (6,06 g Tris + 8,06 g NaCl + 0,2 g KCl + H<sub>2</sub>O hasta 1 L) + 0.05% Tween 20]
- 9. BSA (Sigma A-7030)
- 20 10. OPD (Sigma, N° cat. P-9187)
- 11. Ácido sulfúrico

#### **7.3.2 Procedimiento**

- 1. La disolución de bloqueo es BSA al 3%+TBST
- 2. La disolución de lavado es TBST
- 25 3. Cubrir las placas de ELISA 'Nunc Maxisorp' con 50 µl de anti-IgG humana diluida a 1/1000 en tampón carbonato/bicarbonato. Cubrir con un precinto de la placa e incubar durante toda la noche a 4°C.
- 4. Bloquear con 100 µl de BSA al 3%/TBST, incubar a temperatura ambiente durante 1 h.
- 5. Lavar X3 en TBST (al menos 200 µl de disolución de lavado por pocillo y por lavado).
- 30 6. Añadir 50 µl por pocillo de IL-13Rα2-Fc humana 1 µg/ml en disolución de bloqueo. Cubrir con un precinto de la placa e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.
- 7. Lavar X3 en TBST.
- 8. En un volumen total de 50 µl, pre-incubar IL-13 humana marcada con det-1 0,04 ng/µl con la muestra de anticuerpo (titulado) en disolución de bloqueo durante 30 minutos. Añadir la muestra pre-incubada a la placa del ELISA cubierta con el receptor e incubar a temperatura ambiente durante 1 h.
- 35 9. Lavar X3 en TBST.
- 10. Detectar cualquier unión a IL-13 humana usando 50 µl por pocillo de anti-IL-13 humana biotinilada diluida a 1 µg/ml. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 11. Lavar X3 en TBST.
- 40 12. Añadir 50 µl por pocillo de conjugado estreptavidina-HRP a una dilución 1/1000. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.

13. Lavar X3 en TBST.

14. Revelar con 100  $\mu$ l de OPD (Sigma, N° cat. P-9187. Preparado según las instrucciones del fabricante), detener con 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 M, leer a una absorbancia de 490 nm. El tiempo de revelado es de ~ 2 minutos

#### **7.4. Bioexperimento de neutralización de IL-13** (ensayo de proliferación de células TF-1)

5 Este es un bioexperimento de IL-13 que se puede usar para determinar la capacidad de neutralización de un anticuerpo anti-IL-13. El procedimiento descrito a continuación usa IL-13 recombinante humana o de macaco. También se puede usar en este ensayo IL-13 humana expresada en mamíferos o la variante IL-13 humana Q130. (Las células TF-1 también proliferan en respuesta a IL-5 humana. Este ensayo también se usó para evaluar la capacidad de neutralización del 6A1 sobre la bioactividad de IL-5 humana).

##### **7.4.1 Materiales**

1. Línea celular TF-1 (elaboración propia)
2. Placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos (Invitrogen)
3. IL-13 humana (Cambridge Bioscience, n° cat. CH1-013)
4. Ensayo de proliferación celular no reactivo CellTiter 96 (Promega, N° cat. G4000)

##### **7.4.2 Procedimiento**

1. Procedimiento para medir la capacidad de un Acm anti-IL-13 humana para neutralizar la bioactividad de IL-13 recombinante humana o de macaco en un bioexperimento con células TF-1 (línea celular TF-1 de elaboración propia, no la versión del ATCC).
2. Este ensayo se realiza en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos estériles (Invitrogen), en condiciones estériles. Todas las pruebas se realizan por triplicado.
3. Pre-incubar IL-13 humana 10 ng/ml (Cambridge Bioscience, n° cat. CH1-013. Preparada a una concentración de stock de 100 ng/ $\mu$ l según las instrucciones del fabricante usando una técnica estéril en una campana de cultivo de tejidos de clase 2, almacenada en alícuotas pequeñas a -20°C) o IL-13 de macaco 10 ng/ml (de elaboración propia CA) con varias diluciones del Acm anti-IL-13 humana (diluido a partir de 6  $\mu$ g/ml en 3 diluciones hasta 0,025  $\mu$ g/ml) en un volumen total de 50  $\mu$ l durante 1 hora a 37°C. También están incluidos los pocillos con el control positivo, que presentan IL-13 pero no Acm anti-IL-13 humana. Además, los pocillos con el control negativo no presentarán IL-13 ni Acm anti-IL-13 humana. Uso de una placa de 96 pocillos de fondo redondo estéril, con baja unión de proteínas, para esta pre-incubación. (Nótese que la concentración de IL-13 y el Acm anti-IL-13 humana se reducirá a la mitad en una etapa posterior cuando se añadan las células).
4. Plaques 50  $\mu$ l de células TF-1 a  $2 \times 10^5$  por ml en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos estéril. Después de 1 hora de pre-incubación, añadir la muestra de IL-13 y de Acm anti-IL-13 humana a las células. El volumen final del ensayo de 100  $\mu$ l, que contiene varias diluciones del Acm anti-IL-13 humana, IL-13 recombinante y células TF-1, se incuba a 37°C durante ~70 horas en un incubador de CO<sub>2</sub> humidificado.
5. A las ~ 66 hs, se examinó los pocillos para confirmar que estaban estériles y no se había producido contaminación por bacterias.
6. Añadir 15  $\mu$ l por pocillo de sustrato MTT esterilizado con filtro (N° cat. G4000, Promega. Preparados según las instrucciones del fabricante) durante las 4 horas finales de incubación.
7. Detener la reacción con 100  $\mu$ l de disolución de stop (suministrada en el kit MTT) para solubilizar el producto azul de formazán metabolizado. Dejar durante al menos 2 horas, a continuación pipetear arriba y abajo para ayudar a disolver los cristales. Alternativamente, cubrir la placa con un precinto de la placa y dejar a 4°C durante toda la noche, a continuación pipetear arriba y abajo al día siguiente (esto es más fácil para el pipeteo)
8. Leer la absorbancia de la disolución en cada pocillo en un lector de placas de 96 pocillos a una longitud de onda de 570 nm.
9. La capacidad del Acm anti-IL-13 humana para neutralizar la bioactividad de IL-13 humana o de macaco se expresa como, aquella concentración de Acm anti-IL-13 humana necesaria para neutralizar la bioactividad de una cantidad definida de IL-13 humana o de macaco (5 ng/ml) al 50% (= DN<sub>50</sub>). Cuanto menor sea la concentración necesaria, más potente es la capacidad de neutralización.

**Ejemplo: una placa de 96 pocillos típica dispuesta para este ensayo**

Muestra 1

Control positivo Ac

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	3 ug/ml Acm anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1			Acm muestra 2			Acm muestra 3			3 ug/ml poli anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1		
<b>B</b>	1 ug/ml Acm anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1									1 ug/ml poli anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1		
<b>C</b>	0,33 ug/ml Acm anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1									0,33 ug/ml poli anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1		
<b>D</b>	0,11 ug/ml Acm anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1			↓			↓			0,11 ug/ml poli anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1		
<b>E</b>	0,037 ug/ml Acm anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1									0,037 ug/ml poli anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1		
<b>F</b>	0,0123 ug/ml Acm anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1									0,0123 ug/ml poli anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1		
<b>G</b>	Control positivo para la proliferación de células TF-1 = células TF-1 + IL-13 (sin Acm, 12 pocillos)											
<b>H</b>	Control para el fondo = Células TF-1 presentes exactas (sin IL-13, sin muestra de Acm, 12 pocillos)											

**7.5. ELISA de unión a IL-4 humana**

5 Este ensayo describe un ELISA que detecta la unión de un anticuerpo a IL-4 humana. Es un formato de ELISA en sandwich.

**7.5.1 Materiales**

1. Nunc Immunoplate 1 F96 Maxisorp (Life Technologies, 4-39454A)
2. IL-4 humana (R+D Systems, n° cat.)
- 10 3. Anticuerpo policlonal de cabra anti-IL-4 humana (R+D Systems, N° cat. AF-204-NA)
4. Anticuerpo monoclonal de rata anti-IL-4 humana biotinilado (BD / Pharmingen, N° cat.)
5. Anti-IgG-HRP de ratón (Dako, N° cat. P0260)
6. Anti-IgG-HRP de ratón (Sigma, N° cat. A-9309)
7. Tampón carbonato/bicarbonato (Sigma; n° cat. C-3041)
- 15 8. PBST (PBS + Tween 20 al 0,05%)
9. BSA (Sigma A-7030)
10. OPD (Sigma, N° cat. P-9187)
11. Ácido sulfúrico

### **7.5.2 Procedimiento**

1. La disolución de bloqueo es BSA al 3% en PBST
2. La disolución de lavado es PBST
- 5 3. Cubrir las placas de ELISA 'Nunc Maxisorp' con 50 µl de anticuerpo policlonal de cabra anti-IL-4 humana 5 µg/ml (R+D Systems, nº cat. AF-204-NA. Preparado a una concentración de stock de 500 µg/ml según las instrucciones del fabricante, y almacenado en alícuotas a -20°C) en tampón carbonato/bicarbonato (Sigma; nº cat. C-3041, preparado según las instrucciones del fabricante), cubrir con un precinto de la placa e incubar durante toda la noche a 4°C.
4. Bloquear con 100 µl de BSA al 3%/PBST, incubar a temperatura ambiente durante 1 h.
- 10 5. Lavar X3 en PBST (al menos 200 µl de disolución de lavado por pocillo y por lavado).
6. Añadir IL-4 humana 1 ng/ml (en un volumen de 50 µl) en disolución de bloqueo e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.
7. Lavar X3 en PBST.
- 15 8. Añadir 50 µl de muestra de anticuerpo (titulado para obtener los datos de titulación del último punto, si fuese necesario) en disolución de bloqueo, incubar a temperatura ambiente durante 1 h. Como control positivo para la unión a IL-4 humana, usar un anticuerpo monoclonal anti-IL-4 humana biotinilado (titulado).
9. Lavar X3 en TBST.
- 20 10. Para el anticuerpo monoclonal 6A1 de ratón, detectar la unión usando 50 µl por pocillo de anti-IgG-HRP de ratón (Sigma, Nº cat. A-9309) a una dilución 1/1000 en disolución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Para el anticuerpo humanizado o el anticuerpo 6A1 quimérico, detectar la unión usando 50 µl por pocillo de anti-IgG-HRP humana (Sigma, Nº cat. A-6029) a una dilución 1/2000 en disolución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Para el control positivo del anticuerpo monoclonal anti-IL-4 humana de rata biotinilado, detectar usando un anticuerpo conjugado con estreptavidina-HRP. (Alternativamente, el anticuerpo anti-HRP de ratón, P0260, detectará ambos anticuerpos 6A1 y el anticuerpo monoclonal de rata anti-IL-4 humana biotinilado).
- 25 11. Lavar X3 en TBST.
12. Revelar con 100 µl de OPD (Sigma, Nº cat. P-9187. Preparado según las instrucciones del fabricante), detener con 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 M, leer a una absorbancia de 490 nm.

### **7.6. ELISA del mapeo del epítipo**

30 Este ensayo describe un ELISA que detecta la unión del Acm 6A1 de ratón a péptidos de IL-13 humana o de macaco.

#### **7.6.1 Materiales**

1. Nunc Immunoplate 1 F96 Maxisorp (Life Technologies, 4-39454A)
2. Estreptavidina ImmunoPure© (Pierce, nº cat. 21125)
3. PBST (solución salina fosfato tamponada + Tween 20 al 0,05%)
- 35 4. BSA (Sigma A-7030)
5. Péptidos 16-meros de IL-13 humana y de macaco, compensación = 4 (Orden de encargo a Mimotopes)
6. Péptidos 20-meros control positivo y negativo (Suministrados con la orden de encargo a Mimotopes)
7. Acm 6A1
8. Ac control (Suministrados con la orden de encargo a Mimotopes)
- 40 9. Conjugado Ig de conejo anti-ratón - hP (DAKO, código nº P0260)
10. OPD (Sigma, Nº cat. P-9187)
11. Ácido sulfúrico 3 M

**7.6.2 Procedimiento**

1. La disolución de bloqueo es BSA al 3% + PBST
2. La disolución de lavado es PBST
3. Cubrir las placas de ELISA 'Nunc Maxisorp' con 100 µl de estreptavidina ImmunoPure© 5 µg/ml (Pierce, nº cat. 21125). Preparada a una concentración de stock de 1 mg/ml según las instrucciones del fabricante, y almacenada en alícuotas a +4°C) usando PBST como diluyente. Incubar durante toda la noche a 37°C para permitir que se seque la disolución.
4. Bloquear con 200 µl de BSA al 3%/PBST. Añadir el precinto de la placa e incubar a temperatura ambiente durante 1 h.
5. Lavar X3 en PBST (al menos 200 µl de disolución de lavado por pocillo y por lavado).
6. Por duplicado y usando PBST como diluyente, añadir 100 µl por pocillo (excepto en los pocillos control) de diluciones de 1000 veces de cada péptido (disueltos según las instrucciones del fabricante en 200 µl de acetonitrilo/agua 40/60, a continuación formar alícuotas en diluciones de 10 veces en el mismo disolvente y almacenar -20°C).
7. En los pocillos control, por duplicado y usando PBST como diluyente añadir 100 µl por pocillo de diluciones de 10 veces de los péptidos control (disueltos según las instrucciones del fabricante en 1 ml de acetonitrilo/agua 40/60 y almacenar a -20°C). Añadir el precinto de la placa e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora en una mesa de agitación.
8. Lavar X3 en PBST (al menos 200 µl de disolución de lavado por pocillo y por lavado).
9. Añadir 100 µl por pocillo (excepto en los pocillos control) de Acm de ratón 1,506 µg/ml en PBST.
10. Añadir 100 µl por pocillo sólo a los pocillos control, de diluciones de 4, 16 y 32 veces del anticuerpo control (usado como se suministra por el fabricante y almacenado a -20°C) usando PBST como diluyente. Añadir el precinto de la placa e incubar a rtp (presión y temperatura ambiente) durante 1 hora en una mesa de agitación.
11. Lavar X3 en PBST (al menos 200 µl de disolución de lavado por pocillo y por lavado).
12. Añadir 100 µl por pocillo del conjugado Ig de conejo anti-ratón - hP diluido 2000 veces (DAKO, código nº P0260 usado como se suministra, almacenado a +4°C) usando PBST como diluyente. Añadir el precinto de la placa e incubar a presión y temperatura ambiente durante 1 hora en una mesa de agitación.
13. Lavar X3 en PBST (al menos 200 µl de disolución de lavado por pocillo y por lavado).
14. Revelar con 100 µl de OPD (Sigma, Nº cat. P-9187. Preparado según las instrucciones del fabricante), detener con 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 M, leer a una absorbancia de 490 nm. El tiempo de revelado es de ~ 10 minutos.

**7.7. ELISA del mapeo preciso del epítipo**

*Este ensayo describe un ELISA que detecta la unión del Acm 6A1 a los péptidos de IL-13 humana o de macaco*

**7.7.1 Materiales**

1. Nunc Immunoplate 1 F96 Maxisorp (Life Technologies, 4-39454A)
2. Estreptavidina ImmunoPure© (Pierce, nº cat. 21125)
3. PBST (solución salina fosfato tamponada + Tween 20 al 0,05%)
4. BSA (Sigma A-7030)
5. Péptidos malla protectora parcial de IL-13 humana y de macaco (14-meros truncados por un aminoácido a la vez de ambos extremos N- y C-terminal; orden de encargo a Mimotopes)
6. Péptidos 16-meros control positivo (Suministrados con la orden de encargo a Mimotopes anterior)
7. Acm 6A1 (elaboración propia)
8. Anticuerpo conjugado con Ig de cabra anti-ratón - hP (Sigma A-9309)
9. OPD (Sigma, Nº cat. P-9187)

10. Ácido sulfúrico 3 M

**7.7.2 Procedimiento**

1. La disolución de bloqueo es BSA al 3% + PBST
2. La disolución de lavado es PBST
- 5 3. Cubrir las placas de ELISA 'Nunc Maxisorp' con 100 µl de estreptavidina ImmunoPure® 5 µg/ml (Pierce, nº cat. 21125. Preparada a una concentración de stock de 1 mg/ml según las instrucciones del fabricante, y almacenada a +4°C). Incubar durante toda la noche a 37°C.
4. Bloquear con 200 µl de BSA al 3% en PBST. Añadir el precinto de la placa e incubar durante toda la noche a +4°C.
- 10 5. Lavar X3 en PBST (al menos 200 µl de disolución de lavado por pocillo y por lavado).
6. Por duplicado y usando BSA al 3% en PBST como diluyente, añadir 100 µl por pocillo de diluciones de 1000 veces de cada péptido (disueltos según las instrucciones del fabricante en 200 µl de acetonitrilo/agua 40/60 y almacenados a -20°C).
7. Lavar X3 en PBST (al menos 200 µl de disolución de lavado por pocillo y por lavado).
- 15 8. Añadir 100 µl por pocillo de 6A1 3 µg/ml diluido en BSA al 3% en PBST. Añadir el precinto de la placa e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora en una mesa de agitación.
9. Lavar X3 en PBST (al menos 200 µl de disolución de lavado por pocillo y por lavado).
- 20 10. Añadir 100 µl por pocillo de diluciones de 1000 veces de anticuerpo conjugado con Ig de cabra anti-ratón - hP (Sigma A-9309 usado como se suministra, almacenado a +4°C) usando BSA al 3% en PBST como diluyente. Añadir el precinto de la placa e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora en una mesa de agitación.
11. Lavar X3 en PBST (al menos 200 µl de disolución de lavado por pocillo y por lavado).
12. Revelar con 100 µl de OPD (Sigma, Nº cat. P-9187. Preparado según las instrucciones del fabricante), detener con 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 M, leer a una absorbancia de 490 nm. El tiempo de revelado es de ~ 10 minutos.

**7.8 Procedimiento Biacore™ de construcciones humanizadas para el anticuerpo IL-13 vs IL-13 de longitud completa**

Los análisis cinéticos se llevaron a cabo en un aparato Biacore 3000, usando el procedimiento de captura del anticuerpo. Brevemente, se usó la proteína A para la captura del 6A1 quimérico y de las construcciones humanizadas de anticuerpos, mientras la captura del anticuerpo parental murino 6A1 fue mediante un anticuerpo Fc anti ratones, suministrado por Biacore.

30 Brevemente, el procedimiento es como sigue, el ligando de la captura se inmovilizó en un chip CM5 Biosensor por acoplamiento de la amina primaria según con los protocolos Biacore estándar, y usando los reactivos suministrados en un kit de acoplamiento de amina primaria. El procedimiento implica activación de la superficie del sensor CM5 mediante el paso de una solución de 50mM de N-hidroxisuccinimida (NHS) y 200nM de carbomida de N-etil-N-dimetilaminopropilo (EDC) sobre la superficie. Entonces, el ligando de la captura (disuelto en un tampón de acetato pH5 o pH4.5) se acopló a la superficie del sensor activado después de que fueran bloqueados todos de los esteres todavía activados mediante una inyección de 1M de clorhidrato de etanolamina, pH8.5.

El anticuerpo candidato a continuación se pasó sobre la superficie de la proteína A o del anticuerpo Fc anti ratones, dependiendo de si era humano o ratón en origen y se capturó. Una vez que se observó una señal de unión estable, IL-13 se pasó sobre la superficie del anticuerpo capturado a diversas concentraciones. Las curvas de unión posteriores se analizaron con el software de análisis de Biacore™ BIAeval 4.1 para determinar las cinéticas. Los experimentos se llevaron a cabo usando un tampón Biacore HBS-EP.

**7.8.1 Procedimiento Biacore™ para el anticuerpo IL-13 vs péptido**

45 El análisis cinético se llevó a cabo en un aparato Biacore 3000, usando el enlace directo del anticuerpo con los péptidos de IL-13 inmovilizados. Brevemente, el péptido IL-13 biotinilado se captura usando un chip Biosensor estreptavidina Biacore SA. A continuación los anticuerpos se pasaron sobre la superficie del sensor a diversas concentraciones. Las curvas de unión posteriores se analizaron con el software de análisis de BiacoreBIAeval 4.1 para determinar las cinéticas. Los experimentos se llevaron a cabo usando un tampón Biacore HBS-EP.

**8. Eficacia de mAb anti-IL-13 humanizado L1+A1 en modelo de asma de macacos cangrejeros.**

Esta sección es predictiva.

5 El modelo de broncoconstricción pulmonar inducida por *Ascaris suum* (A.suum) en monos macacos cangrejeros (*Macaca fascicularis*) está reconocido como un modelo no clínico de o relacionado con asma en seres humanos (Patterson R, et al *Trans. Assoc. Am. Physicians* 1980 93:317-325; Patterson R, et al *J. Lab. Clin. Med.* 1983 101:864-872).

10 En este modelo, se exponen animales que tienen una sensibilidad pulmonar innata a A.suum a A.suum nebulizado para inducir una respuesta asmática. Esta respuesta asmática se puede caracterizar midiendo la hiperresponsividad de las vías respiratorias (AHR), la infiltración celular como se mide en el fluido de lavado broncoalveolar (BAL) y los niveles de IgE en suero. Los procedimientos experimentales son similares a los descritos previamente por Mauser P, et al en *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 1995 204:467-472 y por Evanoff H, et al en *Immunologic Investigation* 1992 21:39.

15 Este estudio usa 30 animales, preseleccionados para entrar que hayan demostrado una respuesta broncoconstrictora positiva a una dosis específica de antígeno de A.suum . Se administra A.suum en la dosis de respuesta óptima (ORD) para cada animal. Es una dosis predeterminada de A.suum que produce un incremento en RL (resistencia pulmonar) de al menos un 40% y una disminución en CDYN (conformidad dinámica) de al menos un 35%, por inhalación de aerosol (para una única dosis dada sobre 15 respiraciones usando un nebulizador).

20 Es estudio tiene lugar en 2 fases. Durante la fase 1, se evalúa AHR en respuesta al desafío de histamina intravenosa (i/v) (esto es, una dosis de histamina suficiente para inducir un incremento en RL de al menos un 30% sobre el valor basal (PC30)) tanto antes (la evaluación de la función pulmonar basal en el día 1) como después (en el día 11) administrando antígeno de A.suum (en los días 9 y 10, cuando se administra A.suum en una dosis predeterminada óptima para cada animal por inhalación de aerosol ).

25 La fase 2 es idéntica a la fase 1 excepto en que los animales reciben tratamiento con anticuerpo (véase a continuación), se da cada anticuerpo como 3 dosis de aproximadamente 30mg/kg administrados por infusión i/v en los días 1, 5 y 9.

Grupo 1 (n=12): L1+A1 (mAb anti-IL-13 humanizado, SEC.ID.N.º:18 y SEC.ID.N.º:22)

Grupo 2 (n=12): L1+A1 (mAb anti-IL-13 humanizado, 30 mg/kg) y Pascolizumab (mAb anti-IL4 humanizado, 30 mg/kg)

Grupo 3 (n=6): tratamiento de control negativo con vehículo solo

30 Las lecturas de la AHR de las fases 1 y 2 se calculan tomando lecturas de presión y flujo de aire (resistencia pulmonar (RL) y conformidad dinámica (CDYN)) en respuesta a histamina, usando el sistema mecánico pulmonar de Buxco. El cambio en porcentaje máximo para el valor basal en comparación con el desafío post-antígeno de A.suum [para la resistencia pulmonar (RL) y la conformidad dinámica (CDYN)] se compara para las fases 1 y 2, es decir, con y sin tratamiento de anticuerpo, y estos datos se usan para evaluar el fenotipo de AHR.

35 Además, se toman muestras de BAL en los días 1 y 11 en las fases 1 y 2, para medir la infiltración celular y en particular la eosinofilia. También se toman muestras de suero para monitorizar los niveles de IgE.

Tabla A

Descripción de la proteína o el polinucleótido (PN)	Identificador de secuencia (ID SEC N°: )
6A1, CDRH1	1
6A1, CDRH2	2
6A1, CDRH3	3
6A1, CDRL1	4
6A1, CDRL2	5
6A1, CDRL3	6
6A1, VH (murino)	7
6A1, VL (murino)	8

## ES 2 378 173 T3

hIL-13	9
hIL-13 (PN)	10
6A1, VH, construcción humanizada A1	11
6A1, VH, construcción humanizada A2	12
6A1, VH, construcción humanizada A3	13
6A1, VH, construcción humanizada A4	14
6A1, VL, construcción humanizada L1	15
6A1, VL, construcción humanizada L2	16
6A1, cadena pesada, construcción humanizada A1	18
6A1, cadena pesada, construcción humanizada A2	19
6A1, cadena pesada, construcción humanizada A3	20
6A1, cadena pesada, construcción humanizada A4	21
6A1, cadena ligera, construcción humanizada L1	22
6A1, cadena ligera, construcción humanizada L2	23
6A1, PN que codifica ID SEC N°: 7	24
6A1, PN que codifica ID SEC N°: 8	25
6A1, PN que codifica ID SEC N°: 11	26
6A1, PN que codifica ID SEC N°: 12	27
6A1, PN que codifica ID SEC N°: 13	28
6A1, PN que codifica ID SEC N°: 14	29
6A1, PN que codifica ID SEC N°: 15	30
6A1, PN que codifica ID SEC N°: 16	31
6A1, PN que codifica ID SEC N°: 18	32
6A1, PN que codifica ID SEC N°: 19	33
6A1, PN que codifica ID SEC N°: 20	34
6A1, PN que codifica ID SEC N°: 21	35
6A1, PN que codifica ID SEC N°: 22	36
6A1, PN que codifica ID SEC N°: 23	37

### LISTADO DE SECUENCIAS

ID SEC N°: 1

FYIKDTYMH

5 ID SEC N°: 2

TIDPANGNTKYVPKFQG

ID SEC N°: 3

SIYDDYHYDDYYAMDY

ID SEC N°: 4

RSSQNIVHINGNTYLE

ID SEC N°: 5

5 KISDRFS

ID SEC N°: 6

FQGSHPWT

ID SEC N°: 7

10 EIQLQQSVAELVRPGASVRLSCTASGFYIKDTYMHWWIQRPEQGLEWIGTIDPANGNTKYVPKFQGKATITADTSSNT  
AYLRLSSLTSEDTAIYYCARSYDDYHYDDYYAMDYWGQTSVTVSS.

ID SEC N°: 8

DVLMQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQNIVHINGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKISDRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI  
ISRVEAEDLVVYCFQGSHPWTFGGGTKLEIK.

ID SEC N°: 9

15 GPVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALES LINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQ  
FSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLLLHLKLFREGRFN

ID SEC N°: 10

20 GGCCCTGTGCCTCCCTCTACAGCCCTCAGGGAGCTCATTGAGGAGCTGGTCAACATCACCCAGAACCAGAAGG  
CTCCGCTCTGCAATGGCAGCATGGTATGGAGCATCAACCTGACAGCTGGCATGTACTGTGCAGCCCTGGAATC  
CCTGATCAACGTGTCAGGCTGCAGTGCCATCGAGAAGACCCAGAGGATGCTGAGCGGATTCTGCCCGCACAAAG  
GTCTCAGCTGGGCAGTTTTCCAGCTTGCATGTCCGAGACACCAAAATCGAGGTGGCCAGTTTGTAAGGACCT  
GCTCTTACATTTAAAGAACTTTTTCGCGAGGGACGGTTCAACTGA

ID SEC N°: 11

25 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFYIKDTYMHWVRQAPGQGLEWMGTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADEST  
STAYMELSSLRSED TAVVYCARSIYDDYHYDDYYAMDYWGQGLTVTVSS

ID SEC N°: 12

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFYIKDTYMHWVIQAPGQGLEWMGTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADEST  
STAYMELSSLRSED TAVVYCARSIYDDYHYDDYYAMDYWGQGLTVTVSS

ID SEC N°: 13

30 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFYIKDTYMHWVIQAPGQGLEWMGTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADTST  
STAYMELSSLRSED TAVVYCARSIYDDYHYDDYYAMDYWGQGLTVTVSS

ID SEC N°: 14

QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSKASGFYIKDTYMHWVIQAPGQGLEWMGTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADTST  
STAYMRLSSLRSED TAVVYCARSIYDDYHYDDYYAMDYWGQGLTVTVSS

35 ID SEC N°: 15

DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQNIVHINGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYKISDRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI  
SRVEADDVGIYYCFQGSHPWTFGQGTKLEIK

ID SEC N°: 16

40 DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQNIVHINGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYKISDRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI  
SRVEADDVGVVYCFQGSHPWTFGQGTKLEIK

ID SEC N°: 17

MGWSCILFLVATATGVHS

ID SEC N°: 18

5 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGFYIKDYMHWVRQAPGQGLEWMGTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADEST  
STAYMELSSLRSEDTAVYYCARSYDDYHYDDYYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL  
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDK  
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST  
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI  
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

ID SEC N°: 19

10 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGFYIKDYMHWVIQAPGQGLEWMGTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADEST  
STAYMELSSLRSEDTAVYYCARSYDDYHYDDYYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL  
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDK  
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST  
15 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI  
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

ID SEC N°: 20

20 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGFYIKDYMHWVIQAPGQGLEWMGTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADTST  
STAYMELSSLRSEDTAVYYCARSYDDYHYDDYYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL  
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDK  
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST  
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI  
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

ID SEC N°: 21

25 QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVCKASGFYIKDYMHWVIQAPGQGLEWMGTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADTST  
STAYMRLSSLRSEDTAVYYCARSYDDYHYDDYYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL  
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDK  
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST  
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI  
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

ID SEC N°: 22

30 DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQNIHINGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYKISDRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI  
SRVEADDVGIYYCFQGSHVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN  
ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ID SEC N°: 23

35 DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQNIHINGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYKISDRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI  
SRVEADDVGVYYCFQGSHVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN  
ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ID SEC N°: 24

40 GAAATTCAGCTGCAGCAGTCTGTGGCAGAACTTGTGAGGCCAGGGCCTCAGTCAGGTTGTCCTGCACAGCTT  
CTGGCTTCTACATTAAGACACCTATATGCACTGGGTGATTGAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGA  
ACGATTGATCCTGCGAATGGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCAGGGCAAGGCCACTATAACTGCAGACAC  
ATCCTCAACACAGCCTACCTGCGGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCATCTATTACTGTGCTAGAA  
GCATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCT  
CCTCA

ID SEC N°: 25

45 GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTGAGTCTTGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGAGATCT  
AGTCAGAACATTGTACATATTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTACCTTCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAG  
CTCCTGATCTACAAAATTTCCGACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTGAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGA  
TTTCACGCTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTT  
50 CGTGGACGTTCCGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAA

ID SEC N°: 26

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCT  
TCTGGATTCTACATTAAGACACCTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGG  
GAACGATTGATCCTGCGAATGGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGAC  
5 GAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGA  
GAAGCATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACA  
GTCTCCTCA

ID SEC N°: 27

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCT  
GGATTCTACATTAAGACACCTATATGCACTGGGTGATAACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAACGA  
10 TTGATCCTGCGAATGGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCGA  
GAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAAGCATCTA  
TGATGATTACCACTACGACGATTACTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAGTCTCCTCA

ID SEC N°: 28

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCT  
TCTGGATTCTACATTAAGACACCTATATGCACTGGGTGATAACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGG  
15 AACGATTGATCCTGCGAATGGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACA  
CATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAG  
AAGCATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAG  
TCTCCTCA

ID SEC N°: 29

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAGGGTCTCCTGCAAGGCT  
TCTGGATTCTACATTAAGACACCTATATGCACTGGGTGATAACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGG  
20 AACGATTGATCCTGCGAATGGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACA  
CATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAG  
AAGCATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAG  
TCTCCTCA

ID SEC N°: 30

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCAACCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGATC  
TAGTCAGAACATTGTACATATTAATGAAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACG  
30 GCTCTTGATCTATAAAATTTCCGACCGATTTTCTGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAG  
ATTTTACATTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGACGATGTTGGAATTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTT  
CGTGGACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAG

ID SEC N°: 31

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCAACCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGATC  
TAGTCAGAACATTGTACATATTAATGAAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACG  
35 GCTCTTGATCTATAAAATTTCCGACCGATTTTCTGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAG  
ATTTTACATTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGACGATGTTGGAATTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTT  
CGTGGACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAG.

ID SEC N°: 32

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCT  
TCTGGATTCTACATTAAGACACCTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGG  
GAACGATTGATCCTGCGAATGGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGAC  
40 GAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGA  
GAAGCATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACA  
GTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA  
45 CAGCGGCCCTGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGGAAGTGTGGAAGTGTGGA  
TGACCAAGCGGCTGACACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCTCAGCAGCGTGGTGAC  
CGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTG  
GACAAGAAAAGTGTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGG  
50 GGGACCGTCACTCTTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAT  
GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCACCTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC  
ATAATGCCAAGACAAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGGTTCAGCGTCTCACCGTCT  
GCACCAAGACTGGTGAATGGCAAGGAGTACAAGTTCACAGGTTCCAAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAG  
AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGATGAGC  
55 TGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA

GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC  
TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG  
CTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA

ID SEC N°: 33

5 CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCT  
TCTGGATTCTACATTAAGACACCTATATGCACTGGGTGATACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGG  
AACGATTGATCCTGCGAATGGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACG  
AATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAG  
AAGCATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAG  
10 TCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCAC  
AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCAGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCT  
GACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACC  
GTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG  
ACAAGAAAGTGTAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGG  
15 GGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATG  
CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA  
TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACGCGTCTCACCGTCTG  
CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGA  
AAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCT  
20 GACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG  
AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCT  
ACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC  
TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA

ID SEC N°: 34

25 CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCT  
TCTGGATTCTACATTAAGACACCTATATGCACTGGGTGATACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGG  
AACGATTGATCCTGCGAATGGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACA  
CATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAG  
AAGCATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAG  
30 TCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCAC  
AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCAGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCT  
GACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACC  
GTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG  
ACAAGAAAGTGTAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGG  
35 GACCCGTGAGTCTTCTTCCCCCAAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATG  
CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA  
TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACGCGTCTCACCGTCTG  
CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGA  
AAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCT  
40 GACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG  
AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCT  
ACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC  
TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA

ID SEC N°: 35

45 CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAGGGTCTCCTGCAAGGCT  
TCTGGATTCTACATTAAGACACCTATATGCACTGGGTGATACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGG  
AACGATTGATCCTGCGAATGGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACA  
CATCCACGAGCACAGCCTACATGAGGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAG  
AAGCATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAG  
50 TCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCAC  
AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCAGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCT  
GACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACC  
GTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG  
ACAAGAAAGTGTAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGG  
55 GGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATG  
CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA  
TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACGCGTCTCACCGTCTG  
CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGA  
AAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCT  
60 GACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG

AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCT  
ACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC  
TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA

ID SEC N°: 36

5 GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGATC  
TAGTCAGAACATTGTACATATTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACG  
GCTCTTGATCTATAAAAATTTCCGACCGATTTTCTGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAG  
ATTTTACATTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGACGATGTTGGAATTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTT  
CGTGGACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC  
10 GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGG  
CCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAG  
CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTAC  
GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG

ID SEC N°: 37

15 GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGATC  
TAGTCAGAACATTGTACATATTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACG  
GCTCTTGATCTATAAAAATTTCCGACCGATTTTCTGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAG  
ATTTTACATTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGACGATGTTGGAATTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTT  
CGTGGACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC  
20 GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGG  
CCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAG  
CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTAC  
GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG

ID SEC N°: 38

25 SGSGPSTALRELIEELVNIT

ID SEC N°: 39

SGSGLRELIEELVNITQNQK

ID SEC N°: 40

SGSGIEELVNITQNQKAPLC

30 ID SEC N°: 41

SGSGVNITQNQKAPLCNGSM

ID SEC N°: 42

SGSGQNQKAPLCNGSMVWSI

ID SEC N°: 43

35 SGSGAPLCNGSMVWSINLTA

ID SEC N°: 44

SGSGNGSMVWSINLTAGMYC

ID SEC N°: 45

SGSGVWSINLTAGMYCAALE

40 ID SEC N°: 46

SGSGNLTAGMYCAALESLIN

ID SEC N°: 47

SGSGMYCAALESLINVSGC

ID SEC N°: 48

SGSGAALESLINVSGCSAIE

ID SEC N°: 49

SGSGSLINVSGCSAIEKTQR

ID SEC N°: 50

5 SGSGVSGCSAIEKTQRMLSG

ID SEC N°: 51

SGSGSAIEKTQRMLSGFCPH

ID SEC N°: 52

SGSGKTQRMLSGFCPHKVSA

10 ID SEC N°: 53

SGSGMLSGFCPHKVSAGQFS

ID SEC N°: 54

SGSGFCPHKVSAGQFSSLHV

ID SEC N°: 55

15 SGSGKVSAGQFSSLHVRDTK

ID SEC N°: 56

SGSGGQFSSLHVRDTKIEVA

ID SEC N°: 57

SGSGSLHVRDTKIEVAQFVK

20 ID SEC N°: 58

SGSGRDTKIEVAQFVKDLLL

ID SEC N°: 59

SGSGIEVAQFVKDLLLHLKK

ID SEC N°: 60

25 SGSGQFVKDLLLHLKLFRE

ID SEC N°: 61

SGSGDLLLHLKLFREGRFN

ID SEC N°: 62

SGSGPSTALKELIEELVNIT

30 ID SEC N°: 63

SGSGLKELIEELVNITQNQK

ID SEC N°: 64

SGSGNGSMVWSINLTAGVYC

ID SEC N°: 65

35 SGSGVWSINLTAGVYCAALE

ID SEC N°: 66

SGSGNLTAGVYCAALESLIN

ID SEC N°: 67

SGSGGVYCAALESLINVSGC

ID SEC N°: 68

5 SGSGVSGCSAIEKTQRMLNG

ID SEC N°: 69

SGSGSAIEKTQRMLNGFCPH

ID SEC N°: 70

SGSGKTQRMLNGFCPHKVSA

10 ID SEC N°: 71

SGSGMLNGFCPHKVSAGQFS

ID SEC N°: 72

SGSGFCPHKVSAGQFSSLRV

ID SEC N°: 73

15 SGSGKVSAGQFSSLRVRDTK

ID SEC N°: 74

SGSGGQFSSLRVRDTKIEVA

ID SEC N°: 75

SGSGSLRVRDTKIEVAQFVK

20 ID SEC N°: 76

SGSGRDTKIEVAQFVKDLLV

ID SEC N°: 77

SGSGIEVAQFVKDLLVHLKK

ID SEC N°: 78

25 SGSGQFVKDLLVHLKLFRE

ID SEC N°: 79

SGSGDLLVHLKLFREGQFN

ID SEC N°: 80

QFVKDLLLHLKLFRE

30 ID SEC N°: 81

DLLLHLKLFREGQFN

ID SEC N°: 82

QFVKDLLVHLKLFRE

ID SEC N°: 83

35 DLLVHLKLFREGQFN

ID SEC N°: 84

DLLLHLKLFRE

ID SEC N°: 85

DLLVHLKLFRE

ID SEC N°: 86

5 GATGAAGCTTGCCACCATGAAATGCAGCTGGGTCATC

ID SEC N°: 87

GATGGACTAGTGTTTCCTTGACCCCAGTA

ID SEC N°: 88

GATGAAGCTTGCCACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTG

10 ID SEC N°: 89

GATGCGTACGTTTGATTCCAGCTTGGTGCC

ID SEC N°: 90

SPVPPSTALKELIEELVNITQNQKAPLCN

GSMVWSINLTAGVYCAALESLINVSGCSA

15 IEKTQRMLNGFCPHKVSAGQFSSLRVRDT

KIEVAQFVKDLLVHLKLFREGQFN

ID SEC N°: 91

20 AGCCCTGTGCCTCCCTCTACAGCCCTCAAGGAGCTCATTGAGGAGCTGGTCAACATCACCCAGAACCAGAAGG  
CCCCGCTCTGCAATGGCAGCATGGTGTGGAGCATCAACCTGACAGCTGGCGTGTACTGTGCAGCCCTGGAATC  
CCTGATCAACGTGTCAGGCTGCAGTGCCATCGAGAAGACCCAGAGGATGCTGAACGGATTCTGCCCGCACAAG  
GTCTCAGCTGGGCAGTTTTCCAGCTTGCCTGTCCGAGACACCAAATCGAGGTGGCCAGTTTGTAAAGGACCT  
GCTCGTACATTTAAAGAACTTTTTTCGCGAGGGACAGTTCAACTGA

ID SEC N°: 92

25 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFYIKDTYMHVWRQAPGQGLEWMGTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADEST  
STAYMELSSLRSEDVAVYYCARSYDDYHYDDYYAMDYWGQGLVTVSSG

ID SEC N°: 93

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQNVHNGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYKISDRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI  
SRVEADDVGIYYCFQGSHVPWTFGQGTKLEIK

ID SEC N°: 94

30 SGSGKDLLLHLKLFREG

ID SEC N°: 95

SGSGDLLLHLKLFREG

ID SEC N°: 96

SGSGLLLHLKLFREG

35 ID SEC N°: 97

SGSGLLHLKLFREG

ID SEC N°: 98

SGSGLHLKLFREG

ID SEC N°: 99

SGSGHLKRLFREG

ID SEC N°: 100

SGSGLKRLFREG

ID SEC N°: 101

5 SGSGKRLFREG

ID SEC N°: 102

SGSGKLFREG

ID SEC N°: 103

SGSGLFREG

10 ID SEC N°: 104

SGSGFREG

ID SEC N°: 105

SGSGKDLLHLKRLFRE

ID SEC N°: 106

15 SGSGKDLLHLKLFRR

ID SEC N°: 107

SGSGKDLLHLKRLF

ID SEC N°: 108

SGSGKDLLHLKLL

20 ID SEC N°: 109

SGSGKDLLHLKK

ID SEC N°: 110

SGSGKDLLHLK

ID SEC N°: 111

25 SGSGKDLLHL

ID SEC N°: 112

SGSGKDLLH

ID SEC N°: 113

SGSGKDLLL

30 ID SEC N°: 114

SGSGKDLL

ID SEC N°: 115

SGSGKDLLVHLKRLFREG

ID SEC N°: 116

35 SGSGDLLVHLKRLFREG

ID SEC N°: 117

SGSGLLVHLKCLFREG

ID SEC N°: 118

SGSGLVHLKCLFREG

ID SEC N°: 119

5 SGSVHLKCLFREG

ID SEC N°: 120

SGSGDLLVHLKCLFRE

ID SEC N°: 121

SGSGDLLVHLKCLFR

10 ID SEC N°: 122

SGSGDLLVHLKCLF

ID SEC N°: 123

SGSGDLLVHLKCL

ID SEC N°: 124

15 SGSKDLLVHLKCL

ID SEC N°: 125

SGSKDLLVHLK

ID SEC N°: 126

SGSKDLLVHL

20 ID SEC N°: 127

SGSKDLLVH

ID SEC N°: 128

SGSKDLLV

ID SEC N°: 129

25 QFVKDLLLHLKCLFREGRFN

ID SEC N°: 130

QFVKDLLLHAKCLFREGRFN

ID SEC N°: 131

QFVKDLLLHLAKCLFREGRFN

30 ID SEC N°: 132

QFVKDLLLHLKALFREGRFN

ID SEC N°: 133

QFVKDLLLHLKCAFREGRFN

ID SEC N°: 134

35 QFVKDLLLHLKCLAREGRFN

ID SEC N°: 135

QFVKDLLLLHLKKLFAEGRFN

ID SEC N°: 136

QFVKDLLLLHLKKLFRAGRFN

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a hIL-13 e inhibe la interacción entre hIL-13 y hIL-13R y comprende la siguiente CDRH3:  
ID SEC N°: 3.
- 5 2. Un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las siguientes CDR:  
CDRH1: ID SEC N°: 1  
CDRH2: ID SEC N°: 2  
CDRH3: ID SEC N°: 3
- 10 CDRL1: ID SEC N°: 4  
CDRL2: ID SEC N°: 5 y  
CDRL3: ID SEC N°: 6
3. Un anticuerpo terapéutico o el fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo intacto.
- 15 4. Un anticuerpo terapéutico o el fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el anticuerpo es de rata, ratón, primate o humano.
5. Un anticuerpo murino de la reivindicación 4 que comprende un dominio VH de ID SEC N°: 7 y un dominio VL de ID SEC N°: 8.
- 20 6. Un anticuerpo terapéutico de la reivindicación 4 en el que el anticuerpo es humanizado o es un anticuerpo quimérico.
7. Un anticuerpo humanizado de la reivindicación 6 que comprende un dominio VH de ID SEC N°: 11 y un dominio VL de ID SEC N°: 15.
8. Un anticuerpo humanizado de la reivindicación 6 que comprende un dominio VH de ID SEC N°: 12 y un dominio VL de ID SEC N°: 15.
- 25 9. Un anticuerpo humanizado de la reivindicación 6 que comprende un dominio VH de ID SEC N°: 13 y un dominio VL de ID SEC N°: 15.
10. Un anticuerpo humanizado de la reivindicación 6 que comprende un dominio VH de ID SEC N°: 14 y un dominio VL de ID SEC N°: 15.
- 30 11. Un anticuerpo humanizado de la reivindicación 6 que comprende un dominio VH de ID SEC N°: 11 y un dominio VL de ID SEC N°: 16.
12. Un anticuerpo humanizado de la reivindicación 6 que comprende un dominio VH de ID SEC N°: 12 y un dominio VL de ID SEC N°: 16.
13. Un anticuerpo humanizado de la reivindicación 6 que comprende un dominio VH de ID SEC N°: 13 y un dominio VL de ID SEC N°: 16.
- 35 14. Un anticuerpo humanizado de la reivindicación 6 que comprende un dominio VH de ID SEC N°: 14 y un dominio VL de ID SEC N°: 16.
15. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 14 en el que el anticuerpo comprende una región humana constante.
16. El anticuerpo de la reivindicación 15 en el que el anticuerpo comprende una región constante de un isotipo IgG.
- 40 17. El anticuerpo de la reivindicación 16 en el que el anticuerpo es IgG1 ó IgG4.
18. Un anticuerpo humanizado de la reivindicación 6 que comprende una cadena pesada de ID SEC N°: 18 y una cadena ligera de ID SEC N°: 22.

19. Un anticuerpo humanizado de la reivindicación 6 que comprende una cadena pesada de ID SEC N°: 19 y una cadena ligera de ID SEC N°: 22.
20. Un anticuerpo humanizado de la reivindicación 6 que comprende una cadena pesada de ID SEC N°: 20 y una cadena ligera de ID SEC N°: 22.
- 5 21. Un anticuerpo humanizado de la reivindicación 6 que comprende una cadena pesada de ID SEC N°: 21 y una cadena ligera de ID SEC N°: 22.
22. Un anticuerpo humanizado de la reivindicación 6 que comprende una cadena pesada de ID SEC N°: 18 y una cadena ligera de ID SEC N°: 23.
- 10 23. Un anticuerpo humanizado de la reivindicación 6 que comprende una cadena pesada de ID SEC N°: 19 y una cadena ligera de ID SEC N°: 23.
24. Un anticuerpo humanizado de la reivindicación 6 que comprende una cadena pesada de ID SEC N°: 20 y una cadena ligera de ID SEC N°: 23.
25. Un anticuerpo humanizado de la reivindicación 6 que comprende una cadena pesada de ID SEC N°: 21 y una cadena ligera de ID SEC N°: 23.
- 15 26. Un fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en el que el fragmento es un Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, dianticuerpo, trianticuerpo, tetranticuerpo, minianticuerpo, minicuerpo, VH aislado, VL aislado.
27. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 25 que comprende una región Fc mutada tal que dicho anticuerpo tiene una ADCC y/o una activación del complemento reducidas.
- 20 28. Una célula hospedadora transformada o transfectada recombinante que comprende un primer y un segundo vector, comprendiendo dicho primer vector un polinucleótido que codifica una cadena pesada de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes y comprendiendo dicho segundo vector un polinucleótido que codifica una cadena ligera de un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
29. La célula hospedadora de la reivindicación 28 en la que el primer vector comprende un polinucleótido de ID SEC N°: 7 y un segundo vector comprende un polinucleótido de ID SEC N°: 8.
- 25 30. La célula hospedadora de la reivindicación 29 en la que el primer vector comprende un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en ID SEC N°: 26, ID SEC N°: 27, ID SEC N°: 28, ID SEC N°: 29, ID SEC N°: 32, ID SEC N°: 33, ID SEC N°: 34, ID SEC N°: 35 y un segundo vector que comprende un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en: ID SEC N°: 15, ID SEC N°: 16, ID SEC N°: 36, ID SEC N°: 37.
31. La célula hospedadora de una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 30 en la que la célula es eucariota.
- 30 32. La célula hospedadora de la reivindicación 31 en la que la célula es de mamífero.
33. La célula hospedadora de la reivindicación 31 en la que la célula es CHO o NS0.
34. Un procedimiento para la producción de un anticuerpo terapéutico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27 cuyo procedimiento comprende la etapa de cultivo de una célula hospedadora de una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 33 en un medio de cultivo sin suero.
- 35 35. El procedimiento de la reivindicación 34 en el que dicho anticuerpo se secreta por dicha célula hospedadora en dicho medio de cultivo.
36. El procedimiento de la reivindicación 35 en el que dicho anticuerpo se purifica adicionalmente hasta al menos el 95% o más, respecto al dicho anticuerpo contenido en el medio de cultivo.
- 40 37. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 45 38. Un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno seleccionados del grupo que consiste en: asma alérgica, asma grave, asma difícil, asma inestable, asma nocturna, asma premenstrual, asma resistente a esteroides, asma dependiente de esteroides, asma inducida por aspirina, asma de inicio en el adulto, asma pediátrica, dermatitis atópica, rinitis alérgica, enfermedad de Crohn, EPOC, enfermedades o trastornos fibróticos tales como fibrosis pulmonar idiopática, esclerosis sistémica progresiva, fibrosis hepática, granulomas hepáticos, esquistosomiasis, leishmaniasis, y enfermedades de la regulación del ciclo celular tal como enfermedad de Hodgkin, leucemia linfocítica crónica de las células B.
39. Uso de un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de

- las reivindicaciones 1 a 27 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno seleccionados del grupo que consiste en: asma alérgica, asma grave, asma difícil, asma inestable, asma nocturna, asma premenstrual, asma resistente a esteroides, asma dependiente de esteroides, asma inducida por aspirina, asma de inicio en el adulto, asma pediátrica, dermatitis atópica, rinitis alérgica, enfermedad de Crohn, EPOC, enfermedades o trastornos fibróticos tales como fibrosis pulmonar idiopática, esclerosis sistémica progresiva, fibrosis hepática, granulomas hepáticos, esquistosomiasis, leishmaniasis, y enfermedades de la regulación del ciclo celular tal como enfermedad de Hodgkin, leucemia linfocítica crónica de las células B.
- 5 40. Un anticuerpo terapéutico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes que se une específicamente a hIL-13 y tiene una constante de disociación  $k_{off}$  en el intervalo de  $1,4 \times 10^{-4}$  a  $8,22 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ .
- 10 41. Un anticuerpo terapéutico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27 y un anticuerpo monoclonal anti-IL-4 tal como pascolizumab para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno seleccionados del grupo que consiste en: asma alérgica, asma grave, asma difícil, asma inestable, asma nocturna, asma premenstrual, asma resistente a esteroides, asma dependiente de esteroides, asma inducida por aspirina, asma de inicio en el adulto, asma pediátrica, dermatitis atópica, rinitis alérgica, enfermedad de Crohn, EPOC, enfermedades o trastornos fibróticos tales como fibrosis pulmonar idiopática, esclerosis sistémica progresiva, fibrosis hepática, granulomas hepáticos, esquistosomiasis, leishmaniasis, y enfermedades de la regulación del ciclo celular tal como enfermedad de Hodgkin, leucemia linfocítica crónica de las células B.
- 15 42. Uso de un anticuerpo terapéutico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27 y un anticuerpo monoclonal anti-IL-4 tal como pascolizumab en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno seleccionados del grupo que consiste en: asma alérgica, asma grave, asma difícil, asma inestable, asma nocturna, asma premenstrual, asma resistente a esteroides, asma dependiente de esteroides, asma inducida por aspirina, asma de inicio en el adulto, asma pediátrica, dermatitis atópica, rinitis alérgica, enfermedad de Crohn, EPOC, enfermedades o trastornos fibróticos tales como fibrosis pulmonar idiopática, esclerosis sistémica progresiva, fibrosis hepática, granulomas hepáticos, esquistosomiasis, leishmaniasis, y enfermedades de la regulación del ciclo celular tal como enfermedad de Hodgkin, leucemia linfocítica crónica de las células B.
- 20 43. El uso de la reivindicación 41 ó 42 en el que el anticuerpo monoclonal anti-IL-4 es administrado simultánea, secuencialmente o por separado con el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27.
- 25 44. El uso de las reivindicaciones 41 a 43 en el que el anticuerpo anti-IL-4 es pascolizumab.
- 30 45. Una composición farmacéutica que comprende un primer anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27 y un segundo anticuerpo en el que dicho segundo anticuerpo es un anticuerpo anti-IL-4, tal como pascolizumab y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Figura 1

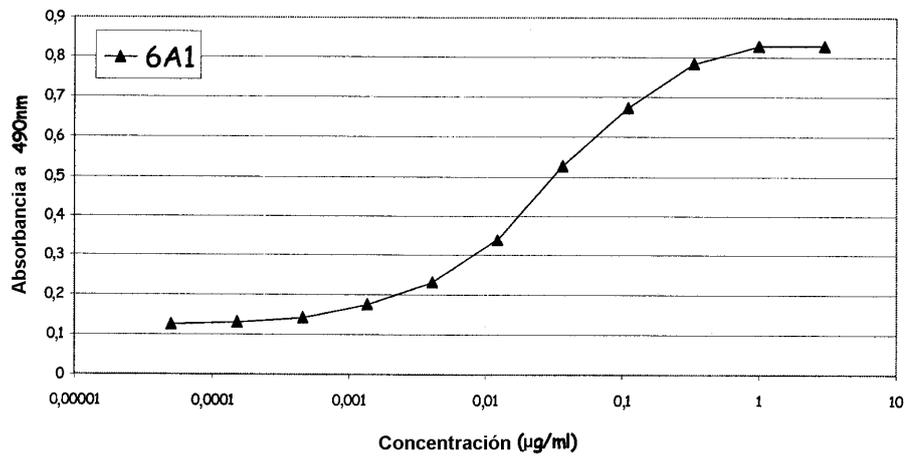


Figura 2 a

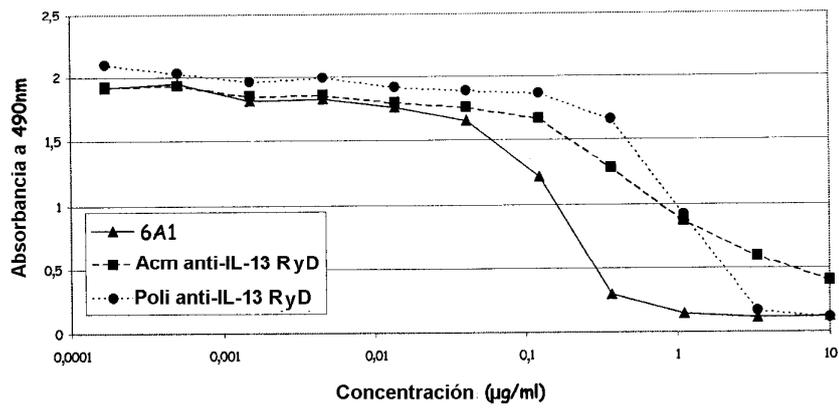


Figura 2b

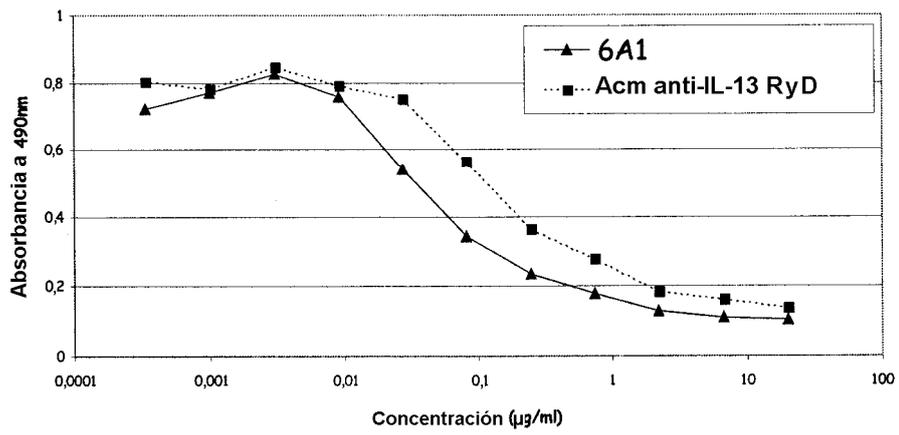


Figura 3

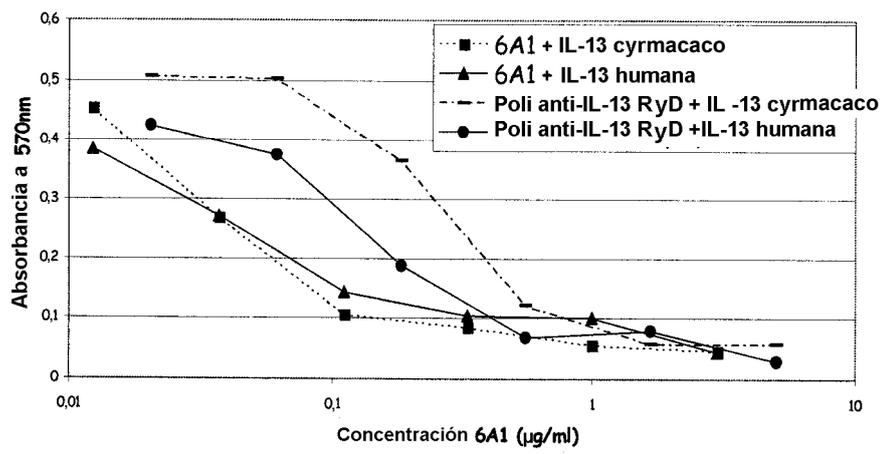


Figura 4

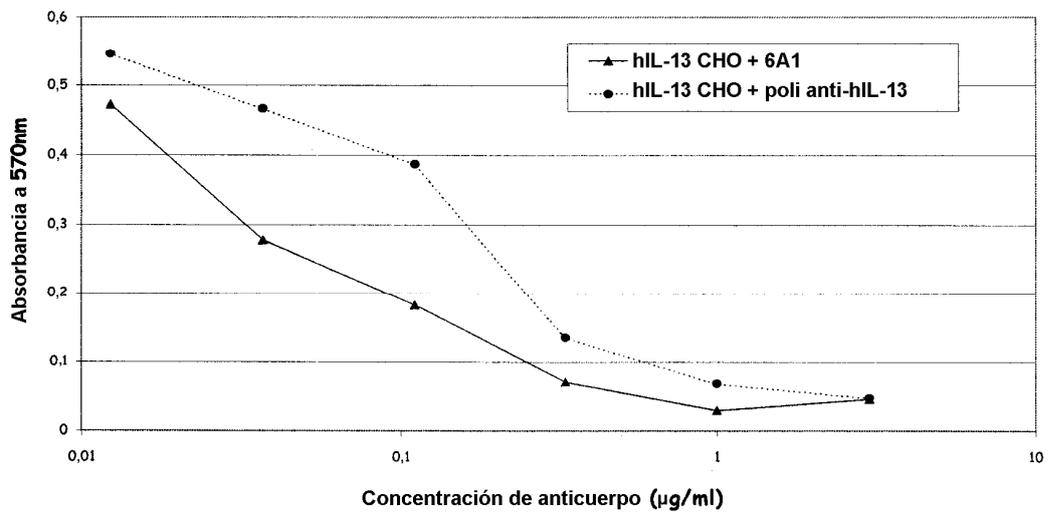


Figura 5

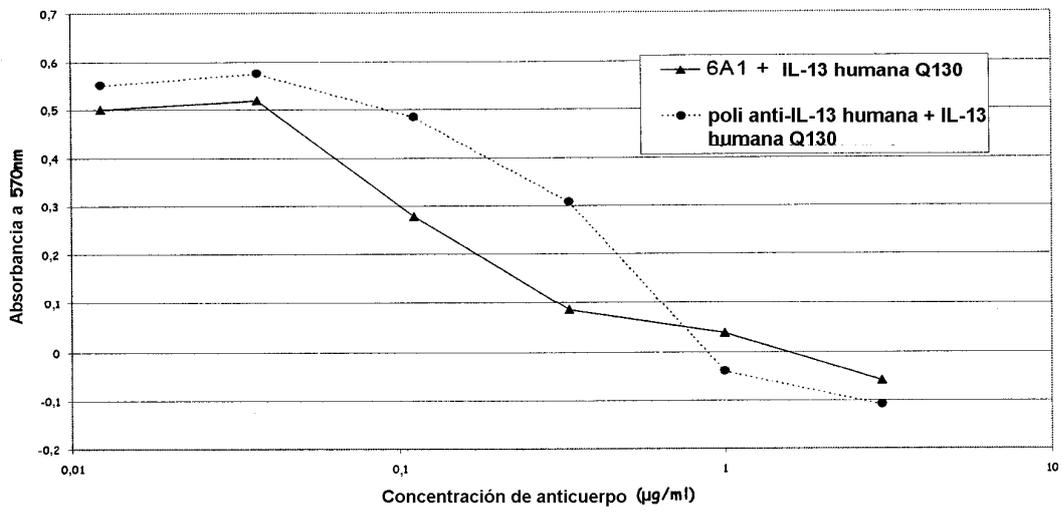


Figura 6

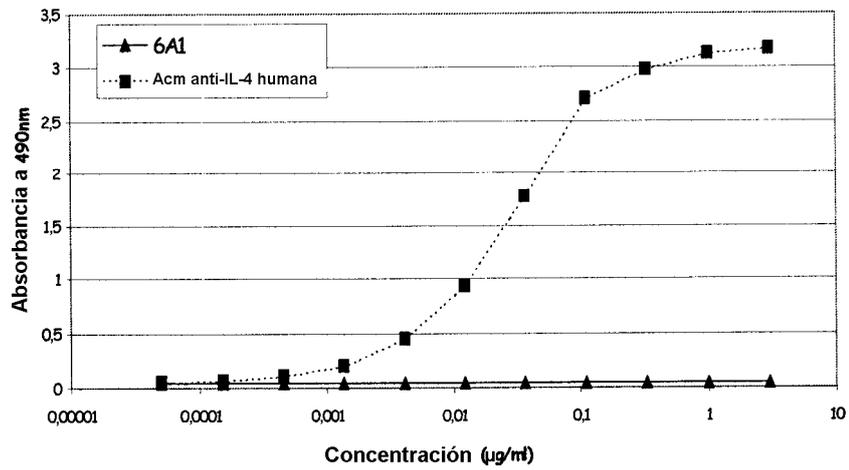


Figura 7

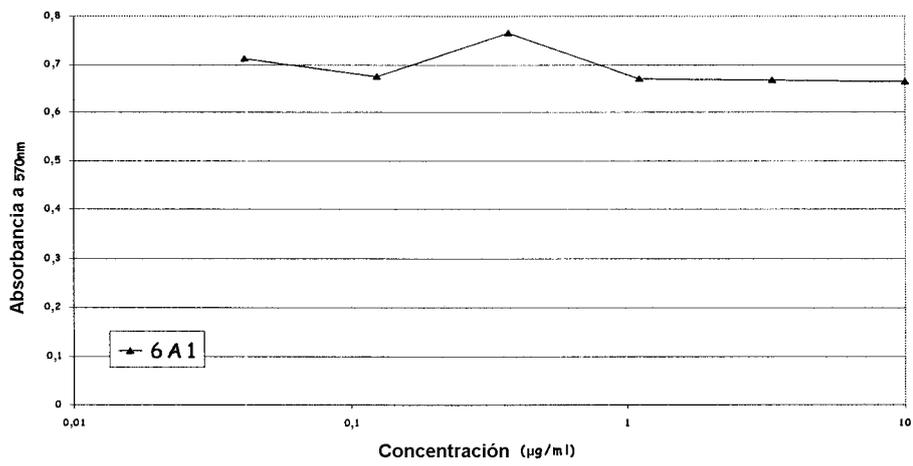


Figura 8

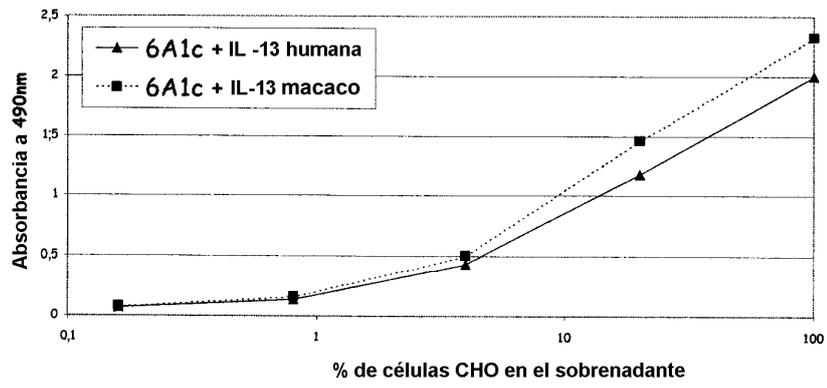


Figura 9

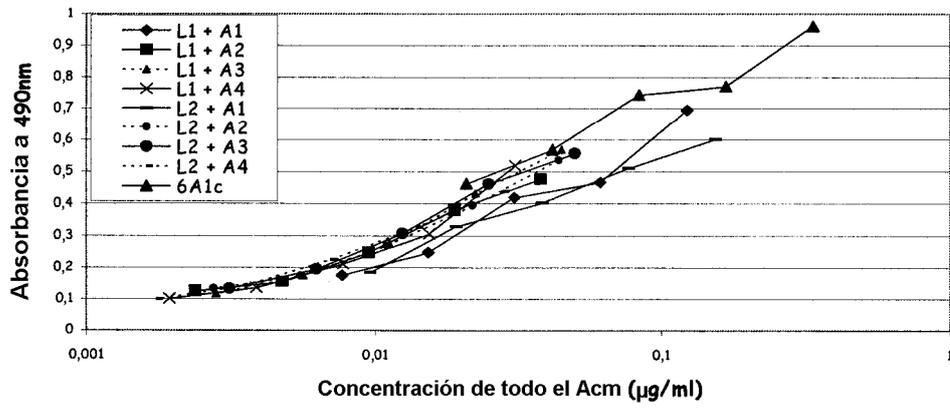


Figura 10a

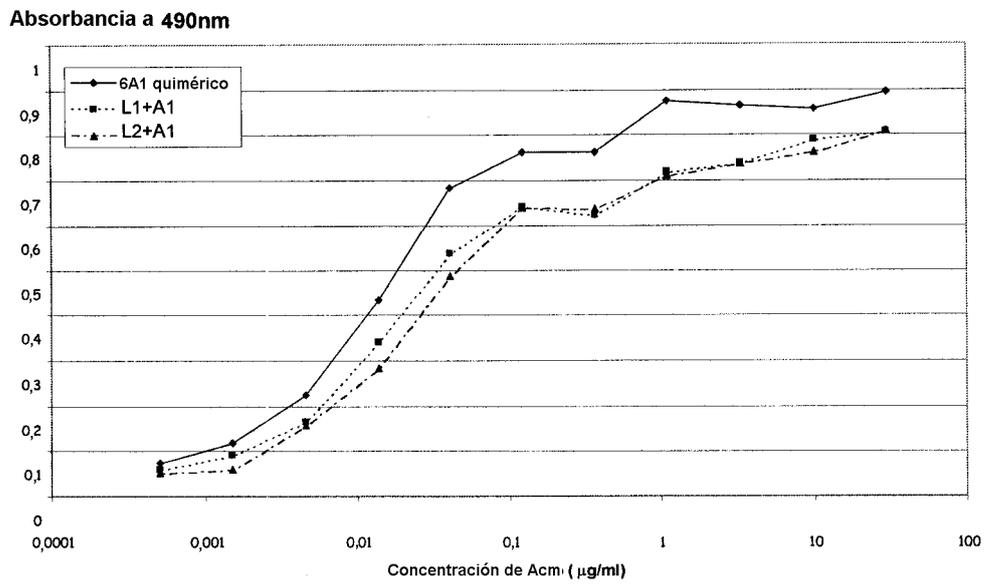


Figura 10b

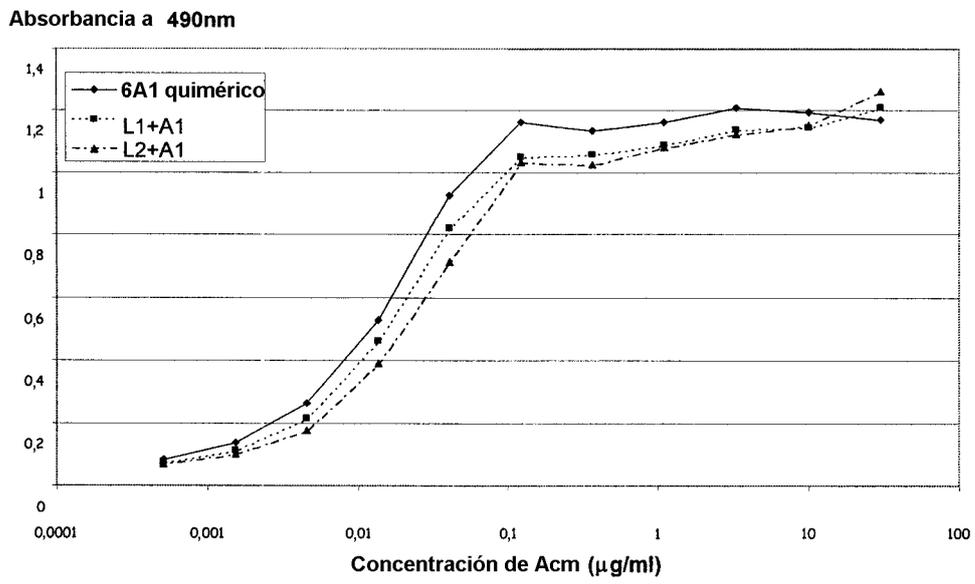


Figura 11

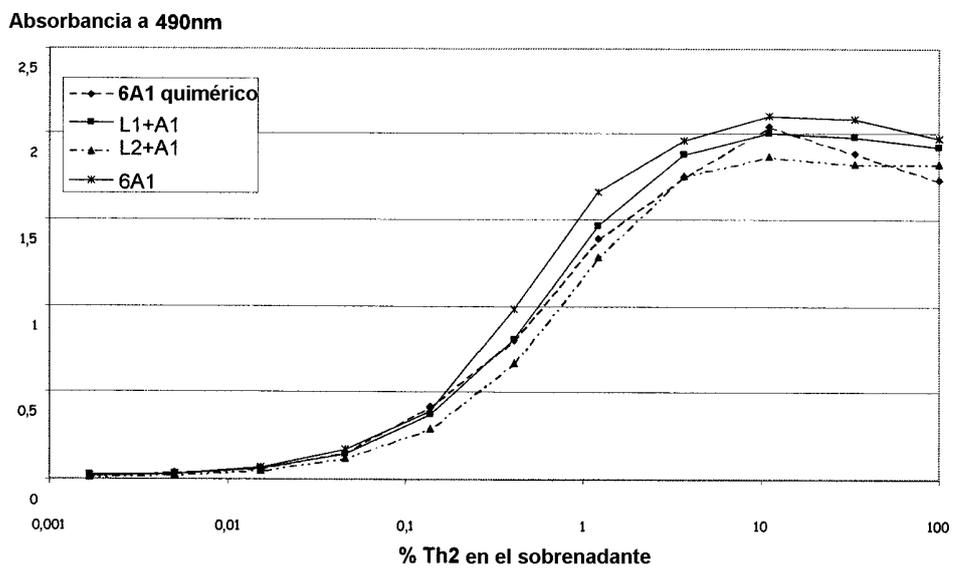


Figura 12a

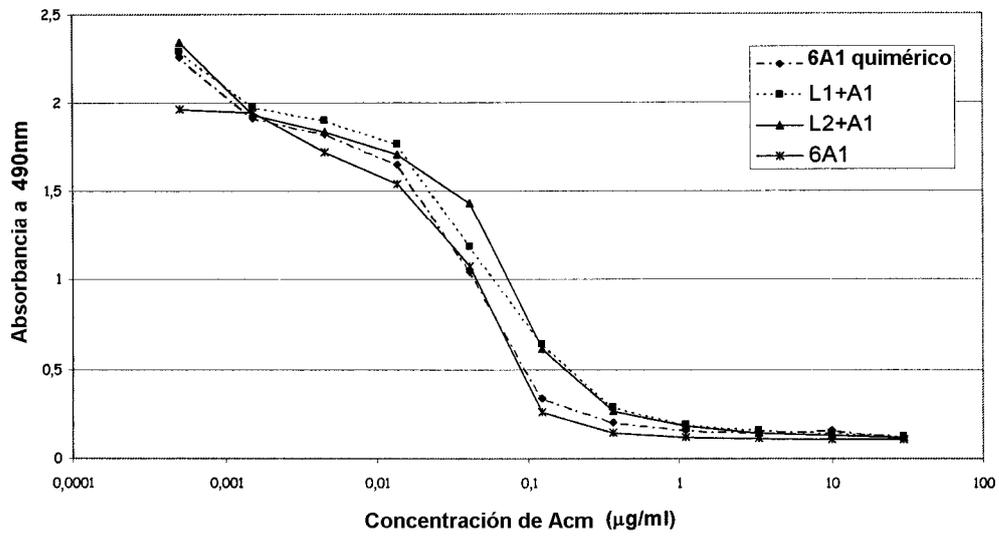


Figura 12b

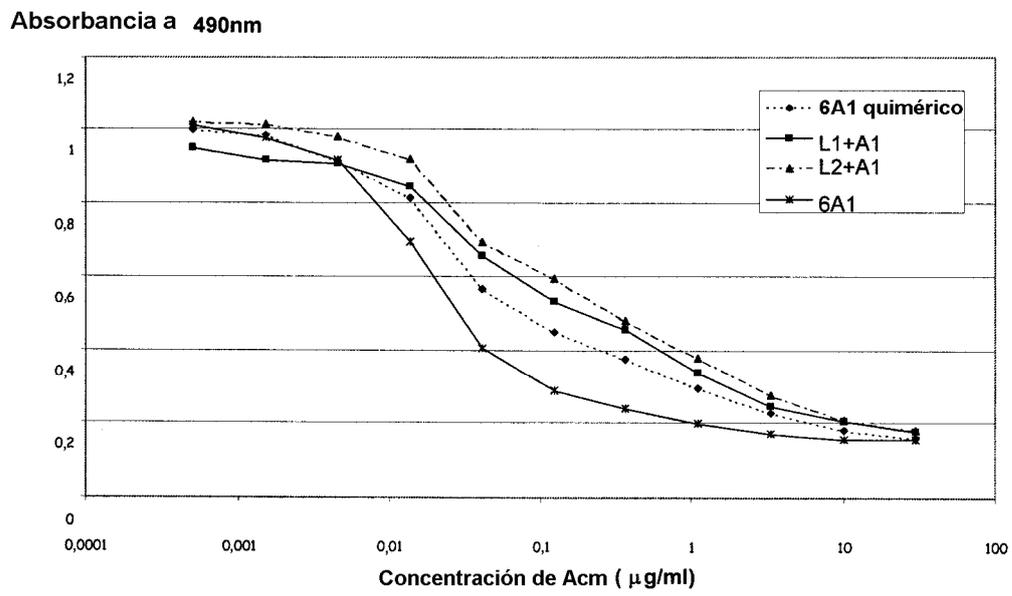


Figura 13a

Absorbancia a 570nm

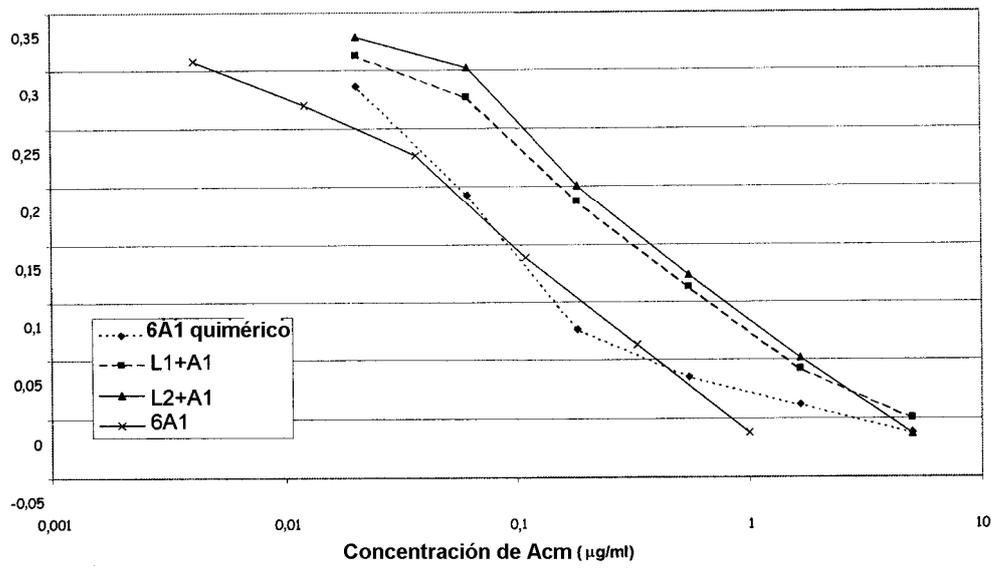


Figura 13b

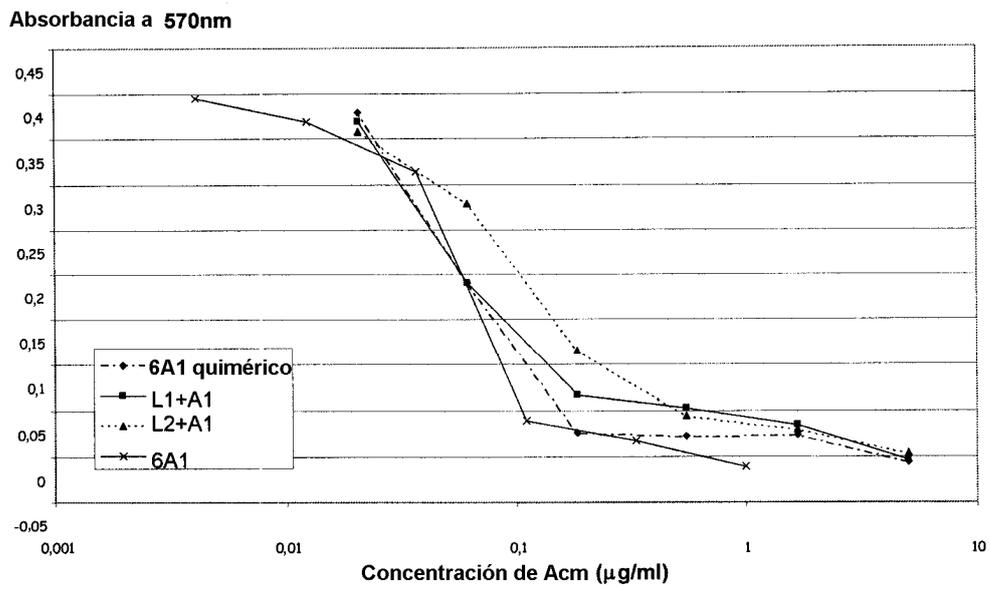


Figura 13c

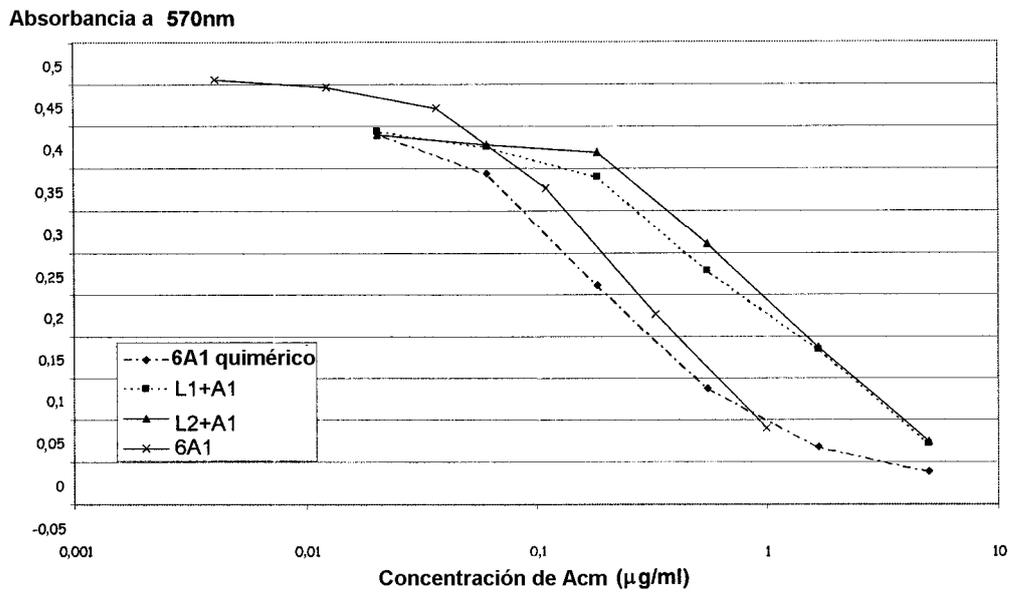


Figura 13d

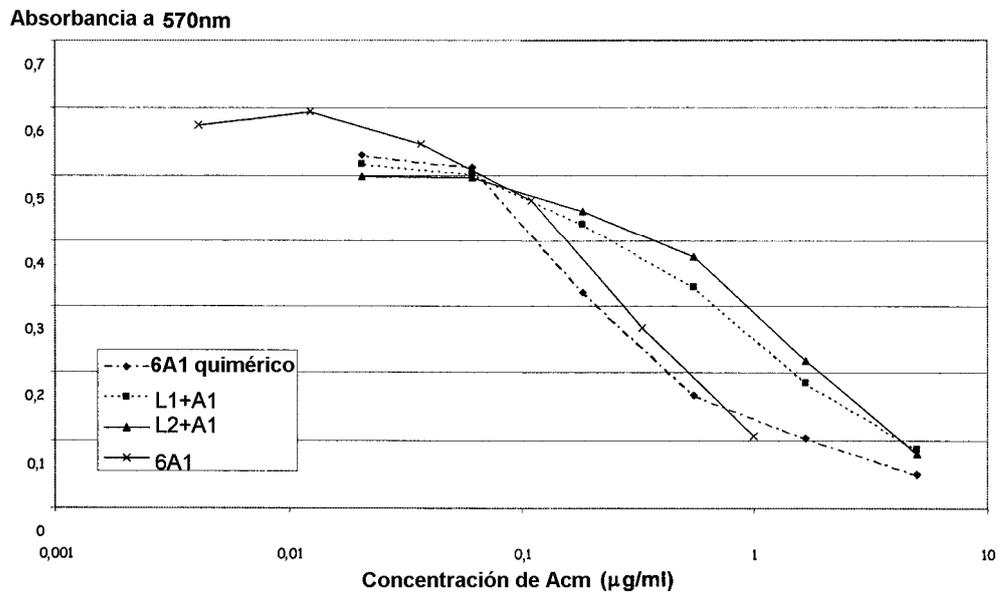


Figura 14a

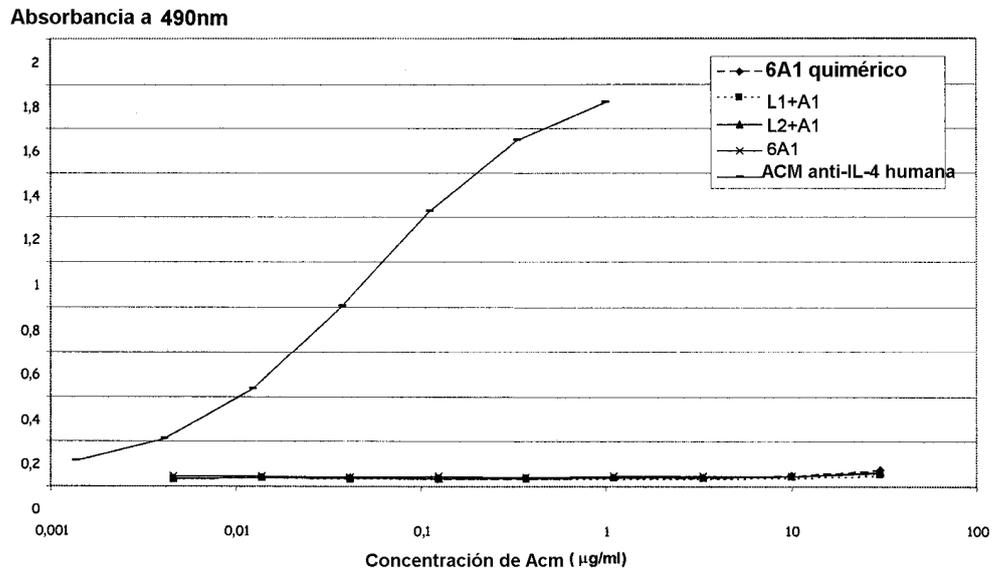


Figura 14b

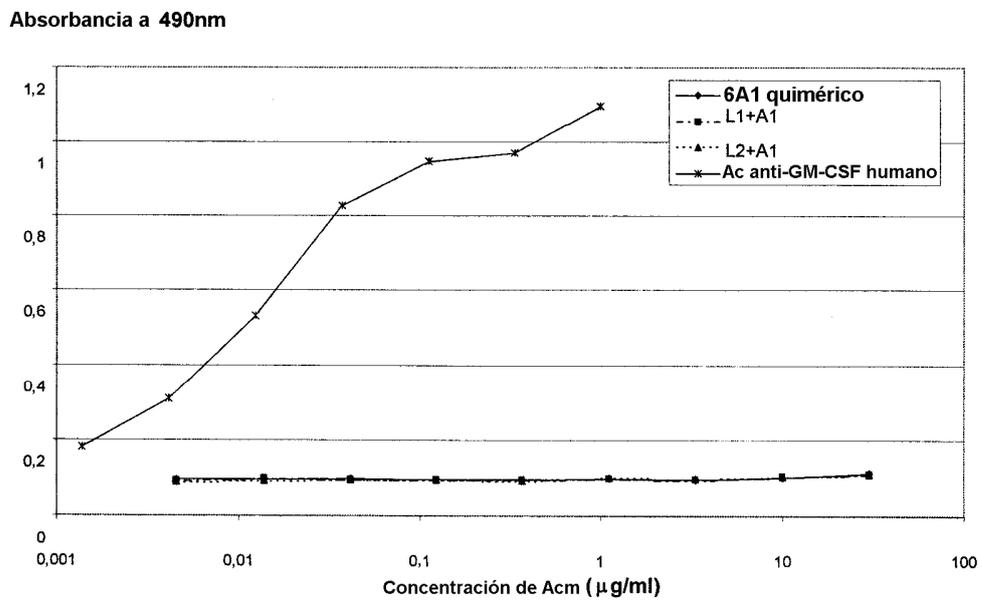


Figura 14c

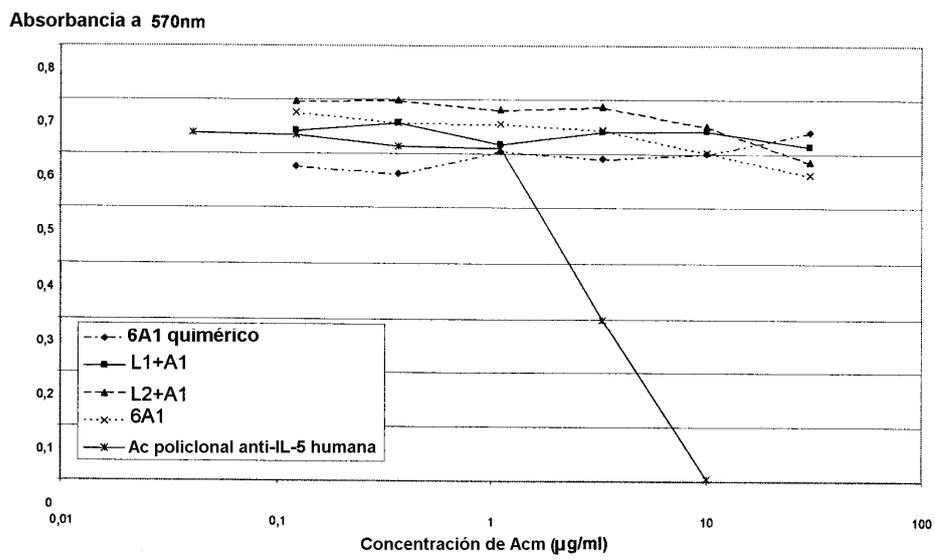


Figura 15

Absorbancia media a 490 nm

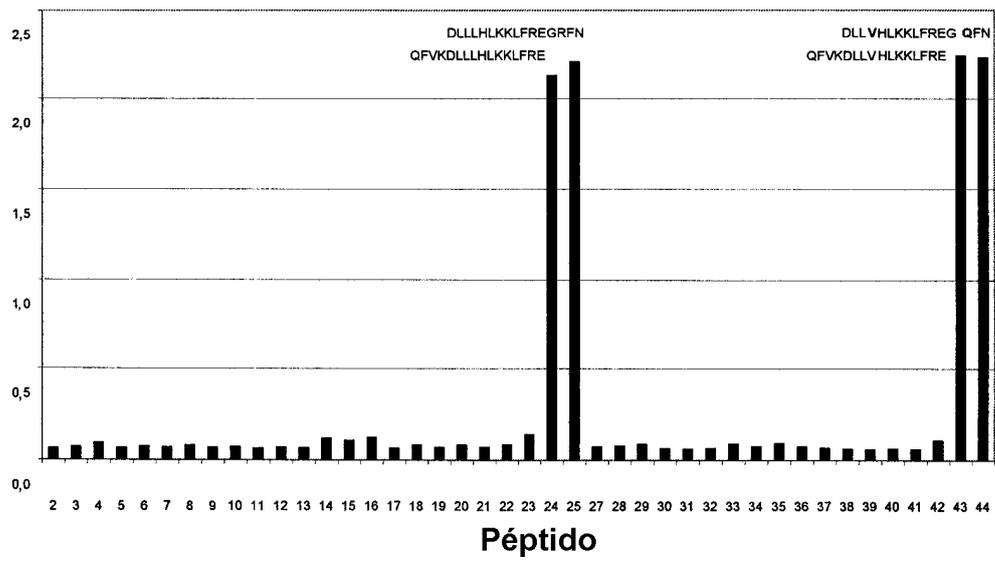






Figura 17a

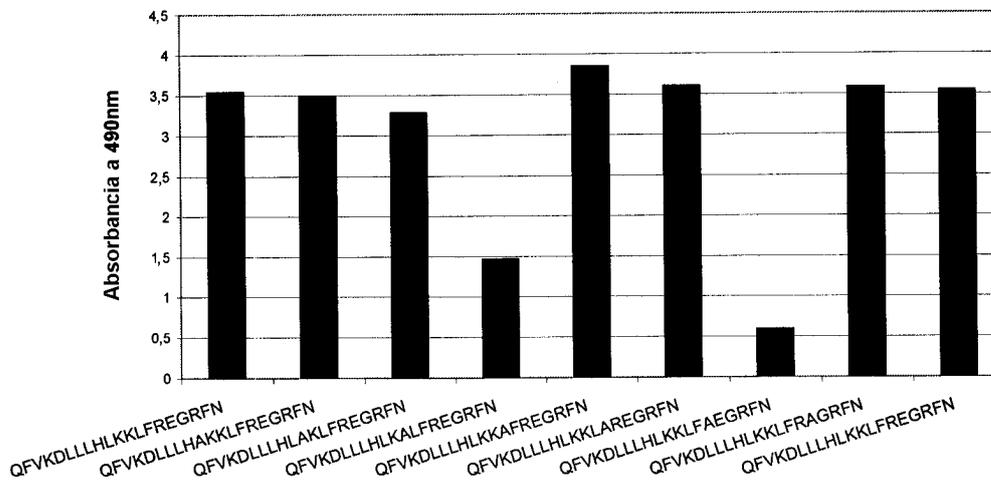


Figura 17b

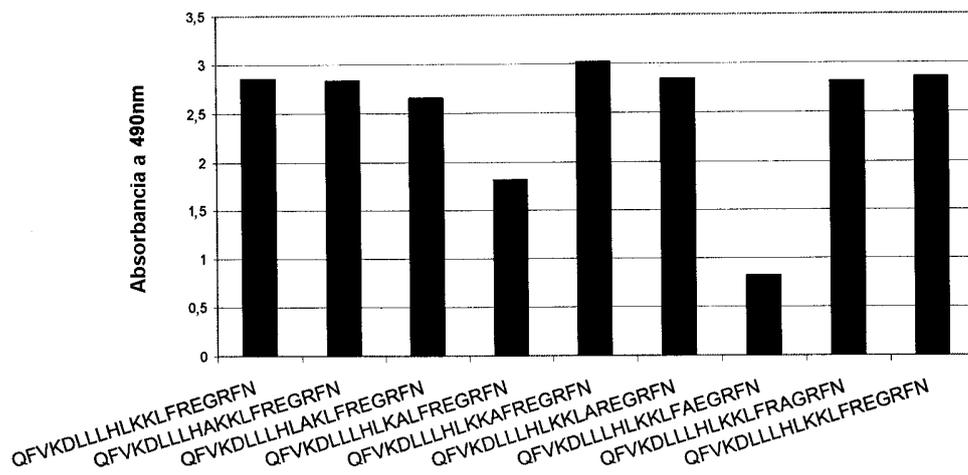


Figura 17c

Absorbancia a 490nm

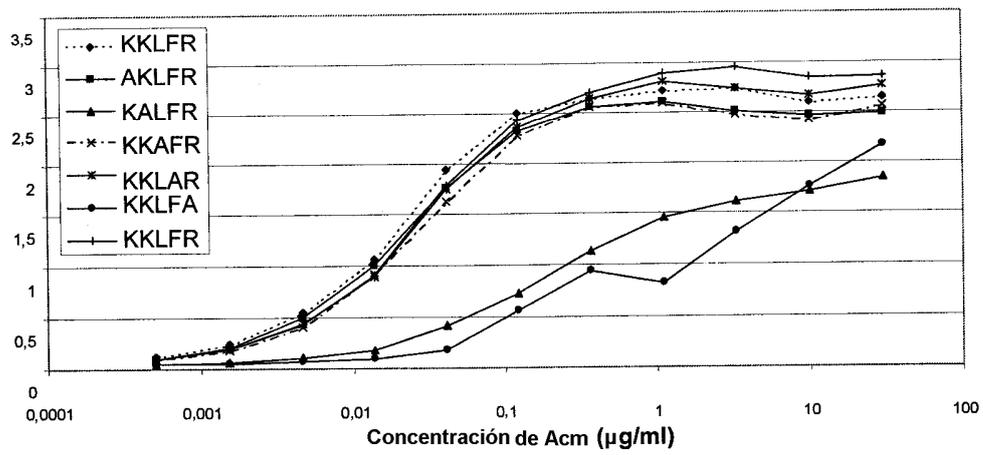


Figura 17 d

A

