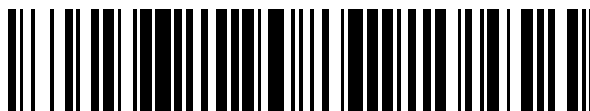


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 038**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04815562 .6**
96 Fecha de presentación: **23.12.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1703893**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.09.2006**

54 Título: **Nuevos anticuerpos Anti-IL 13 y usos de los mismos**

30 Prioridad:
23.12.2003 US 532130 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.07.2012

73 Titular/es:
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US

72 Inventor/es:
FUNG, Sek, Chung;
MOYLE, Matthew;
LU, Mason;
YAN, Changning;
SINGH, Sanjaya y
HUANG, Dan

74 Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

ES 2 385 038 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

Nuevos anticuerpos Anti-IL13 y usos de los mismos

Antecedentes de la invención

5 La interleucina (IL)-13 es una citocina de la subclase 2 de células T coadyuvantes (Th2) pleiotrópica. Al igual que IL4, IL13 pertenece a la familia de citocinas de tipo I que comparten la estructura terciaria definida por un núcleo de haz hidrófobo 4a-helicoidal. IL13 tiene aproximadamente una homología de secuencia de aminoácidos del 30 % con IL4 y comparte muchas de las propiedades de IL4 (Wynn, *Ann. Rev. Immunol.*, 21: 425 (2003)). La similitud funcional de IL4 e IL13 se atribuye al hecho de que IL13 puede unir cadena alfa del receptor de IL4 (IL4R- α) de forma subsecuente a su unión a cadena-1 alfa de receptor de IL13 (IL13R α) (Hershey, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 111: 677 (2003)). IL4R α se activa por IL4 e IL13 dando como resultado fosforilación de STAT6 dependiente de Jak1. Ambas IL4 e IL13 promueven la proliferación de células B e inducen cambios de clase a IgG4 e IgE en combinación con coestimulación CD40/CD40L (Punnonen y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 90: 3730 (1993), Oettgen y cols., *J. Allergy Clin. Immunol.*, 107: 429 (2001)). Se mostró que un anticuerpo anti-IL-13 de ser humano (clon JES 10-5A2) neutraliza el 50 % de la bioactividad de IL-13 a 50 ng/ml (Campbell y cols., *FASEB Journal*, 18: 329-331 (2003)).

15 Sin embargo, a diferencia de IL4, IL13 no está implicada en la diferenciación de células T indiferenciadas en células Th2 (Zurawski y cols., *Immunol. Today*, 15: 19 (1994)). IL13 regula al alza Fc γ RI y así ayuda en la preparación con IgE de los mastocitos (de Vries, *Allergy Clin. Immunol.* 102: 165 (1998). En los monocitos/macrófagos, IL13 regula al alza la expresión de de CD23 y de los antígenos de clase I y de clase II de MHC, regula a la baja la expresión de Fc γ y de CD14 e inhibe la citotoxicidad dependiente de anticuerpo (de Waal Malefyt y cols., *J. Immunol.*, 151: 6370 (1993), Chomarat y cols., *Int. Rev. Immunol.*, 17: 1 (1998)). IL13, pero no IL4, promueve la supervivencia, la activación y la atracción de eosinófilos (Horie y cols., *Intern. Med.*, 36: 179 (1997), Luttmann y cols., *J. Immunol.* 157: 1678 (1996), Pope y cols., *J. Allergy Clin. Immunol.*, 108: 594 (2001). IL13 también manifiesta importantes funciones de células no hepatopoyéticas, tales como células de músculo liso, células epiteliales, células endoteliales y células de fibroblastos. IL13 potencia proliferación y contracciones inducidas colinérgicamente de músculos lisos (Wills-Karp, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 107: 9 (2001)). En las células epiteliales IL13 es un potente inductor de la producción de quimiocinas (Li y cols., *J. Immunol.*, 162: 2477 (1999), altera diferenciación mucociliar (Laoukili y cols., *J. Clin. Invest.*, 108: 1.817 (2001), disminuye la frecuencia de batido ciliar de células epiteliales ciliadas (Laoukili y cols., *J. Clin. Invest.*, 108: 1.817 (2001) y da como resultado la metaplasia de células caliciformes (Zhu y cols., *J. Clin. Invest.*, 103: 779 (1999), Grunig y cols., *Science*, 282: 2261 (1998)). En las células endoteliales IL13 es un potente inductor de la molécula de adhesión de células vasculares 1 (VCAM-1) que es importante para la atracción de eosinófilos (Bochner y cols., *J. Immunol.*, 154: 799 (1995)). En fibroblastos dérmicos humanos IL13 induce síntesis de colágeno de tipo 1 en fibroblastos dérmicos humanos (Roux y cols., *J. Invest. Dermatol.*, 103: 444 (1994)).

Aunque IL13 y IL4 comparten ciertas similitudes funcionales, los estudios en modelos animales de la enfermedad y en ratones con genes inactivados demostraron que IL13 posee funciones efectoras únicas distintas de IL4 y proporciona evidencia de peso de que IL13, independientemente de otras citocinas de Th2, es necesaria y suficiente para inducir todas las características de asma alérgica (Wills-Kaip y cols. *Science* 282: 2258 (1998), Walter y cols. *J. Immunol.* 167: 4668 (2001)). IL13 puede desempeñar un papel más significativo que otras citocinas de Th2 en funciones efectoras asociadas con los síntomas de asma (Corry, *Curr. Opin. Immunol.*, 11: 610 (1999)). Esta afirmación está apoyada en la enfermedad humana por una fuerte asociación entre niveles de IL13 y polimorfismos genéticos en el gen de IL13 y la enfermedad correlaciona (Wills-Karp. y cols. *Respir. Res.* 1:19 (2000); Vercelli y cols., *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2: 389 (2002); He y cols., *Genes Immunol.*, 4: 385 (2003), Arima y cols., *J. Allergy Clin. Immunol.*, 109: 980 (2003), Liu y cols., *J. Clin. Allergy Immunol.*, 112: 382 (2003)). Los datos sugieren que IL13 induce características de la respuesta alérgica por medio de sus acciones en el epitelio mucosal y las células musculares lisas, más que por sus rutas tradicionales que implican eosinófilos y eventos mediados por IgE (Wills-Karp y cols., *Sci.*, 282: 2258 (1998)).

El asma se describe como una enfermedad pulmonar crónica que implica la inflamación, la hiperresponsividad y la obstrucción de las vías respiratorias. Fisiológicamente, la hiperresponsividad de las vías respiratorias está documentada por el flujo de aire bronquial después de broncoprovocación con metacolina o histamina. Otros desencadenantes que provocan obstrucciones de las vías respiratorias incluyen aire frío, ejercicio, infección respiratoria superior vírica, fumar cigarrillos y alérgenos respiratorios. La provocación bronquial con alérgeno induce un decrecimiento mediado por inmunoglobulinas E (IgE) de fase temprana rápido en el flujo de aire bronquial seguido en muchos pacientes por una reacción mediada de fase tardía con un decrecimiento en flujo de aire bronquial durante 4-8 horas. La respuesta temprana está causada por la liberación aguda de sustancias inflamatorias, tales como histamina, PGD₂, leucotrieno, triptasa y factor de activación plaquetaria (PAF) mientras que la respuesta tardía está causada por citocinas pro-inflamatorias sintetizadas de novo (por ejemplo TNF α , IL4, IL13) y quimiocinas (por ejemplo, MCP-1 y MIP-1 α) (Busse y cols. En: *Allergy: Principles and Practice*, Ed. Middlest \ddot{u} dn, 1173 (1998)). En pacientes asmáticos crónicos, los síntomas pulmonares persistentes están mediados por la respuesta intensificada de células Th2. Se cree que las citocinas Th2 juegan un papel vital en la enfermedad (Larche y cols., *J. Allergy Clin. Immunol.*, 111: 450 (2003)), en particular, IL13 e IL4 producidas por células Th2 con fenotipo NK (NKT) en las vías respiratorias según se indica en un modelo de asma en roedores (Akbari y cols., *Nature Med.*, 9: 582 (2003)). La patología macroscópica de las vías respiratorias asmáticas muestra hiperinsuflación pulmonar, hipertrofia

de músculo liso, engrosamiento de lamina reticularis, edema mucosal, esfacelación de células epiteliales, disrupción de células ciliares e hipersecreción de glándulas mucosas. Microscópicamente, el asma se caracteriza por la presencia de números incrementados de eosinófilos, neutrófilos, linfocitos y células plasmáticas en los tejidos bronquiales, las secreciones bronquiales y el mucus. Inicialmente, hay atracción de leucocitos desde la corriente sanguínea a las vías respiratorias por linfocitos T CD4+ activados. Los linfocitos T activados también dirigen la liberación de mediadores inflamatorios a partir de eosinófilos, mastocitos y linfocitos. Además, las células Th2 producen IL4, IL5, IL9 e IL13. IL4, junto con IL13, señala el cambio desde anticuerpos IgM hasta anticuerpos IgE.

La reticulación de moléculas de IgE unidas a membranas por alérgenos causa que se degranulen los mastocitos, liberando histamina, leucotrienos y otros mediadores que perpetúan la inflamación de las vías respiratorias. IL5 activa la atracción y activación de los eosinófilos. Los mastocitos y eosinófilos activados generan también sus citocinas que ayudan a perpetuar la inflamación. Estos ciclos repetidos de inflamación en los pulmones con daño a los tejidos pulmonares seguidos por reparar pueden producir cambios estructurales a largo plazo ("remodelación") de las vías respiratorias.

El asma moderada se trata actualmente con un corticosteroide antiinflamatorio inhalado diariamente o con un inhibidor de mastocitos tal como el cromoglicato sódico o el nedocromil más un agonista beta2 inhalado según se necesite (3-4 veces por día) para aliviar los síntomas intercurrentes o el asma inducida por alérgenos o por ejercicios. El cromoglicato sódico y el nedocromil bloquean broncoespasmo e inflamación, pero usualmente son eficaces solamente para el asma que está asociada con alérgenos o ejercicio y típicamente, solamente para asmáticos juveniles. Los corticosteroides inhalados mejoran la inflamación, la hiperreactividad de las vías respiratorias y la obstrucción y reducen el número de exacerbaciones agudas. Sin embargo, ello tarda al menos un mes antes de que los efectos sean patentes y hasta un año para que tenga lugar mejora marcada. Los efectos secundarios más frecuentes son ronquera e infección micótica oral, es decir, candidiasis. Se han notificado efectos secundarios adversos más graves, *por ejemplo*, supresión suprarrenal parcial, inhibición del crecimiento y formación de hueso reducida, pero solamente con la utilización de dosis más altas. Beclometasona, acetonida y flunisolida probablemente tienen una potencia similar; mientras que budesonida y fluticasona son más potentes y según se informa tienen menos efectos secundarios sistémicos.

Incluso los pacientes con enfermedad leve muestran inflamación de las vías respiratorias, incluyendo la infiltración de la mucosa y epitelio con células T activadas, mastocitos y eosinófilos. Las células T y los mastocitos liberan citocinas que promueven el crecimiento y maduración de eosinófilos y la producción de anticuerpos IgE, y éstos, a su vez, incrementan permeabilidad microvascular, alteran el epitelio y estimulan reflejos neuronales y glándulas que segregan mucus. El resultado es hiperreactividad de las vías respiratorias, broncoconstricción e hipersecreción, manifestada por respiración sibilante, tos y disnea.

Tradicionalmente, el asma se ha tratado con broncodilatadores orales e inhalados. Estos agentes ayudan para los síntomas del asma, pero no hacen nada para la inflamación subyacente. El reconocimiento durante los últimos 10 años de la importancia de la inflamación en la etiología del asma ha conducido al uso incrementado de corticosteroides, pero muchos pacientes continúan sufriendo de asma incontrolada.

Debido a la importancia de tratar las enfermedades inflamatorias en seres humanos, en particular asma, se están buscando continuamente nuevos compuestos bioactivos que tengan menos efectos secundarios. El desarrollo de inhibidores potentes y específicos de los IL13, que siguen activos cuando se administran a largo plazo a las vías respiratorias, ofrece un enfoque novedoso para el tratamiento del asma, así como en otras enfermedades mediadas por IL13 e IgE.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere al menos en parte a anticuerpos que unen específicamente y con alta afinidad tanto IL13 glucosilado como IL13 no glucosilado; no unen IL13 de ratón y neutralizan la actividad IL13 en una proporción molar aproximada de 1:2 (MAb:IL13). También están incluidos en la presente invención anticuerpos que comprenden las regiones de unión a antígenos derivadas de las regiones variables de cadenas ligeras y/o pesadas de dichos anticuerpos. Los anticuerpos de la invención pueden ser monoclonales y un anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

Ejemplos de estos anticuerpos son 228B/C-1, 228A-4, 227-26 y 227-43. Los hibridomas que producen estos anticuerpos están depositados el 20 de noviembre de 2003, en la American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, con los números de acceso PTA-5657, PTA-5656, PTA-5654 y PTA-5655, respectivamente.

La presente invención incluye anticuerpos que tienen una secuencia de VL al menos homóloga al 95 % a aquella expuesta en SEQ ID NO: 3 y una secuencia de VH al menos homóloga al 95 % a aquella expuesta en la SEQ ID NO: 4; anticuerpos que tienen una secuencia de VL al menos homóloga al 95 % a aquella expuesta en la SEQ ID NO: 5 y una secuencia de VH al menos homóloga al 95 % a aquella expuesta en la SEQ ID NO: 6; y anticuerpos que tienen una secuencia de VL al menos homóloga al 95 % a aquella expuesta en la SEQ ID NO: 7 y una secuencia de VH al menos homóloga al 95 % a aquella expuesta en la SEQ ID NO: 8. La presente invención también incluye una

molécula de anticuerpo recombinante, o un fragmento de unión a IL13 de la misma, que comprende al menos una cadena pesada de anticuerpo, o un fragmento de unión a IL13 de la misma, que comprende CDR no humanas en posiciones 31-35 (CDR1), 50-65 (CDR2) y 95-102 (CDR3) (numeración de Kabat) a partir de un anticuerpo anti-IL13 de ratón, en el que las posiciones 27-30 tienen los aminoácidos Gly 26, Phe 27, Ser 28, Leu 29, Asn 30, (SEQ ID NO: 18); y al menos una de las cadenas ligeras de anticuerpos, o un fragmento de unión a IL13 de la misma, que comprende CDR en posiciones 24-34 (CDR1), 50-56 (CDR2) y 89-97 (CDR3) a partir de un anticuerpo anti-IL13 de ratón y las regiones estructurales a partir de un anticuerpo monoclonal humano.

La presente invención incluye fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno humano de los anticuerpos de la presente invención que incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fv de cadena simple (scFv), anticuerpos de cadena simple, Fv unidos por puentes disulfuro (sdFv). La invención también incluye anticuerpos de dominio simple que comprenden bien un dominio VL o bien un dominio VH. Un ejemplo de un scFv se representa en la figura 21, que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 152.

La presente invención incluye secuencias humanizadas de anticuerpo monoclonal humanizado 228B/C-1. Estas moléculas de anticuerpo recombinante humanizado comprenden una región de cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la fórmula: FRL1-CDRL1-FRL2-CDRL2-FRL3-CDRL3-FRL4, en la que FRL1 consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO^s: 20-25; CDRL1 consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO^s: 99-103; FRL2 consiste en la SEQ ID NO: 29; CDRL2 consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO^s: 104-114; FRL3 consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO^s: 30-56; CDRL3 consiste en cualquiera de las SEQ ID NO^s: 115-116; y FRL4 consiste en las SEQ ID NO^s: 57-59; y que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la fórmula: FRH1-CDRH1-FRH2-CDRH2-FRH3-CDRH3-FRH4, en la que FRH1 consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO^s: 60-66; CDRH1 consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO^s: 117-122; FRH2 consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO^s: 67-75; CDRH2 consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO^s: 123-134; FRH3 consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO^s: 76-90; CDRH3 consiste en cualquiera de las SEQ ID NO^s: 135-141; y FRH4 consiste en las SEQ ID NO^s: 91-92. La región de cadena pesada variable puede comprender adicionalmente al menos el dominio CH1 de una región constante o los dominios CH1, CH2 y CH3 de una región constante. La región constante de cadena pesada puede comprender un anticuerpo IgG, en el que el anticuerpo IgG es un anticuerpo IgG1, un anticuerpo IgG2, un anticuerpo IgG3, o un anticuerpo IgG4.

La presente invención también incluye moléculas de anticuerpos recombinantes en las que la cadena ligera variable se elige a partir de una cualquiera de las SEQ ID NO^s: 3, 5, 7, 93, 95, 97, 142, 144 y 150 y una cadena pesada variable elegida a partir de una cualquiera de las SEQ ID NO^s: 4, 6, 8, 94, 96, 98, 143, 145, 146, 147, 148 y 149. Un anticuerpo particular comprende la cadena ligera variable que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 142 y una cadena pesada variable que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 143.

La presente invención incluye las líneas celulares de hibridoma que producen los anticuerpos monoclonales 228B/C-1, 228A-4, 227-26 y 227-43. La presente invención incluye ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos monoclonales 228B/C-1, 228A-4, 227-26 y 227-43, líneas celulares que comprenden un ácido nucleico que codifica estos anticuerpos o cadenas de los mismos y vectores que comprenden el ácido nucleico que codifica los anticuerpos o cadenas de los mismos.

La presente invención también incluye anticuerpos que se unen al mismo epítipo como 228B/C-1. Los polipéptidos ejemplares comprenden toda o una parte de la SEQ ID NO: 1 o variantes de la misma, o la SEQ ID NO: 2, en la que el aminoácido 13 se cambia desde ácido glutámico hasta lisina. La invención se refiere también al epítipo reconocido por los anticuerpos de la presente invención. Los péptidos de epítopos incluyen un péptido que comprende esencialmente o que consiste en ESLINVSG (SEQ ID NO: 18) o YCAALESINV (SEQ ID NO: 19).

La presente invención incluye una composición que comprende los anticuerpos de acuerdo con la invención reivindicada en combinación con un vehículo, diluyente, excipiente o estabilizador farmacéuticamente aceptable.

La presente invención incluye un procedimiento de tratar un sujeto que sufre de síntomas asmáticos que comprenden administrar a un sujeto, por ejemplo, un sujeto en necesidad de la misma, una cantidad de un anticuerpo de acuerdo con la invención reivindicada eficaz para reducir los síntomas asmáticos, en la que el anticuerpo puede regular a la baja la actividad de IL13 en el paciente, reducir la hiperresponsividad bronquial en el paciente, y/o reducir la eosinofilia en los pulmones del sujeto. La presente invención también incluye un procedimiento de inhibir la infección de virus respiratorio sincitial (VRS) que comprende administrar a un sujeto, por ejemplo, un sujeto en necesidad de la misma, una cantidad inhibidora del anticuerpo de la invención reivindicada.

El anticuerpo de la presente invención se puede administrar por una o más de las vías que incluyen vías intravenosa, intraperitoneal, de inhalación, intramuscular, subcutánea y oral. La presente invención incluye un dispositivo de inhalación que administra a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de acuerdo con la invención reivindicada.

La presente invención incluye un procedimiento para detectar la proteína interleucina-13 en un sujeto, por ejemplo, un paciente que sufre de una enfermedad alérgica, que comprende, por ejemplo, las etapas de permitir que el

anticuerpo de la invención reivindicada entre en contacto con una muestra; y detectar la interleucina-13 por la aparición de inmunorreacción. También se describen procedimientos para diagnosticar la sobreexpresión de IL13 en un sujeto, comprendiendo las etapas de (a) obtener una muestra del sujeto; (b) combinar la muestra con un anticuerpo de acuerdo con la invención reivindicada en condiciones que permitirían inmunorreacción con IL13; y (c) determinar si IL13 está sobreexpresada o no en relación a un nivel de expresión normal de IL13.

La presente invención incluye un procedimiento para producir los anticuerpos de la invención reivindicada, que comprende las etapas de: a) producir un compuesto inmunogénico que comprende un resto de IL13 glucosilado y un resto inmunogénico; b) preparar una solución inyectable que comprende dicho compuesto inmunogénico en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y un coadyuvante; c) inmunizar un ratón con dicha solución inyectable por una combinación de inyecciones intravenosas e intraperitoneales, d) producir un hibridoma fusionando una célula de bazo de dicho ratón inmunizado con células de mieloma; e) seleccionar un hibridoma produciendo un anticuerpo que tenga las características del anticuerpo de la invención reivindicada; y f) aislar dicho anticuerpo.

La presente invención incluye un procedimiento para inhibir la producción de anticuerpos IgE en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva que inhibe la producción de anticuerpos IgE de un anticuerpo de acuerdo con la invención reivindicada. La inhibición de la producción de anticuerpos IgE puede evitar asma bronquial, rinitis alérgica, dermatitis alérgica y anafilaxia y también tratar asma bronquial, rinitis alérgica, urticaria y dermatitis atópica.

La presente invención incluye un procedimiento de tratar un trastorno mediado con IL13 en un paciente, comprendiendo administrar al paciente una cantidad efectiva de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención reivindicada, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe la unión de IL13 a su receptor e inhibe una o más funciones asociadas con la unión de la interleucina a dicho receptor.

La presente invención incluye un procedimiento de tratar un trastorno mediado por IgE en un paciente, comprendiendo administrar al paciente una cantidad efectiva de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención reivindicada, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe la unión de IL13 a su receptor e inhibe una o más funciones asociadas con la unión de la interleucina a dicho receptor.

La presente invención incluye un procedimiento para reducir la gravedad del asma en un mamífero que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-IL13 que tiene al menos una de las siguientes características: la capacidad de unir IL13 humano con una K_D de entre aproximadamente 1×10^{10} a aproximadamente 1×10^{12} M; la capacidad para inhibir una o más funciones asociadas con unión de interleucina IL13 al receptor IL13; y la incapacidad del anticuerpo para unir IL13 de ratón.

Las enfermedades y/o afecciones mediadas por IL13 que se contemplan por la invención incluyen, pero no se limitan a, asma alérgica, asma no alérgica (intrínseca), rinitis alérgica, dermatitis atópica, conjuntivitis alérgica, eczema, urticaria, alergias alimentarias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, colitis ulcerosa, infección por VRS, uveitis, esclerodermia y osteoporosis.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa la unión de anticuerpos monoclonales anti-IL13 a IL13 humana.

La figura 2 representa la unión de anticuerpos monoclonales a IL13-Fc mutante.

La figura 3 ilustra que no hay ninguna inhibición de MAb 228B/C-1 IL13 a IL13 humana por MAb JES10-5A2 (Pharmingen).

La figura 4 ilustra el efecto de los anticuerpos monoclonales anti-IL13 sobre la proliferación de células L-1236 de linfoma de Hodgkin.

La figura 5 ilustra el efecto de los anticuerpos monoclonales anti-IL13 sobre supresión inducida por IL-13 de expresión de CD14 en monocitos humanos.

La figura 6 ilustra el efecto de anticuerpos monoclonales anti-IL13 sobre regulación al alza inducida por IL13 de CD23 en monocitos humanos.

La figura 7 ilustra el efecto de anticuerpos monoclonales anti-IL13 sobre fosforilación de STAT6 inducida por IL13 en las células THP-1.

La figura 8 representa la secuencia de aminoácidos de las regiones VH y VL del anticuerpo monoclonal 228B/C-1.

La figura 9 representa la secuencia de aminoácidos de las regiones VH y VL de anticuerpo monoclonal 228A-4.

La figura 10 representa la secuencia de aminoácidos de las regiones VH y VL de anticuerpo monoclonal 227-26.

La figura 11 representa las secuencias de las regiones variables de cadena ligera para la humanización de anticuerpo monoclonal 228B/C-1. Los clones B y R representan clones probados con una plantilla humana 2 para VK y para un VH de ratón. Los clones HT2-NEW y HT2-DP27 se construyeron con estructuras humanas tanto para VK como para VH.

5 La figura 12 representa las secuencias de cadena pesada correspondientes de clones en figura 11.

La figura 13 A-D representa los perfiles de ELISA para candidatos humanizados combinatorios.

La figura 14 A representa los perfiles de ELISA para 89 V_k/276G. La fig. 14B representa los resultados de ELISA para construir 115V_k/73V_h FL.

La figura 15 representa las secuencias de candidatos de biblioteca combinatoria.

10 La figura 16 representa un perfil de competición para dos candidatos (CL5 y CL-13) sometidos a ensayo demostrado según se compara con el candidato quimérico (228 B/C n.º: 3) para unir a IL-13. El Fab irrelevante es 51, que no demuestra ninguna capacidad para competir.

La figura 17 representa las secuencias de tres candidatos maduros de afinidad.

La figura 18 muestra la alineación de secuencias de proteínas IL13.

15 La figura 19 representa el epítipo de unión de Mab 228B/C-1.

La figura 20 representa las variantes de CDR y sus respectivas SEQ ID NO^s.

La figura 21 representa las secuencias de cadena ligera variable y de cadena pesada variable para seleccionar anticuerpos recombinantes candidatos.

Descripción detallada

20 La presente invención no se limita a la metodología, protocolos, líneas celulares, vectores, o reactivos particulares descritos en el presente documento porque pueden variar. Adicionalmente, la terminología usada en el presente documento es para el propósito de describir realizaciones particulares solamente y no se desea limitar el alcance de la presente invención. Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas del singular "un", "uno", y "el" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario, *por ejemplo*, la referencia a "una célula huésped" incluye una pluralidad de tales células huéspedes.

25 A menos que se defina lo contrario, todos los términos científicos y técnicos y cualesquiera acrónimos usados en el presente documento tienen los mismos significados que se entienden comúnmente por alguien experto en la técnica en el campo de la invención. Aunque cualesquiera procedimientos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica de la presente invención, los procedimientos, dispositivos y materiales adecuados se describen en el presente documento.

30 Todas las patentes y publicaciones se mencionan en el presente documento en la medida permitida por ley para el propósito de describir y revelar las proteínas, enzimas, vectores, células huésped y metodologías comunicadas en el mismo que podrían usarse con la invención actual. Sin embargo, no debe interpretarse nada en el presente documento como una admisión de que la invención no está autorizada para antedatar tal revelación en virtud de invención anterior.

Inmunógeno

Se usó IL13 recombinante para inmunizar ratones para generar los hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales de la presente invención. El IL13 recombinante está comercialmente disponible a partir de un número de fuentes (véase, por ejemplo R & D Systems, Mineápolis, MN., PeproTech, Inc., NJ, y Sanofi Bio-Industries, Inc., Tervose, PA.). Alternativamente, un gen o un ADNc que codifica IL13 se puede clonar dentro de un plásmido u otro vector de expresión y se puede expresar en cualquiera de una serie de sistemas de expresión de acuerdo con procedimientos bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Los procedimientos de clonar y expresar IL13 y la secuencia de ácidos nucleicos para IL13 se conocen bien (véase, por ejemplo, Patente de los EE.UU. N.º: 5.652.123). Debido a la degeneración del código genético, se pueden producir una multitud de secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos IL13. Alguien puede variar la secuencia de nucleótidos seleccionando combinaciones en base a posibles elecciones de codón. Estas combinaciones se hicieron de acuerdo con el código genético de tripletes estándar según se aplicó a la secuencia de nucleótidos que codifica polipéptido 11.13 que se da en la naturaleza y se considerarán todas las variaciones tales. Uno cualquiera de estos polipéptidos se pueden usar en la inmunización de un animal para generar anticuerpos que unen a IL13.

50 El polipéptido IL13 inmunógeno puede, cuando es beneficioso, expresarse como una proteína de fusión que tiene el polipéptido IL13 unido a un segmento de fusión. El segmento de fusión a menudo ayuda en la purificación de proteínas, *por ejemplo*, permitiendo a la proteína de fusión aislarse y purificarse por cromatografía de afinidad. Las

5 proteínas de fusión pueden producirse cultivando una célula recombinante transformada con una secuencia de ácido nucleico de fusión que codifica una proteína que incluye el segmento de fusión unido bien al extremo carboxiloterminoal o bien al extremo aminoterminoal de la proteína. Los segmentos de fusión pueden incluir, pero no se limitan a, regiones Fc de inmunoglobulina, glutatión-S-transferasa, β -galactosidasa, un segmento de poli-histidina capaz de unir a un ión metálico divalente y proteína de unión a maltosa.

Los polipéptidos ejemplares comprenden toda o una parte de SEQ ID NO: 1 o sus variantes, o de SEQ ID NO: 2 en la que el aminoácido 13 es Xaa y puede cambiarse a partir del tipo silvestre, por ejemplo ácido glutámico a lisina.

10 Una proteína de fusión que comprende una forma mutante de IL13 humana se usa para generar los anticuerpos de la presente invención. Esta forma mutante de IL13 contenía una mutación individual que da como resultado una forma inactiva de la proteína (Thompson y cols., J. Biol. Chem. 274: 2994 (1999)). Con el fin de generar anticuerpos neutralizantes con afinidad alta, la proteína de fusión comprendía la proteína de IL13 mutante condensada a una inmunoglobulina Fc, específicamente IgG1 y se expresa en una línea celular mamífera tal que la proteína recombinante estaba naturalmente glicosilada. La parte Fc de la proteína de fusión puede haber proporcionado una estructura conformacional que expusiera un epítipo clave. La glicosilación puede tener incrementada la inmunogenicidad del epítipo, permitiendo la generación de anticuerpos frente a este epítipo particular. Los polipéptidos IL13 expresados en *E. coli* carecen de glicosilación y los anticuerpos comercialmente disponibles probados se generaron usando esta proteína. Los autores de la presente invención probaron estos anticuerpos, *por ejemplo*, R & D Systems y Pharmingen, y se encontró que los anticuerpos generados con un inmunógeno producido *E. coli* no se leen de forma cruzada con el epítipo unido a los anticuerpos de la presente invención.

20 Generación de anticuerpos

Los anticuerpos de la presente invención se pueden generar por cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender anticuerpos policlonales. Se conocen procedimientos de preparar anticuerpos policlonales por el técnico experto (Harlow, y cols., *Antibodies: a Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. (1988)).

25 Por ejemplo, un inmunógeno como se describe anteriormente se puede administrar a diversos animales huésped incluyendo, pero no limitados a, conejos, ratones, ratas, etc., para inducir la producción de suero que contiene anticuerpos policlonales específicos para el antígeno. La administración del inmunógeno puede comportar una o más inyecciones de un agente inmunizador y si se desea, de un coadyuvante. Pueden usarse varios coadyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de las especies huéspedes, e incluyen, pero no están limitados a, coadyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensoactivas tales como lisolectina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol y coadyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Ejemplos adicionales de coadyuvantes que pueden emplearse incluyen el coadyuvante de MPL-TDM (lípidos A monofosforílico, dicorinomicolato de trehalosa sintético).

30 Los protocolos de inmunización se conocen bien en la técnica y pueden llevarse a cabo por cualquier procedimiento que estimule una respuesta inmune en el animal huésped elegido. Los coadyuvantes también se conocen bien en la técnica.

40 Típicamente, el inmunógeno (con o sin adyuvante) se inyecta en el mamífero por múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales, o intramuscularmente o por IV. El inmunógeno puede incluir un polipéptido IL13, una proteína de fusión o variantes de la misma. Dependiendo de la naturaleza de los polipéptidos (es decir, hidrofobicidad porcentual, hidrofiliidad porcentual, estabilidad, carga netos, punto isoeléctrico etc.), ello puede ser útil para conjugar el inmunógeno a una proteína conocida por ser inmunogénica en el mamífero que se está inmunizando. Tal conjugación incluye bien conjugación química derivatizando grupos funcionales químicos activos tanto para el inmunógeno y la proteína inmunogénica a conjugarse de tal manera que se forma un enlace covalente, o por metodología basada en proteínas de fusión, o bien otros procedimientos conocidos por el trabajador experto. Ejemplos de tales proteínas inmunogénicas incluyen, pero no se limitan a, hemocianina de lapa de California, ovoalbúmina, seroalbúmina, tiroglobulina bovina, inhibidor de tripsina de soja y péptidos de T coadyuvantes promiscuos. Se pueden usar diversos coadyuvantes para incrementar la respuesta inmunológica según se describe anteriormente.

50 Los anticuerpos de la presente invención comprenden anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando tecnología de hibridoma, tales como aquel descrito por Kohler y Milstein, *Nature*, 256: 495 (1975) y la Patente de los EE.UU. N.º: 4.376.110, por Harlow, y cols., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. (1988), por Hammerling y cols.,

55 *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* (Elsevier, N.Y., (1981)), u otros procedimientos conocidos por el trabajador. Otros ejemplos de procedimientos que se pueden emplear para producir anticuerpos monoclonales incluyen, pero no se limitan a, la técnica de hibridomas de células B humanas (Kosbor y cols., 1983, *Immunology Today* 4: 72; Cole y cols., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 80: 2026-2030) y la técnica de EBV-hibridoma (Cole y cols., 1985, *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., páginas 77-96). Tales anticuerpos

pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de las mismas. El hibridoma que produce el MAb de esta invención puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*.

5 Usando técnicas de hibridoma típicas, un huésped tal como un ratón, un ratón humanizado, un ratón con un sistema inmunitario humano, hámster, conejo, camello o cualquier otro animal huésped apropiado, está típicamente inmunizado con un inmunógeno para estimular a los linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a IL13. Alternativamente, pueden inmunizarse linfocitos *in vitro* con el antígeno.

10 Generalmente, en fabricar hibridomas que producen anticuerpos, bien se usan linfocitos de sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano, o bien se usan células del bazo o células de los nódulos linfáticos si se desean fuentes de mamíferos no humanos. Los linfocitos se fusionan después con una línea de células inmortalizadas usando un agente de condensación adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986), páginas 59-103). Las líneas celulares inmortalizadas son usualmente células de mamíferos inmortalizadas, en particular células de mieloma de origen roedor, bovino o humano. Típicamente, se emplea una línea celular de mieloma de rata o de ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas, no condensadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), sustancias que impiden el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

20 Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquellas que fusionan eficientemente, dan soporte a expresión de alto nivel estable de anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferidas son las líneas de mieloma murino, que pueden obtenerse, por ejemplo, a partir del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y de la American Type Culture Collection, Manassas, Va. Las líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano se pueden usar también para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur y cols., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987) páginas 51-63).

30 El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma puede después someterse a ensayo para la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la IL13. La especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina por, *por ejemplo*, inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). Tales técnicas se conocen en la técnica y están dentro de la habilidad del trabajador. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal a IL13 puede, por ejemplo, determinarse por un análisis de Scatchard (Munson y cols., *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980)).

35 Después que se identifican las células de hibridoma deseadas, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitantes y pueden crecer por procedimientos estándar (Goding, *supra*). Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, Medio de Eagle Modificado por Dulbecco y RPMI-1640. Los anticuerpos monoclonales segregados por los subclones se pueden aislar o purificar a partir del medio de cultivo por procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, *por ejemplo*, proteína A-sefarosa, cromatografía de hidroxapatita, cromatografía de exclusión en gel, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

45 Una diversidad de procedimientos existen en la técnica para la producción de anticuerpos monoclonales y así, la invención no está limitada a su sola producción en hibridomas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden elaborar mediante procedimientos de ADN recombinante, tales como aquellos descritos en la Patente de los EE.UU. N.º: 4.816.567. En este contexto, el término "anticuerpo monoclonal" hace referencia a un anticuerpo derivado de un único clon eucariota, de fago, o procarriota. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (*por ejemplo*, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos, o tales cadenas a partir de fuentes humanas, humanizadas, u otras). Las células de hibridoma de la invención sirven como una fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN se puede situar dentro de los vectores de expresión, que después se transforman en células huésped tales como células NSO, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante por los dominios constantes de cadenas pesadas y ligeras humanas en lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente de los EE.UU. N.º: 4.816.567; Morrison y cols., *supra*) o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no inmunoglobulínico. Un polipéptido no inmunoglobulínico puede estar sustituido por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o puede estar sustituido por los dominios variables de un sitio de combinación de antígenos de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Los procedimientos para preparar anticuerpos monovalentes se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, un procedimiento implica la expresión recombinante de cadena ligera de inmunoglobulina y de cadena pesada modificada de inmunoglobulina. La cadena pesada está truncada generalmente en cualquier punto en la región Fc tal como para evitar entrecruzamiento de cadenas pesadas. Alternativamente, los residuos de cisteína relevantes están sustituidos con otro residuo aminoacídico o se eliminarán de tal forma que se evite reticulación.

Pueden generarse fragmentos de anticuerpo que reconocen epítomos específicos mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, pueden producirse fragmentos de Fab y de $F(ab')_2$ de la invención por escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos de Fab) o pepsina (para producir fragmentos de $F(ab')_2$). Los fragmentos de $F(ab')_2$ contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada.

Para algunos usos, incluyendo el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos y los ensayos de detección *in vitro*, puede ser preferible usar anticuerpos quiméricos, humanizados, o humanos. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones del anticuerpo están derivados de especies animales distintas, tales como anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los procedimientos para producir anticuerpos quiméricos se conocen en la técnica. Véase, *por ejemplo*, Morrison, Science 229: 1202 (1985); Oi y col., BioTechniques 4: 214; Gillies y col., (1989), J. Immunol. Methods 125: 191-202; y Patentes de los EE. UU. N.ºs: 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397.

Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos generadas en una especie no humana que unen el antígeno deseado que tienen una o más regiones de determinación de complementariedad (CDR) de la especie no humana y regiones estructurales (FR) de una molécula de inmunoglobulina humana. Frecuentemente, los residuos estructurales en las regiones estructurales humanas se sustituirán con el residuo correspondiente del anticuerpo donante de las CDR para alterar, preferentemente para mejorar, la unión a antígeno. Estas sustituciones estructurales se identifican mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, *p. ej.*, realizando un modelo de las interacciones de los residuos estructurales y de las CDR para identificar residuos estructurales importantes para la unión a antígeno y para comparación de secuencias para identificar residuos estructurales inusuales en posiciones particulares. (Véanse, *por ejemplo*, Queen y cols., Patente de los EE.UU. N.º: 5.585.089; Riechmann y cols., Nature 332: 323 (1988)). Los anticuerpos se pueden humanizar usando una diversidad de técnicas conocidas en la técnica que incluyen, por ejemplo, realizar injerto de CDR (documento EP 239.400; publicación PCT WO 91/09967; Patente de los EE. UU. N.º: 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), enchapar o proteger (documento EP 592.106; documento EP 519.596; Padlan, Molecular Immunology 28 (4/5): 489-498 (1991); Studnicka y cols., Protein Engineering 7 (6): 805-814 (1994); Roguska y cols., PNAS 91: 969-973 (1994)) y reorganización de las cadenas (Patente de los EE. UU. N.º: 5.565.332).

Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos aminoacídicos introducidos provenientes de una fuente que no es humana. Estos residuos aminoacídicos no humanos a menudo se denominan residuos "importados", que habitualmente se toman de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo los procedimientos de Winter y cols. (Jones y cols., Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann y cols., Nature 332: 323-327 (1988); Verhoeyen y col., Science 239: 1534-1536 (1988)) sustituyendo CDR de roedor o secuencias de CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. De acuerdo con ello, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de los EE.UU. N.º: 4.816.567), en los que se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CRD y algunos residuos posibles de FR están sustituidos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos pueden fabricarse por medio de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, incluidos procedimientos de presentación en fagos, descritos anteriormente, usando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. Véanse también, las patentes de los EE.UU. N.ºs: 4.444.887 y 4.716.111; y las publicaciones PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, y WO 91/10741. Las técnicas de Cole y cols. y Boerder y cols., están también disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole y cols., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Riss, (1985); y Boemer y cols., J. Immunol., 147 (1): 86-95, (1991)).

También pueden producirse anticuerpos humanos usando ratones transgénicos que no son capaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulinas humanas. Por ejemplo, los complejos de genes humanos de inmunoglobulina de cadena pesada y cadena ligera pueden introducirse al azar o mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Alternativamente, pueden introducirse en células madre embrionarias de ratón la región variable, la región constante y la región de diversidad humanas, además de los genes de de cadena ligera y pesada humanos. Los genes de inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera de ratón pueden suministrarse no funcionalmente separada o simultáneamente con la introducción de loci de inmunoglobulina humana mediante recombinación homóloga. En particular, la delección homocigótica de la región JH evita la producción endógena de anticuerpos. Las células madre embrionarias

modificadas se expanden y se microinyectan en blastocitos para producir ratones quiméricos. Después, los ratones quiméricos se crían para producir descendencia homocigótica que expresa anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan en la manera normal con un antígeno seleccionado, *por ejemplo*, todo o una porción de un polipéptido de la invención. Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno a partir de ratones transgénicos inmunizados usando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana que alberga el ratón transgénico se reordenan durante la diferenciación de linfocitos B, y subsecuentemente experimentan permutación de clase o mutación somática. Así, usando una técnica de este tipo, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar, *Int. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995). Para una descripción detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir dichos anticuerpos, véanse, *por ejemplo*, publicaciones PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; Patente Europea N.º: 0 598 877; Patentes de los EE.UU. N.ºs: 5.413.923, 5.625.126, 5.633.425, 5.569.825, 5.661.016, 5.545.806, 5.814.318 y 5.939.598. Además, pueden contratarse empresas tales como Abgenix, Inc. (Freemont, CA) y Medarex (Princeton, NJ) para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando tecnología similar a aquella descrita anteriormente.

También podrían fabricarse MAb humanos inmunizando ratones transplantados con leucocitos de sangre periférica humana, esplenocitos o médulas óseas (*por ejemplo*, técnicas de Trioma de XTL). Pueden generarse anticuerpos completamente humanos que reconozcan un epítipo seleccionado usando una técnica referida como "selección guiada". En este enfoque se usa un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, *por ejemplo*, un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo. (Jespers y cols., *Bio/technology* 12: 899-903 (1988)).

Adicionalmente, pueden utilizarse a su vez anticuerpos para los polipéptidos de la invención para generar anticuerpos antiidiotípicos que "imitan" polipéptidos de la invención usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica (véanse, por ejemplo, Greenspan & Bona, *FASEB J.* 7 (5): 437-444; (1989) y Nissinoff, *J. Immunol.* 147 (8): 2429-2438 (1991)). Por ejemplo, anticuerpos que se unen a un polipéptido de la invención, e inhiben competitivamente la multimerización de polipéptidos y/o la unión de un polipéptido de la invención a un ligando, pueden usarse para generar antiidiotipos que "imitan" la multimerización y/o el dominio de unión de polipéptidos y, como consecuencia, se unen a, y neutralizan, polipéptidos y/o su ligando. Dichos antiidiotipos de neutralización o fragmentos Fab de dichos antiidiotipos pueden usarse en regímenes terapéuticos para neutralizar el ligando del polipéptido. Por ejemplo, tales anticuerpos antiidiotípicos pueden usarse para unirse a un polipéptido de la invención y/o para unirse a sus ligandos/receptores y por lo tanto bloquear su actividad biológica.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferentemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En la presente invención, una de las especificidades de unión puede estar dirigida a IL13, la otra puede ser para cualquier otro antígeno y preferentemente para una proteína de superficie celular, receptor, subunidad de receptor, antígeno específico de tejido, proteína derivada víricamente, proteína de envoltura codificada víricamente, proteína derivada bacteriamente, o proteína de superficie bacteriana, etcétera.

Los procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos se conocen bien. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos está basada en la coexpresión de dos pares cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, teniendo las dos cadenas pesadas diferentes especificidades (Millstein y Cuello, *Nature*, 305: 537-539 (1983)). Debido a la colección al azar de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpos diferentes, de las que solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se lleva a cabo usualmente por etapas de cromatografía de afinidad. Se revelaron procedimientos similares en el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993 y en Traunecker y cols., *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991).

Los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se pueden fusionar a secuencias de dominios constantes de inmunoglobulina. Preferentemente la fusión es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Ello puede tener la primera región constante de la cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se co-transforman dentro de un organismo huésped adecuado. Para detalles adicionales de generar anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo Suresh y cols., *Meth. In Enzym.*, 121: 210 (1986).

Los anticuerpos heteroconjugados se contemplan también por la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Tales anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir a las células del sistema inmune contra células no deseadas (Patente de los EE.UU. N.º: 4.676.980). Se contempla que los anticuerpos se pueden preparar *in vitro* usando procedimientos conocidos en química de proteínas sintéticas incluyendo aquella que implica agentes de reticulación. Por ejemplo, se pueden construir inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéster.

Ejemplos de reactivos apropiados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-mercaptobutirimidato y aquellos descritos, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. N.º: 4.676.980.

Además, alguien puede generar anticuerpos de dominio individual contra IL-13. Los ejemplos de esta tecnología se han descrito en el documento WO9425591 para anticuerpos derivados de Ig de cadena pesada de los camélidos, así como en el documento US20030130496 que describe el aislamiento de anticuerpos totalmente humanos de dominio individual a partir de colecciones de fagos.

Identificación de anticuerpos anti-IL13

La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales antagonistas que inhiben y neutralizan la acción de IL13. En particular, los anticuerpos de la presente invención se unen a IL13 e inhiben la activación de la cadena-1 del receptor alfa de IL13 (IL13Ra1). Los anticuerpos de la presente invención incluyen los anticuerpos designados 228B/C-1, 228A-4, 227-26 y 227-43 y se revelan los clones humanizados de 228B/C-1. La presente invención también incluye anticuerpos que se unen al mismo epítipo como uno de estos anticuerpos, por ejemplo, aquel de anticuerpo monoclonal 228B/C-1.

Los anticuerpos anti-IL13 candidatos se analizaron por ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA), inmunotransferencia de Western, u otras técnicas inmunológicas. Los ensayos llevados a cabo para caracterizar los anticuerpos individuales incluyeron: (1) Inhibición de proliferación IL13-autocrina de líneas celulares HDLM-2 y L-1236 de linfoma de Hodgkin; (2) Inhibición de la fosforilación de STAT6 inducida por IL13 en las células THP-1; y (3) Inhibición de supresión inducida por IL13 de expresión de CD14 en monocitos humanos primarios; y (4) Inhibición de la regulación al alza inducida por IL13 de expresión de CD23 en monocitos humanos primarios. Se describen detalles experimentales en los Ejemplos.

Los anticuerpos de la invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, monovalentes, biespecíficos, heteroconjugados, multiespecíficos, humanos, humanizados o anticuerpos quiméricos, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos de dominio individual, fragmentos de Fab, fragmentos de F(ab'), fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) (incluyendo, *por ejemplo*, anticuerpos anti-Id contra anticuerpos de la invención) y fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores.

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y a porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión de antígenos que inmunoespecíficamente une un antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (*por ejemplo*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de la molécula de inmunoglobulina. Por otra parte, el término "anticuerpo" (Ab) o "anticuerpo monoclonal" (MAb) se desea para incluir moléculas intactas, así como, fragmentos de anticuerpos (tales como, por ejemplo, fragmentos de Fab y de F(ab')₂) que son capaces de unir específicamente a una proteína. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ carecen del fragmento Fc de anticuerpo intacto, se disipan más rápidamente de la circulación del animal o planta y pueden tener menos unión de tejido no específico que un anticuerpo intacto (Wahl y cols., J. Nucl. Med. 24: 316-325 (1983)).

Los anticuerpos pueden ser fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos de la presente invención e incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fv monocatenarias (scFv), anticuerpos monocatenarios, Fv unidos por puentes disulfuro (sdFv) y anticuerpos de dominio individual que comprenden bien un dominio VL o bien un dominio VH. Fragmentos de anticuerpos de unión a antígenos, que incluyen anticuerpos de cadena sencilla, pueden comprender la(s) región(es) variable(s) sola(s) o en combinación con la totalidad o una parte de los siguientes: región bisagra, CH1, CH2 y CH3. También están incluidos en la invención fragmentos de unión a antígenos que comprenden cualquier combinación de región(es) variable(s) con una región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3.

Los anticuerpos de la invención pueden ser de cualquier origen animal incluyendo aves y mamíferos. Preferentemente, los anticuerpos son de seres humanos, primates no humanos, roedores (*por ejemplo*, ratón y rata), burro, oveja, conejo, cabra, conejillo de Indias, camello, caballo, o pollo.

Como se usa en el presente documento, anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, según se describen más adelante y por ejemplo en, la Patente de los EE.UU. N.º: 5.939.598 por Kucherlapati y cols.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos o de mayor multiespecificidad. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítopos de IL13 o pueden ser específicos para tanto IL13 así como para un epítipo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo o un material de soporte sólido. Véanse, *por ejemplo*, publicaciones de PCT WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, y cols., J. Immunol. 147: 60-69 (1991); Patentes de los EE.UU. N.ºs: 4.474.893; 4.714.681; 4.925.648; 5.573.920; 5.601.819; Kostelny y cols., J. Immunol. 148: 1547-1553 (1992).

Los anticuerpos de la presente invención se pueden describir o especificar en términos de los epítipo(s) o parte(s) de IL13 que ellos reconocen o unen específicamente. El/los epítipo(s) o parte(s) polipeptídica(s) se pueden especificar como se describe en el presente documento, *por ejemplo*, por las posiciones N-terminal y C-terminal, por tamaño en residuos aminoácidos contiguos, o se pueden enumerar en las Tablas y en las Figuras.

5 Los anticuerpos de la presente invención también pueden describirse o especificarse en términos de su reactividad cruzada. Los anticuerpos que unen polipéptidos IL13, que tienen al menos el 95 %, al menos el 90 %, al menos el 85 %, al menos el 80 %, al menos el 75 %, al menos el 70 %, al menos el 65 %, al menos el 60 %, al menos el 55 % y al menos el 50 % de identidad (como se calculó usando procedimientos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento) también están incluidos en la presente invención. Los anticuerpos anti-IL-13 pueden unirse
10 también con una K_D de menos de aproximadamente 10^{-7} M, menos de aproximadamente 10^{-6} M, o menos de aproximadamente 10^{-5} M a otras proteínas, tales como anticuerpos IL-13 de especies distintas de aquella contra la que está dirigido el anticuerpo anti-IL-13.

En realizaciones específicas, los anticuerpos de la presente invención reaccionan de forma cruzada con homólogos de mono de IL13 humana y el epítipo correspondiente de la misma. En una realización específica, la reactividad cruzada anteriormente descrita es con respecto a cualquier polipéptido antigénico o inmunogénico específico
15 individual, o con respecto a combinación/combinaciones de los polipéptidos antigénicos y/o inmunogénicos específicos revelados en el presente documento.

Además están incluidos en la presente invención anticuerpos que unen polipéptidos codificados por polinucleótidos que hibridan a un polinucleótido que codifica IL13 en condiciones de hibridación restrictivas. Los anticuerpos de la presente invención también pueden describirse o especificarse en términos de su afinidad de unión a un polipéptido de la invención. Las afinidades de unión preferidas incluyen aquellas con una constante de disociación en el equilibrio o K_D de 10^{-8} a 10^{-15} M, 10^{-8} a 10^{-12} M, 10^{-8} a 10^{-10} M, o 10^{-10} a 10^{-12} M. La invención también proporciona anticuerpos que inhiben competitivamente la unión de un anticuerpo a un epítipo de la invención como se determina por cualquier procedimiento conocido en la técnica para determinar unión competitiva, por ejemplo, los
20 inmunoensayos descritos en el presente documento. En las realizaciones preferidas, el anticuerpo inhibe competitivamente la unión al epítipo en al menos el 95 %, al menos el 90 %, al menos el 85 %, al menos el 80 %, al menos el 75 %, al menos el 70 %, al menos el 60 %, o al menos el 50 %.

Vectores y células huésped

En otro aspecto, la presente invención proporciona construcciones de vectores que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica los anticuerpos de la presente invención y una célula huésped que comprende un vector tal. Las técnicas estándar para la clonación y la transformación se pueden usar en la preparación de líneas celulares que expresan los anticuerpos de la presente invención.
30

Los vectores de expresión recombinantes que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica los anticuerpos de la presente invención se pueden preparar usando técnicas bien conocidas. Los vectores de expresión incluyen una secuencia de nucleótidos enlazada de manera operable a secuencias de nucleótidos reguladoras de traducción tales como aquellas derivadas de genes de mamíferos, microbianos, víricos, o de insectos. Ejemplos de secuencias reguladoras incluyen promotores transcripcionales, operadores, potenciadores, sitios de unión al ribosoma del ARNm, y/o otras secuencias apropiadas que controlan la iniciación y la terminación de transcripción y traducción. Las secuencias de nucleótidos están "enlazadas operativamente" cuando la secuencia reguladora está relacionada funcionalmente con la secuencia de nucleótidos para el polipéptido apropiado. Así, una secuencia de nucleótidos promotora está unida operativamente a, *por ejemplo*, la secuencia de cadena pesada de anticuerpo si la secuencia de nucleótidos del promotor controla la transcripción de la secuencia de nucleótidos apropiada.
35

Además, las secuencias que codifican péptidos señal apropiados que no están asociadas de forma natural con secuencias de cadenas pesadas o ligeras de anticuerpos se pueden incorporar en vectores de expresión. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos para un péptido señal (secretora líder) puede fusionarse en fase a la secuencia polipeptídica de tal forma que el anticuerpo se segregue al espacio periplásmico o dentro del medio. Un péptido señal que es funcional en las células huésped deseadas potencia la secreción extracelular del anticuerpo apropiado. El péptido señal puede escindirse del polipéptido tras la secreción de anticuerpo a partir de la célula. Ejemplos de tales señales de secreción se conocen bien e incluyen, *por ejemplo*, aquellas descritas en los documentos US5698435, US5698417 y US6204023.
40

Las células huésped útiles en la presente invención incluyen pero no se limitan a microorganismos tales como bacterias (*por ejemplo*, *E. coli*, *Bacillus subtilis*) transformadas con ADN de bacteriófagos recombinantes, vectores de expresión de ADN plasmídico o de ADN cosmídico que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; levaduras (*por ejemplo*, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas con vectores de expresión de levaduras recombinantes que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión víricos recombinantes (*por ejemplo*, *Baculovirus*) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión víricos recombinantes (*por ejemplo*, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (*por ejemplo*, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de
45

anticuerpos; o sistemas de células de mamíferos (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, 3T3) que albergan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamíferos (*por ejemplo*, promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor de 7,5 K del virus vaccinia).

- 5 El vector puede ser un vector plasmídico, un vector fágico de cadena simple o doble, o un vector vírico de ARN o de ADN de cadena simple o doble. Tales vectores pueden introducirse dentro de células como polinucleótidos por técnicas bien conocidas para introducir ADN y ARN dentro de las células. Los vectores, en el caso de vectores fágicos y víricos también pueden introducirse en células como virus empaquetados o encapsulados por técnicas bien conocidas para la infección y la transducción. Los vectores víricos pueden ser competentes en replicación o defectivos en replicación. En el último caso, la propagación vírica ocurrirá generalmente solamente en células huésped que se complementan. Los sistemas de traducción libres de células pueden emplearse también para producir la proteína usando los ARN derivados de las construcciones de ADN presentes. Tales vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véanse, *por ejemplo*, la Publicación PCT WO 86/05807; Publicación PCT WO 89/01036; y la Patente de los EE.UU. N.º: 5.122.464) y el dominio variable del anticuerpo se puede clonar dentro de un vector de expresión tal de la cadena pesada o ligera completa.

- Los procariotas útiles como células huésped en la presente invención incluyen organismos gram negativos o gram positivos tales como *E. coli* y *B. subtilis*. Los vectores de expresión para usar en células huésped procariotas generalmente comprenden uno o más genes marcadores seleccionables fenotípicos. Un gen marcador seleccionable fenotípico es, por ejemplo, un gen que codifica una proteína que confiere resistencia a antibióticos o que suministra un requerimiento autótrofo. Ejemplos de vectores de expresión útiles para células huésped procariotas incluyen aquellos derivados de plásmidos comercialmente disponibles, tales como el pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia), pGEM1 (Promega Biotec, Madison, Wisconsin, EE.UU.) y las series de vectores pET (Novagen, Madison, Wisconsin, EE.UU.) y pRSET (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, EE.UU.) (Studier, F.W., J. Mol. Biol. 219: 37 (1991); Schoepfer, R. Gene 124: 83 (1993)). Las secuencias promotoras usadas comúnmente por vectores de expresión de células huésped procariotas recombinantes incluyen T7, (Rosenberg, y cols. Gene 56, 125-135 (1987)), β -lactamasa (penicilinas), sistema promotor de lactosa (Chang y cols., Nature 275: 615, (1978); y Goeddel y cols., Nature 281: 544 (1979)), sistema promotor de triptófano (*trp*) (Goeddel y cols., Nucl. Acids Res. 8: 4057, (1980)) y promotor tac (Sambrook y cols., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.)

- Las levaduras útiles en la presente invención incluyen aquellas del género *Saccharomyces*, *Pichia*, *Actinomyces* y *Kluyveromyces*. Los vectores de levadura a menudo contienen una secuencia de origen de replicación de un plásmido de levaduras 2μ , una secuencia que se replica autónomamente (ARS), una región promotora, secuencias para poliadenilación, secuencias para terminación de transcripción y un gen marcador seleccionable. Las secuencias promotoras adecuadas para vectores de levadura incluyen, entre otras, promotores para 3-fosfogliceratocinasa de metalotioneína, para 3-fosfogliceratocinasa (Hitzeman y cols., J. Biol. Chem. 255: 2073, (1980)) o para otras enzimas glicolíticas (Holland y cols., Biochem. 17: 4900, (1978)), tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato decarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucocinasa. Otros vectores y promotores adecuados para usar en expresión de levaduras se describen adicionalmente en Fleer y cols., Gene, 107: 285-195 (1991). Otros promotores y vectores adecuados para levadura y protocolos de transformación de levaduras se conocen bien en la técnica. Los protocolos de transformación de levaduras se conocen bien. Un protocolo tal se describe por Hinnen y cols., Proc. Natl. Acad. Sci., 75: 1929 (1978). El protocolo de Hinnen selecciona transformantes Trp^+ en un medio selectivo.

- Los sistemas de cultivo de células huésped de mamífero o de insecto se pueden emplear también para expresar anticuerpos recombinantes, *por ejemplo*, sistemas de baculovirus para producción de proteínas heterólogas. En un sistema de insecto, -se puede usar el virus de la poliedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV) como un vector para expresar genes exógenos. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante de anticuerpos puede clonarse individualmente dentro de regiones no esenciales (por ejemplo el gen de polihedrina) del virus y situarse sometida al control de un promotor de AcNPV (por ejemplo el promotor de polihedrina).

- Se pueden usar células NSO o células de ovario de hámster chino (CHO) para expresión en células de mamíferos de los anticuerpos de la presente invención. Las secuencias de control transcripcional y traduccional de los vectores de expresión de células huésped de mamífero se pueden escindir de genomas víricos. Las secuencias promotoras y las secuencias potenciadoras comúnmente usadas se derivan de virus de polioma, adenovirus 2, virus de simio 40 (SV40) y citomegalovirus (CMV) humano. Las secuencias de ADN derivadas del genoma vírico de SV40 se pueden usar para proporcionar otros elementos genéticos para expresión de una secuencia de gen estructural en una célula huésped de mamífero, *por ejemplo*, sitios de origen, de promotores tempranos y tardíos, potenciadores, de ajustamiento y de poliadenilación de SV40. Los promotores temprano y tardío víricos son particularmente útiles debido a que ambos se obtienen fácilmente a partir de un genoma vírico como un fragmento que puede contener también un origen vírico de replicación. Vectores de expresión ejemplares para usar en células huésped de mamíferos están comercialmente disponibles.

Polinucleótidos que codifican anticuerpos

La invención proporciona adicionalmente polinucleótidos o ácidos nucleicos, por ejemplo, ADN, que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de la invención y fragmentos de los mismos. Los polinucleótidos ejemplares incluyen aquellos que codifican cadenas de anticuerpos que comprenden una o más de las secuencias descritas en el presente documento. La invención también comprende polinucleótidos que hibridan en condiciones de hibridación rigurosas o de baja rigurosidad con polinucleótidos que codifican un anticuerpo de la presente invención.

Los polinucleótidos pueden obtenerse y la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos determinarse, por cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, si la secuencia de nucleótidos del anticuerpo se conoce, puede ensamblarse un polinucleótido que codifica el anticuerpo a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (*por ejemplo*, como se describe en Kutmeier y cols., *BioTechniques* 17: 242 (1994)), que, brevemente, implica la síntesis de oligonucleótidos solapantes que contienen porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo, el apareamiento y el ligamiento de esos oligonucleótidos y después la amplificación de los oligonucleótidos ligados por PCR.

Alternativamente, un polinucleótido que codifica un anticuerpo puede generarse a partir de ácido nucleico de una fuente adecuada. Si un clon que contiene un ácido nucleico que codifica un anticuerpo particular no está disponible, pero la secuencia de la molécula de anticuerpo se conoce, puede sintetizarse químicamente un ácido nucleico que codifique la inmunoglobulina a partir de una fuente adecuada (*por ejemplo*, una biblioteca de ADNc de anticuerpos, o una biblioteca de ADNc generada a partir de, o ácido nucleico, preferentemente ARN de poliA⁺, aislado de, cualquier tejido o células que expresen el anticuerpo, tales como células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo de la invención) por amplificación de PCR usando cebadores sintéticos hibridables en los extremos 3' y 5' de la secuencia o por clonación usando una sonda oligonucleotídica específica para la secuencia génica particular a identificar, *por ejemplo*, un clon de ADNc de una biblioteca de ADNc que codifique el anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados generados por PCR pueden clonarse después en vectores de clonación duplicables usando cualquier procedimiento bien conocido en la técnica.

Una vez que se determinan la secuencia de nucleótido y la secuencia de aminoácidos correspondiente del anticuerpo, la secuencia de nucleótidos del anticuerpo puede ser manipulada usando procedimientos bien conocidos en la técnica para la manipulación de las secuencias de nucleótidos, *por ejemplo*, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida de sitio, PCR, etc. (véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook y cols., 1990, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. y Ausubel y cols., eds., 1998, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY), para generar anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos diferentes, por ejemplo, para crear sustituciones, deleciones, y/o inserciones aminoácidas.

En una realización específica, la secuencia de aminoácidos de los dominios de cadena pesada y/o cadena ligera se pueden inspeccionar para identificar las secuencias de las CDR mediante procedimientos bien conocidos, *por ejemplo*, por comparación con secuencias de aminoácidos conocidas de otras regiones variables de cadena pesada y ligera para determinar las regiones de hipervariabilidad de secuencia. Utilizando las técnicas de ADN recombinante, una o más de las CDR se pueden insertar dentro de las regiones estructurales, *por ejemplo*, en las regiones estructurales humanas para humanizar un anticuerpo no humano, como se describe anteriormente. Las regiones estructurales pueden ser regiones estructurales que se dan en la naturaleza o de consenso y preferentemente regiones estructurales humanas (véase, *por ejemplo*, Chothia y cols., 1998, *J. Mol. Biol.* 278: 457-479 (1998) para un listado de regiones estructurales humanas). Preferentemente, el polinucleótido generado por la combinación de las regiones estructurales y CDR codifica un anticuerpo que une específicamente un polipéptido de la invención. Preferentemente, como se discute anteriormente, se pueden hacer una o más sustituciones de aminoácidos en las regiones estructurales y preferentemente, las sustituciones de aminoácidos mejoran la unión del anticuerpo a su antígeno. Adicionalmente, tales procedimientos se pueden usar para hacer sustituciones o deleciones de aminoácidos de uno o más residuos de cisteína de región variable que participan en un enlace disulfuro intracatenario para generar moléculas de anticuerpos que carecen de uno o más enlaces disulfuro intracatenarios. Otras alteraciones al polinucleótido están comprendidas por la presente invención y dentro de la habilidad en la técnica.

Además, se pueden usar las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison y cols., 1964, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81: 851-855; Neuberger y cols., 1984, *Nature*, 312: 604-608; Takeda y cols., 1985, *Nature*, 314: 452-454 (1985)) ajustando los genes a partir de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad de antígeno adecuada conjuntamente con genes de una molécula de anticuerpo humana de actividad biológica apropiada. Como se describe anteriormente, un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes partes del anticuerpo se derivan de especies animales diferentes, tal como aquellos que tienen una región variable derivada de un MAb murino y una región constante de inmunoglobulina humana, *por ejemplo*, anticuerpos humanizados.

Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (Patente de los EE.UU. N.º: 4.946.778; Bird, *Science* 242: 423-42 (1988); Huston y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 85: 5879-5883 (1988); y Ward y cols., *Nature* 334: 544-54 (1989)) pueden adaptarse para producir anticuerpos de cadena

individual. Los anticuerpos monocatenarios se forman uniendo los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región de Fv por medio de un puente aminoacídico, dando como resultado un polipéptido de cadena individual. Las técnicas para el montaje de fragmentos Fv funcionales en *E. coli* también puede utilizarse (Skerra y cols., Science 242: 1038-1041 (1988)).

5 Procedimientos de producir anticuerpos anti-IL13

Los anticuerpos de la invención se pueden producir por cualquier procedimiento conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular, por síntesis química o preferentemente, por técnicas de expresión recombinantes.

10 La expresión recombinante de un anticuerpo de la invención, o fragmento, derivado o análogo del mismo, (*por ejemplo*, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo de la invención o un anticuerpo de cadena simple de la invención), requiere la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el anticuerpo o un fragmento del anticuerpo. Una vez un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo se ha obtenido, el vector para la producción del anticuerpo se puede producir por tecnología de ADN recombinante. Se construye un vector de expresión que contiene secuencias codificantes de anticuerpos y señales de control transcripcionales y traduccionales apropiadas. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas de síntesis y recombinación genética *in vivo*.

20 El vector de expresión se transfiere a una célula huésped por técnicas convencionales y las células transfectadas se cultivaron después por técnicas convencionales para producir un anticuerpo de la invención. En un aspecto de la invención, los vectores que codifican tanto las cadenas pesadas como las cadenas ligeras se pueden coexpresar en la célula huésped para expresión de la molécula de inmunoglobulina completa, como se detalla más adelante.

25 Una diversidad de sistemas de vectores de expresión en huésped se puede utilizar para expresar las moléculas de anticuerpos de la invención según se describen anteriormente. Tales sistemas de expresión de huésped representan vehículos por los que las secuencias codificantes de interés pueden producirse y purificarse subsiguientemente, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o se transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, expresar una molécula de anticuerpo de la invención *in situ*. Se utilizan comúnmente células bacterianas tales como *E. coli* y células eucariotas para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante, especialmente para la expresión de molécula de anticuerpo recombinante completa. Por ejemplo, las células de mamífero tales como las células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector tal como el elemento promotor del gen temprano intermedio principal del citomegalovirus humano son un sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foecking y cols., 1998, Gene 45: 101; Cockett y cols., 1990, Bio/Technology 8: 2 (1990)).

35 Además, se puede elegir una cepa de células huésped que module la expresión de las secuencias insertadas, o que modifique y procese el producto génico en una manera deseada específica. Tales modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y tal procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos proteicos puede ser importante para la función de la proteína. Las diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento postraduccional y para la modificación de proteínas y de productos génicos. Se pueden elegir líneas celulares o sistemas de huéspedes apropiados para asegurar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína exógena expresada. Para este fin, pueden usarse células huésped eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario, glucosilación y fosforilación del producto génico. Tales células huésped de mamífero incluyen, pero no se limitan a, CHO, COS, 293, 3T3, o células de mieloma.

40 Para producción de proteínas recombinantes a largo plazo, de alto rendimiento, se prefiere expresión estable. Por ejemplo, pueden manipularse líneas celulares que expresen de forma estable la molécula de anticuerpo. En lugar de usar vectores de expresión que contengan orígenes víricos de replicación, las células huésped pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (*por ejemplo*, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Tras la introducción del ADN exógeno, se puede dejar que las células manipuladas crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido y después se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable del plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite a las células integrar de forma estable el plásmido dentro de sus cromosomas y crecer para formar focos, que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este procedimiento puede usarse ventajosamente para manipular líneas celulares que expresan la molécula de anticuerpo. Tales líneas celulares manipuladas pueden ser particularmente útiles en el examen y evaluación de compuestos que interactúan directamente o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

55 Pueden usarse varios sistemas de selección, incluidos, pero sin limitarse a, los genes de la timidina cinasa del virus herpes simplex (Wigler y col., Cell, 11223 (1977)), de la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 48: 202 (1992)) y genes de la adenina fosforribosiltransferasa (Lowy y cols., Cell, 22: 817 (1980)), se pueden emplear en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. Asimismo, la resistencia antimetabolito puede usarse como base de selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler y col., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 77: 357 (1980); O'Hare y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 78: 1527 (1981)); gpt, que confieren resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981)); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 (Wu y Wu, Biotherapy 3: 87-95 (1991));

e hygro, que confiere resistencia a higromicina (Santerre y cols., Gene 30: 147 (1984)). Pueden aplicarse rutinariamente procedimientos conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante para seleccionar los clones recombinantes deseados y dichos procedimientos se describen, por ejemplo, en Ausubel y cols. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); y en los capítulos 12 y 13, Dracopoli y cols. (eds), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin y cols., J. Mol. Biol. 150: 1 (1981).

Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo se pueden incrementar por amplificación de vector (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, "The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells" (DNA cloning, vol. 3. (Academic Press, Nueva York, 1987)). Cuando un marcador en el sistema de vectores que expresan anticuerpo es amplificable, un incremento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de células huésped incrementará el número de copias del gen marcador. Ya que la región amplificada está asociada con el gen de anticuerpo, la producción de la proteína se incrementará también (Crouse y col., 1983, Mol. Cell. Biol., 3: 257).

La célula huésped puede cotransfectarse con dos vectores de expresión de la invención, codificando el primer vector un polipéptido derivado de cadena pesada y codificando el segundo vector un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos, lo que permite una expresión igual de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Alternativamente, puede usarse un vector individual que codifique polipéptidos y sea capaz de expresar, tanto polipéptidos de cadena pesada como polipéptidos de cadena ligera. En tales situaciones, la cadena ligera debería situarse antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, 1986, Nature 322: 52; Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 77: 2197). Las secuencias codificantes para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez que una molécula de anticuerpo de la invención se ha producido por un animal, se ha sintetizado químicamente, o se ha expresado recombinantemente, se puede purificar por cualquier procedimiento conocido en la técnica para purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, en particular cromatografía por afinidad por el antígeno específico después de Proteína A y cromatografía de exclusión por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de los mismos se pueden fusionar a secuencias de polipéptidos heterólogos descritas en el presente documento o conocidas de otro modo en la técnica, para facilitar purificación.

La presente invención comprende anticuerpos condensados recombinantemente o conjugados químicamente (incluyendo conjugaciones tanto covalentemente como no covalentemente) a un polipéptido. Se pueden usar anticuerpos condensados o conjugados de anticuerpos de la presente invención para facilidad en purificación. Véase, por ejemplo, Harbor y cols., supra, y publicación PCT WO 93/21232; documento EP 439.095; Naramura y cols., Immunol. Lett 39: 91-99 (1994); patente de los EE.UU. N.º: 5.474.981; Gillies y cols., PNAS, 89: 1428-1432 (1992); Fell y cols., J. Immunol., 146: 2446-2452 (1991).

Además, los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la presente invención se pueden fusionar a secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar la purificación. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido hexahistidina, tal como la marca proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, California, 91311), entre otras, muchas de las cuales están comercialmente disponibles. Como se describe en Gentz y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86: 821-824 (1989), por ejemplo, hexa-histidina mantiene la purificación conveniente de la proteína de condensación. Otras etiquetas de péptidos útiles para purificación incluyen, pero no se limitan a, la marca "HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de influenza (Wilson y cols., Cell 37: 767 (1984)) y la marca "flag".

45 **Usos diagnósticos para anticuerpos anti-IL13**

Los anticuerpos de la invención incluyen derivados que están modificados, es decir, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo, de modo que la unión covalente no interfiere con la unión a IL13. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados de anticuerpos incluyen anticuerpos que se han modificado, por ejemplo, por biotilación, HRP, o cualquier otro resto detectable.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden usar, por ejemplo, pero no se limitan a, para purificar o detectar IL13, incluyendo tanto procedimientos diagnósticos *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, los anticuerpos tienen uso en inmunoensayos para medir cuantitativa y cualitativamente niveles de IL13 en muestras biológicas. Véase, por ejemplo, Harlow y cols., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. (1988)).

Como se discute en más detalle más adelante, los anticuerpos de la presente invención se pueden usar bien solos o bien en combinación con otras composiciones. Los anticuerpos pueden estar adicionalmente condensados recombinantemente a un polipéptido heterólogo en el extremo N- o C-terminal o pueden estar conjugados químicamente (incluyendo conjugaciones covalentemente y no covalentemente) a polipéptidos de otras

composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención pueden estar fusionados o conjugados recombinantemente a moléculas útiles como marcas en ensayos de detección.

La presente invención comprende adicionalmente anticuerpos o fragmentos de los mismos conjugados a un agente diagnóstico. Los anticuerpos pueden usarse diagnósticamente para, por ejemplo, monitorizar el desarrollo o progresión de una respuesta alérgica como parte de un procedimiento de realización de pruebas clínicas para, *por ejemplo*, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. Se puede facilitar la detección acoplado el anticuerpo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales que emiten positrones usando diversas tomografías de emisión de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. La sustancia detectable puede estar acoplada o conjugada bien directamente al anticuerpo (o fragmento del mismo) o bien indirectamente, a través de un intermedio (tal como, por ejemplo, un enlazador conocido en la técnica) usando técnicas conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. N.º 4.741.900 para iones metálicos que pueden conjugarse a anticuerpos para usar como agentes de diagnóstico de acuerdo con la presente invención. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; ejemplos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina de fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina, y aecurina; y ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}I o ^{99}Tc .

Los anticuerpos también pueden unirse a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o para purificación del antígeno objetivo. Tales soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, vidrio, celulosa, poliácridamida, nailon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

Anticuerpos marcados, y derivados y análogos de los mismos, que se unen específicamente a IL13 se pueden usar para propósitos de diagnóstico para detectar, diagnosticar, o controlar las enfermedades, trastornos, y/o afecciones asociadas con la expresión aberrante y/o la actividad de IL13. La invención mantiene la detección de expresión de IL13 aberrante, que comprende (a) someter a ensayo la expresión de IL13 en células o fluido corporal de un individuo usando uno o más anticuerpos específicos de la presente invención contra IL13 y (b) comparar el nivel de expresión génica con un nivel de expresión génica estándar, por el que un incremento o decremento en el nivel de expresión de IL13 sometido a ensayo comparado con el nivel de expresión estándar es indicador de expresión aberrante.

Los anticuerpos se pueden usar para detectar la presencia y/o los niveles de IL13 en una muestra, por ejemplo, un fluido corporal o muestra de tejido. El procedimiento de detección puede comprender poner en contacto la muestra con un anticuerpo IL13 y determinar la cantidad de anticuerpo que se une a la muestra.

La invención proporciona un ensayo diagnóstico para diagnosticar un trastorno, que comprende (a) someter a ensayo la expresión de IL13 en células o fluido corporal de un individuo usando uno o más anticuerpos de la presente invención y (b) comparar el nivel de expresión génica con un nivel de expresión génica estándar, por el que un incremento o decremento en el nivel de expresión de gen ensayado comparado con el nivel de expresión estándar es indicativo de un trastorno particular.

Los anticuerpos de la invención pueden usarse para ensayar los niveles de proteínas en una muestra biológica usando procedimientos inmunohistológicos clásicos conocidos por aquellos de habilidad en la técnica (por ejemplo, véanse Jalkanen, y cols., J. Cell. Biol. 101: 976-985 (1985); Jalkanen, y cols., J. Cell. Biol. 105: 3087-3096 (1987)). Otros procedimientos basados en anticuerpos útiles para detectar la expresión génica de proteínas incluyen inmunoensayos, tales como el ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA). Las marcas de ensayo de anticuerpos adecuadas se conocen en la técnica e incluyen marcas enzimáticas, tales como, glucosa oxidasa; radioisótopos, tales como yodo (^{125}I , ^{121}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{112}In) y tecnecio (^{99}Tc); marcas luminiscentes, tales como luminol; y marcas fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina y biotina.

Un aspecto de la invención es la detección y diagnóstico de una enfermedad o trastorno relacionado con expresión aberrante de IL13 en un animal, preferentemente un mamífero y lo más preferentemente un ser humano. En una realización, el diagnóstico comprende: a) administrar (por ejemplo, parenteralmente, subcutáneamente, o intraperitonealmente) a un sujeto una cantidad efectiva de una molécula marcada que une específicamente a IL13; b) esperar durante un intervalo temporal tras la administración permitiendo a la molécula marcada concentrarse preferencialmente en sitios en el sujeto donde el polipéptido se expresa (y para que la molécula no marcada se elimine a nivel de antecedentes); c) determinar el nivel de antecedentes; y d) detectar la molécula marcada en el sujeto, de tal forma que la detección de la molécula marcada por encima del nivel de antecedentes indica que el sujeto tiene una enfermedad o trastorno particular asociado con la expresión aberrante de IL13. El nivel antecedente puede determinarse mediante diversos procedimientos incluyendo, comparar la cantidad de molécula marcada detectada a un valor estándar determinado previamente para un sistema particular.

Se entenderá en la técnica que el tamaño del sujeto y el sistema de formación de imágenes usado determinará la cantidad de resto de formación de imágenes necesario para producir imágenes de diagnóstico. En el caso de un resto de radioisótopo, para un sujeto humano, la cantidad de radioactividad inyectada varía normalmente desde aproximadamente 5 hasta 20 milicurios de ⁹⁹Tc. El anticuerpo marcado o fragmento de anticuerpo se acumulará preferentemente después en la localización de células que contienen la proteína específica. *La formación de imágenes in vivo* se describe en S. W. Burchiel y cols., "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments". (Capítulo 13 en Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S. W. Burchiel y B. A. Rhodes, ed., Masson Publishing Inc. (1982)).

Dependiendo de varias variables, incluyendo el tipo de marcador usado y el modo de administración, el intervalo de tiempo posterior a la administración para permitir que la molécula marcada se concentre preferentemente en sitios en el sujeto y para que la molécula marcada no unida se elimine hasta el nivel antecedente, es de 6 a 48 horas o de 6 a 24 horas o de 6 a 12 horas. En otra realización, el intervalo de tiempo posterior a la administración es de 5 a 20 días o de 5 a 10 días.

En una realización, se lleva a cabo la monitorización de la enfermedad o trastorno repitiendo el procedimiento para diagnosticar la enfermedad o enfermedad, por ejemplo, un mes después del diagnóstico inicial, seis meses después del diagnóstico inicial, un año después del diagnóstico inicial, etc.

La presencia de la molécula marcada puede detectarse en el paciente usando procedimientos conocidos en la técnica para análisis *in vivo*. Estos procedimientos dependen del tipo de marcador usado. Los trabajadores expertos en la técnica serán capaces de determinar el procedimiento apropiado para detectar una marca particular. Los procedimientos y dispositivos que pueden usarse en los procedimientos de diagnóstico de la invención incluyen, pero no se limitan a, tomografía computerizada (TC), escáner de cuerpo entero tal como tomografía por emisión de positrones (TEP), formación de imágenes por resonancia magnética (RM) y sonografía.

En una realización específica, la molécula se marca con un radioisótopo y se detecta en el paciente usando un instrumento quirúrgico que responde a la radiación (Thurston y cols., Patente de los EE.UU. N.º: 5.441.050). En otra realización, la molécula se marca con un compuesto fluorescente y se detecta en el paciente usando un instrumento de análisis que responde a fluorescencia. En otra realización, la molécula se marca con un metal que emiten positrones y se detecta en el paciente usando tomografía de emisión de positrones. En otra realización más, la molécula se marca con un marcador paramagnético y se detecta en un paciente usando formación de imágenes por resonancia magnética (RM).

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para diagnosticar la predisposición de un paciente a desarrollar enfermedades causadas por la expresión de citocinas no regulada. Cantidades incrementadas de IL13 en determinadas células, tejidos, o fluidos corporales del paciente pueden indicar que el paciente está predispuesto a ciertas enfermedades inmunitarias. En una realización, el procedimiento comprende recoger una célula, tejido, o muestra de fluido corporal de un sujeto conocido por tener niveles de IL13 bajos o normales, analizar el tejido o fluido corporal para la presencia de IL13 en el tejido IL13 y predecir la predisposición del paciente a determinadas enfermedades inmunitarias en base al nivel de expresión de IL13 en el tejido o fluido corporal. En otra realización, el procedimiento comprende recoger una muestra de células, tejidos, o fluidos corporales conocidos por contener un nivel definido de IL13 de un paciente, analizar el tejido o fluido corporal para la cantidad de IL13 y predecir la predisposición del paciente a ciertas enfermedades inmunitarias basadas en el cambio en la cantidad de IL13 comparada con un nivel definido o probado establecido para célula, tejido, o fluido corporal normal. El nivel definido de IL13 puede ser una cantidad conocida en base a valores de la bibliografía o se puede determinar por adelantado midiendo la cantidad en célula, tejido, o fluidos corporales normales. Específicamente, la determinación de los niveles de IL13 en ciertos tejidos o fluidos corporales permite específicamente y pronto, preferentemente antes de que tenga lugar la enfermedad, la detección de enfermedades inmunitarias en el paciente. Las enfermedades inmunitarias que pueden diagnosticarse usando el presente procedimiento incluyen, pero no se limitan a, las enfermedades inmunitarias descritas en el presente documento. En la realización preferida, el tejido o fluido corporal es sangre periférica, leucocitos en sangre periférica, tejidos de biopsia tales como biopsias de pulmón o de piel y tejido.

Usos terapéuticos de anticuerpos anti-IL13

Un anticuerpo o uno de sus fragmentos, con o sin un resto terapéutico conjugado a él, administrado solo o en combinación con factor(es) citotóxico(s) se puede usar como un agente terapéutico. La presente invención se refiere a las terapias basadas en anticuerpos que implican la administración de anticuerpos de la invención a un animal, un mamífero, o un ser humano, para tratar una enfermedad mediada por IL13, un trastorno, o una afección. El animal o sujeto puede ser un animal en necesidad de un tratamiento particular, tal como un animal que se ha diagnosticado con un trastorno particular, por ejemplo, uno relacionado con IL13. Los anticuerpos dirigidos contra IL13 son útiles para inhibir reacciones alérgicas en animales, incluyendo pero no limitados a vacas, cerdos, caballos, pollos, gatos, perros, primates no humanos, etc., así como en seres humanos. Por ejemplo, administrando una dosis terapéuticamente aceptable de un anticuerpo, o anticuerpos, de la presente invención, o un cóctel de los presentes anticuerpos, o en combinación con otros anticuerpos o fuentes variadas, una respuesta alérgica a antígenos puede reducirse o eliminarse en el animal tratado.

Los compuestos terapéuticos de la invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de la invención (incluyendo fragmentos, análogos y derivados de los mismos como se describen en el presente documento) y los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos de la invención como se describe a continuación (incluyendo fragmentos, análogos y derivados de los mismos y anticuerpos antiidiotípicos como se describen en el presente documento). Los anticuerpos de la invención se pueden usar para tratar, inhibir o impedir enfermedades, trastornos o afecciones asociadas con expresión aberrante y/o con actividad de IL13, incluyendo, pero no limitados a, uno cualquiera o más de las enfermedades, trastornos, o afecciones descritos en el presente documento. El tratamiento y/o prevención de enfermedades, trastornos, o afecciones asociadas con la expresión aberrante y/o actividad de IL13 incluyen, pero no se limitan a, aliviar al menos uno de los síntomas asociados con esas enfermedades, trastornos o afecciones. Los anticuerpos de la invención pueden proporcionarse en composiciones farmacéuticamente aceptables como se conocen en la técnica o como se describen en el presente documento.

Los anticuerpos anti-IL13 de la presente invención se pueden usar terapéuticamente en una diversidad de enfermedades. La presente invención proporciona un procedimiento para prevenir o tratar enfermedades mediadas por IL13 en un mamífero. El procedimiento comprende administrar una cantidad que impide o que trata enfermedad de anticuerpo anti-IL13 al mamífero. El anticuerpo anti-IL13 se une a IL13 y regula expresión de citocinas y receptores celulares dando como resultado niveles de citocinas característicos de estados no morbosos. Así, las enfermedades para tratamiento incluyen alergia, asma, enfermedad autoinmune, u otras enfermedades inflamatorias. Otras enfermedades alérgicas incluyen rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad alimentaria y urticaria; las enfermedades de la piel mediadas por el sistema inmune incluyen enfermedades vesiculares de la piel, eritema multiforme y dermatitis de contacto, enfermedad autoinmune incluye soriasis, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, enfermedad inflamatoria del intestino (es decir, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn); otras enfermedades asociadas con IL13 incluyen neumonía intersticial idiopática, metaplasia de células calcificantes, enfermedades pulmonares inflamatorias y fibróticas tales como fibrosis quística, enteropatía sensible a gluten y enfermedad de Whipple; enfermedades inmunológicas del pulmón tales como neumonía eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis de hipersensibilidad, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, como neumonía eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad; enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la infección por VRS, uveítis, esclerodermia, osteoporosis y linfoma de Hodgkin.

La cantidad del anticuerpo que será efectiva en el tratamiento, la inhibición y prevención de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión aberrante y/o con la actividad de IL13 puede determinarse por técnicas clínicas estándar. El anticuerpo se puede administrar en regímenes de tratamiento consistentes con la enfermedad, *por ejemplo*, una única dosis o unas pocas dosis durante uno a varios días para mejorar un estado morbozo o dosis periódicas durante un tiempo prolongado para evitar alergia o asma. Además, pueden emplearse opcionalmente ensayos *in vitro* para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosis exacta a emplearse en la formulación también dependerá de la vía de administración y la gravedad de la enfermedad o trastorno y debería decidirse de acuerdo con la opinión del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de curvas de respuesta a dosis derivadas de sistemas de ensayo *in vitro* o de modelos animales.

Para anticuerpos, la dosificación administrada a un paciente es típicamente 0,1 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal del paciente. Preferentemente, la dosificación administrada a un paciente está entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg del peso corporal del paciente, más preferentemente de 1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal del paciente. En general, los anticuerpos humanos tienen una semivida más prolongada dentro del cuerpo humano que anticuerpos a partir de otras especies debido a la respuesta inmune a los polipéptidos exógenos. Por tanto, dosificaciones menores de anticuerpos humanos y una administración menos frecuente son a menudo posibles. Adicionalmente, la dosis y frecuencia de administración de anticuerpos de la invención se pueden reducir mejorando la captación y la penetración tisulares (*por ejemplo*, en el cerebro) de los anticuerpos por modificaciones tales como, por ejemplo, lipídación.

Los anticuerpos de esta invención pueden usarse ventajosamente en combinación con otros anticuerpos monoclonales o quiméricos, o con linfocinas o factores de crecimiento hematopoyético (tales como, *por ejemplo*, IL-2, IL-3, IL-7, IFN), por ejemplo, que sirven para incrementar el número o la actividad de células efectoras que interactúan con los anticuerpos.

Los anticuerpos de la invención puede administrarse solos o en combinación con otros tipos de tratamientos, tales como inmunoterapia, broncodilatadores, moléculas anti-IgE, antihistamínicos, o anti-leucotrienos.

En un aspecto preferido, el anticuerpo está sustancialmente purificado (*por ejemplo*, sustancialmente libre de sustancias que limiten su efecto o produzcan efectos secundarios no deseados).

Se conocen y se pueden usar diversos sistemas de administración para administrar un anticuerpo de la presente invención, incluyendo inyección, *por ejemplo*, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y cols., J. Biol. Chem. 262: 4429-4432 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro vector, etcétera.

- El anticuerpo anti-IL13 se puede administrar al mamífero en cualquier manera aceptable. Los procedimientos de presentación incluyen pero no se limitan a, vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural, inhalación y vías orales. Las composiciones pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección de gran tamaño, por absorción a través de recubrimientos epiteliales o mucocutáneos (*p. ej.*, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir los anticuerpos terapéuticos o composiciones de la invención dentro del sistema nervioso central mediante cualquier vía adecuada, incluyendo inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede facilitarse por un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un reservorio de Ommaya.
- La administración pulmonar puede emplearse también, *p. ej.*, por uso de un inhalador o un nebulizador y por formulación con un agente en aerosol. El anticuerpo se pueden administrar también en los pulmones de un paciente en forma de una composición en polvo seco (véase *por ejemplo*, Patente de los EE.UU. N.º: 6.514.496).
- En una realización específica, puede ser deseable administrar los anticuerpos o composiciones terapéuticas de la invención localmente al área en necesidad de tratamiento; esto puede lograrse, por ejemplo, y no a modo de limitación, por infusión local, aplicación tópica, inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante, siendo dicho implante un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialísticas, o fibras. Preferentemente, cuando se administra un anticuerpo de la invención, se debe tener cuidado al usar materiales a los que la proteína no absorbe.
- En otra realización, las composiciones pueden administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer, *Science* 249: 1527-1533 (1990); Treat y col., en *Liposomes in the Therapy os Infectious Disease and Cancer*, López-Berestein y Fidler (ed.), Liss, Nueva York, páginas 353-365 (1989); López-Berestein, *ibidem*, páginas 317-327; véase en general *ibid.*).
- En aún otra realización, el anticuerpo puede administrarse en un sistema de liberación controlada. En una realización, puede usarse una bomba (véase Langer, *supra*; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14: 201 (1987); Buchwald y col., *Surgery* 88: 507 (1980); Saudek y cols., *N. Engl. J. Med.* 321: 574 (1989)). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos (véase *Medical Applications of Controlled Release*, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Ratón, Fla. (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23: 61 (1983); véase también Levy y cols., *Science* 228: 190 (1985); During y cols., *Ann. Neurol.* 25: 351 (1989); y Howard y cols., *J. Neurosurg.* 71: 105 (1989)). En aún otra realización, un sistema de liberación controlada puede situarse en la proximidad del objetivo terapéutico.
- La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas. Tales composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo y un vehículo fisiológicamente aceptable. En una realización específica, la expresión "fisiológicamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o de un estado o enumerado en la Farmacopea de los EE.UU. o en otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales y más particularmente en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, coadyuvante, excipiente, o vehículo con el que se administra el producto terapéutico. Tales vehículos fisiológicos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol pueden emplearse también como vehículos líquidos, en particular para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada desecada, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, puede contener también cantidades secundarias de agentes humectantes o emulsionantes o agentes tamponadores del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación mantenida y similares. La composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes tradicionales y vehículos tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos estándar tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Ejemplos de vehículos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad efectiva del anticuerpo, preferentemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo tal como para proporcionar la forma para administración apropiada al paciente. La formulación debería adecuarse al modo de administración.
- En una realización, la composición está formulada de acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Donde sea necesario, la composición puede incluir también un agente de solubilización y una anestesia local tal como lignocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se proporcionan bien por separado o bien mezclados juntos en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en forma de polvo liofilizado seco o concentrado exento de agua en un contenedor sellado herméticamente, tal como una ampolla o bolsita indicando la cantidad de agente activo. Cuando

la composición ha de administrarse por infusión, puede dispensarse con una botella de infusión que contenga agua o solución salina estéril de calidad farmacéutica. Cuando la composición se administra por inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina, de manera que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

- 5 La invención también proporciona un envase o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes cargados con uno o más ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Opcionalmente, asociado con tal(es) recipiente(s) puede existir un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regule la fabricación, uso o venta de los productos farmacéuticos o biológicos, aviso que refleja la aprobación por la agencia de la fabricación, uso o venta para administración a seres humanos. Además, los anticuerpos de la presente invención se pueden conjugar con diversas moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, drogas, radionucleótidos, o toxinas. Véanse, *por ejemplo*, las publicaciones PCT WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; Patente de los EE.UU. N.º: 5.314.995; y documento EP 396,387. Un anticuerpo o fragmento del mismo se puede conjugar a un resto terapéutico tal como una citotoxina, *por ejemplo*, un agente citostático o citocida, un agente terapéutico o un ión metálico radiactivo, *por ejemplo*, emisores alfa tales como, por ejemplo, 213Bi. Las citotoxinas o los agentes citotóxicos incluyen cualquier agente que sea perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiantracenediona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracildacarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente, daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

- Las técnicas para conjugar tal resto terapéutico a anticuerpos son bien conocidas; véanse, por ejemplo, Amon y cols., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld y cols. (eds.), páginas 243-56, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom y cols., "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2ª ed.), Robinson y cols. (eds.), páginas 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies'84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera y cols. (eds.), páginas 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin y cols. (eds.), páginas 303-16 (Academic Press 1985) y Thorpe y cols., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* 62: 119-58 (1982). Alternativamente, un anticuerpo puede conjugarse a un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpos. (Véase, por ejemplo, Segal en la Patente de los EE.UU. N.º: 4.676.980).

- Los conjugados de la invención se pueden usar para modificar una respuesta biológica dada, el agente terapéutico o resto de fármaco no debe interpretarse como limitado a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína o un polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, o toxina diftérica; una proteína tal como factor de necrosis tumoral, α -interferón, β -interferón, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador del plasminógeno tisular, un agente apoptótico, *por ejemplo*, TNF- α , TNF- β , AIM I (véase, Publicación Internacional N.º: WO 97/33899), AIM II (véase, Publicación Internacional N.º: WO 97/34911), Ligando Fas (Takahashi y cols., *Int. Immunol.*, 6: 1567-1574 (1994)), VEGF (véase, Publicación Internacional N.º: WO 99/23105), un agente trombotico o un agente antiangiogénico, *por ejemplo*, angiostatina o endostatina; o, modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina 2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulador de colonias de granulocitos ("G-CSF"), u otros factores de crecimiento.

Terapia génica basada en anticuerpos

- 50 En otro aspecto de la invención, los ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican los anticuerpos o derivados funcionales de los mismos, se administran para tratar, inhibir o impedir una enfermedad o trastorno asociado con expresión aberrante y/o actividad de IL13, por medio de terapia génica. El tratamiento génico se refiere al tratamiento realizado mediante la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. En esta realización de la invención, los ácidos nucleicos producen su proteína modificada que media un efecto terapéutico. Cualquiera de los procedimientos para terapia génica disponibles se pueden usar de acuerdo con la invención actual. Los procedimientos ejemplares se describen más adelante.

- Para revisiones generales de los procedimientos de terapia génica, véanse Goldspiel y cols., 1993, *Clinical Pharmacy* 12: 488-505 (1993); Wu y Wu, *Biotherapy* 3: 87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 573-596 (1993); Mulligan, *Science* 260: 926-932 (1993); y Morgan y Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191-217 (1993); mayo, *TIBTECH* 11(5): 155-215 (1993).

En un aspecto, el compuesto comprende las secuencias de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo, siendo dichas secuencias de ácidos nucleicos parte de los vectores de expresión que expresan el anticuerpo o fragmentos o proteínas quiméricas o cadenas pesadas o ligeras de los mismos en un huésped adecuado. En particular, tales secuencias de ácidos nucleicos tienen promotores unidos de manera operable a la región codificante del anticuerpo, siendo dicho promotor inducible o constitutivo y opcionalmente, específico de tejido.

En otra realización concreta, se usan moléculas de ácido nucleico en las que las secuencias codificantes del anticuerpo y cualesquiera otras secuencias deseadas están flanqueadas por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado del genoma, permitiendo así la expresión intracromosómica de los ácidos nucleicos codificantes del anticuerpo (Koller y Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86: 8932-8935 (1989); Zijlstra y cols., Nature 342: 435-438 (1989)). En realizaciones específicas, la molécula de anticuerpo expresada es un anticuerpo monocatenario; alternativamente, las secuencias de ácidos nucleicos incluyen secuencias que codifican las cadenas pesadas y cadenas ligeras, o fragmentos de las mismas, del anticuerpo.

La administración de los ácidos nucleicos en un paciente puede ser directa, en cuyo caso el paciente se expone directamente a los vectores de ácidos nucleicos o portadores de ácidos nucleicos, o indirecta, en cuyo caso, las células se transforman primero con los ácidos nucleicos *in vitro*, después se transplantan en el paciente. Estos dos enfoques son conocidos, respectivamente, como terapia génica *in vivo* o *ex vivo*.

En una realización específica, las secuencias de ácidos nucleicos se administran directamente *in vivo*, donde se expresan para producir el producto codificado. Esto puede lograrse por cualquiera de numerosos procedimientos conocidos en la técnica, *por ejemplo*, por la construcción de ellos como parte de un vector de expresión de ácidos nucleicos apropiados y puede administrarse de tal forma que lleguen a ser intracelulares, *por ejemplo*, por la infección usando vectores retrovíricos u otros vectores víricos (véase por ejemplo la Patente de los EE.UU. N.º: 4.980.286), o por inyección directa de ADN desnudo, o por el uso de bombardeo de micropartículas (*por ejemplo*, una pistola génica; Biolistic, Dupont), o revistiendo con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, por encapsulación en liposomas, micropartículas, o microcápsulas, o administrándolos en engarce a un péptido que se sabe que entra en el núcleo, administrándolos en engarce a un ligando sujeto a endocitosis mediada por receptor (véase, *por ejemplo*, Wu y Wu, J. Biol. Chem. . 262: 4429-4432 (1987)) (que puede utilizarse para señalar como objetivo tipos celulares que expresan específicamente los receptores), etc. En otra realización, se pueden formar complejos de ácidos nucleicos-ligandos en los que el ligando comprende un péptido vírico fusogénico para desbaratar endosomas, permitiendo al ácido nucleico evitar la degradación lisosómica. En aún otra realización, el ácido nucleico puede dirigirse *in vivo* para la captación y expresión específica, marcando como objetivo un receptor específico (véanse, *por ejemplo*, las publicaciones PCT WO 92/06180, WO 92/22635, WO92/20316, WO93/14188, WO 93/20221). Alternativamente, el ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse en el ADN de la célula huésped para su expresión, por recombinación homóloga (Koller y Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86: 8932-8935 (1989); Zijlstra y cols., Nature 342: 435-438 (1989)).

En una realización específica, se usan vectores víricos que contienen secuencias de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo de la invención. Por ejemplo, puede usarse un vector retrovírico (véase Miller y cols., 1993, Meth. Enzymol. 217: 581-599 (1993)). Estos vectores retrovíricos contienen los componentes necesarios para el empaquetamiento correcto del genoma vírico y la integración en el ADN de la célula huésped. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo a usarse en terapia génica se clonaron dentro de uno o más vectores, lo que facilita la administración del gen a un paciente. Pueden encontrarse más detalles acerca de los vectores retrovíricos en Boesen y cols., Biotherapy 6: 291-302 (1994), que describe el uso de un vector retrovírico para administrar el gen *mdr1* a células madre hematopoyéticas con el fin de hacer a las células madre más resistentes a la quimioterapia. Otras referencias que ilustran el uso de vectores retrovíricos en la terapia génica son: Clowes y cols., J. Clin. Invest. 93: 644-651 (1994); Kiem y cols., Blood 83: 1467-1473 (1994); Salmons y Gunzberg, Human Gene Therapy 4: 129-141 (1993); y Grossman y Wilson, Curr. Opin. Gen. y Dev. 3:110-114 (1993).

Los adenovirus se pueden usar también en la presente invención. Los adenovirus son vehículos especialmente atractivos en la presente invención para suministrar anticuerpos a epitelios respiratorios. Los adenovirus infectan naturalmente epitelios respiratorios. Otros objetivos para sistemas de administración basados en adenovirus son hígado, el sistema nervioso central, las células endoteliales y el músculo. Los adenovirus tienen la ventaja de ser capaces de infectar células que no se dividen. Kozarsky y Wilson, Curr. Opin. Gen. Dev. 3: 499-503 (1993) presentan una revisión de la terapia génica basada en adenovirus. Bout y cols., Human Gene Therapy, 5: 3-10, (1994) demostraron el uso de vectores adenovíricos para transferir genes a los epitelios respiratorios de macacos rhesus. Otros ejemplos de usos de adenovirus en terapia génica se pueden encontrar en Rosenfeld y cols., Science 252: 431-434 (1991); en Rosenfeld y cols., 1992, Cell 68: 143-155 (1992); Mastrangeli y cols., J. Clin. Invest. 91: 225-234 (1993); PCT WO94/12649; y Wang y col., 1995, Gene Therapy 2: 775-783 (1995). Los virus adenoasociados (AAV) también se han propuesto para su uso en terapia génica (Walsh y cols., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204: 289-300 (1993); Patente de los EE.UU. N.º: 5.436.146; 6.632.670; 6.642.051).

Otro enfoque para la terapia génica implica transferir un gen a células en cultivo tisular mediante procedimientos tales como electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato de calcio, o infección vírica. Usualmente, el procedimiento de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las células. Después, las

células se someten a selección para aislar las células que han incorporado y expresan el gen transferido. Esas células se administran después a un sujeto.

5 En esta realización, el ácido nucleico se introduce dentro una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. Tal introducción se puede llevar a cabo por procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo pero no limitados a transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector vírico o bacteriofágico que contiene las secuencias de ácidos nucleicos, fusión celular, transferencia génica mediada por cromosomas, transferencia génica mediada por microcélulas, fusión de esferoplastos, etc. Se conocen en la técnica numerosas técnicas para la introducción de los genes exógenos en las células (véase, por ejemplo, Loeffler y Behr, Meth. Enzymol. 217: 599-618 (1993); Cohen y cols., Meth. Enzymol. 217: 618-644 (1993); Cline, Pharmac. Ther. 29: 69-92m (1985)) y se pueden usar de acuerdo con la presente invención, dado que las funciones de desarrollo y fisiológicas de las células receptoras no se desbaratan. La técnica debería estipular la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de forma que el ácido nucleico sea expresable por la célula y preferentemente heredable y expresable por su progenie celular.

15 Las células recombinantes resultantes pueden administrarse a un paciente por diversos procedimientos conocidos en la técnica. Las células sanguíneas recombinantes (p. ej., células madre hematopoyéticas o células progenitoras hematopoyéticas) se administran preferentemente por vía intravenosa. La cantidad de células prevista para su uso depende del efecto deseado, del estado del paciente, etc. y puede determinarse por un experto en la técnica.

20 Las células en las que puede introducirse un ácido nucleico con fines de tratamiento génico abarcan cualquier tipo de célula disponible, e incluyen, pero no se limitan a células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos, células sanguíneas tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos, diversas células madre o progenitoras, en particular células madre hematopoyéticas o células progenitoras hematopoyéticas, *por ejemplo*, como las obtenidas a partir de médula ósea, sangre de cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, etc.

25 En una realización, la célula usada para terapia génica es autóloga para el paciente. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo de la presente invención se introducen en las células de modo que son expresables por las células o por su progenie y las células recombinantes se administran después *in vivo* para efecto terapéutico. En una realización específica, se usan células madre o progenitoras. De acuerdo con esta realización de la presente invención puede usarse potencialmente cualquier célula madre y/o progenitora que pueda aislarse y mantenerse *in vitro* (véanse, por ejemplo, la Publicación PCT WO 94/08598; Stemple y Anderson, Cell 71 1: 973-985 (1992); Rheinwald, Meth. Cell Bio. 21A: 229 (1980); y Pittelkow y Scott, Mayo Clinic Proc. 61: 771 (1986)).

Ejemplos

Ejemplo 1:

Preparación de inmunógeno IL13: una IL13/Fc mutada, humana inactiva (MT-IL13/Fc)

A. Clonación y construcción de un plásmido de expresión para MT-IL13/FC

35 Se informó que IL13 humana con una mutación (ácido glutámico a lisina) en residuo aminoacídico número 13 unió IL13Ra1 con afinidad igual o mayor pero había perdido la capacidad de activar células que llevan IL13Ra1 (Thompson y cols., J. Biol. Chem., 274: 29944 (1999)). Esta IL13 mutada, inactiva, designada MT-IL13, se expresó en células de riñón embrionario humano 293-T. La proteína recombinante purificada se usó como el inmunógeno en la presente invención generando anticuerpos monoclonales anti-IL13. Dos cebadores oligonucleotídicos:

40 5' AAGCTTCCCCAGGCCCTGTGCCTCCCTCTACAGCCCTCAGGAAGCTCAT 3' (SEQ ID NO: 9)

5' CTCGAGGTTGAACCGTCCCTCGCGAAAAAG 3' (SEQ ID NO: 10)

45 que corresponden a la secuencia oligonucleotídica de gen MT-IL13 oligonucleótido se sintetizaron y usaron como plantillas en reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) clonando el gen de IL13 a partir de biblioteca de ADNc de testículos humanos (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA). El fragmento de PCR (342 pares de bases) que carecía de la secuencia peptídica señal predicha de IL13 se ligó en el vector pSecTag/FRT (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contenía una secuencia peptídica señal de secreción en el extremo 5' y una secuencia Fcp1 humana (regiones de bisagra y regiones constantes CH2 y CH3) en el extremo 3'. La composición de las construcciones se confirmó por secuenciación.

B. Producción de MT-IL13/FC a partir de células 293T transfectadas

50 Para expresión transitoria de MT-IL13/FC, el plásmido de ADN purificado se transfectó en células 293T por Lipofectamina 2000 (Invitrogen), de acuerdo con el protocolo del fabricante. A las 72 horas después la transfección, se recogieron por purificación los sobrenadantes de cultivo de células transfectadas. Para la expresión estable de MT-IL13/FC, se establecieron líneas celulares usando una línea celular Flp-In 293T (Invitrogen). Para confirmar la expresión, se analizaron sobrenadantes de cultivo por electroforesis en gel de poli(acrilamida con dodecilsulfato

(SDS-PAGE). Las proteínas separadas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa y se detectaron por reacción con anticuerpo monoclonal (Fc) IgG anti-IgG (Fc) humana de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Sigma, San Luis, MO) o con anticuerpos anti-IL13 de cabra policlonales (R & D Systems, Mineápolis, MN), que se detectan después con IgG anti-cabra de burro con HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Las proteínas inmunorreactivas se identificaron en una película, usando detección quimioluminiscente potenciada (Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce, Rockford, IL).

C. Purificación de MTIL13/Fc

Se purificó MT-IL13/Fc con columna de afinidad de proteína hiper-D (Invitrogen) equilibrada con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después de aplicar el sobrenadante del cultivo celular a la columna, la resina se lavó con más de 20 volúmenes de columna de PBS. Entonces, la resina se lavó con tampón de SCC (citrato sódico 0,05 M, cloruro sódico 0,5 M, pH 6,0) retirando proteínas no unidas. Las proteínas de fusión IL13 se eluyeron después (citrato sódico 0,05 M, cloruro sódico 0,15 M, pH 3,0) y se dializaron en PBS.

Las fracciones de la columna de afinidad que contienen MT-IL13/FC se analizaron por SDS-PAGE. La pureza de las proteínas se analizó por tinción con Azul de Coomassie y la identidad de las proteínas se analizó por inmunotransferencia de Western usando anticuerpo anti-IgG (Fc) humana de cabra (Sigma) y anticuerpo anti-IL13 humana de cabra (R & D Systems) como se describe anteriormente.

Ejemplo 2:

Generación de anticuerpos monoclonales anti-IL13

Ratones A/J machos (Harlan, Indianápolis, IN), 8-12 semanas de edad, se inyectaron subcutáneamente con MT-IL13/Fc 20 μ g en coadyuvante de Freund completo (Difco Laboratories, Detroit, MI) en 200 μ l de PBS a pH 7,4. A intervalos de dos semanas los ratones se inyectaron dos veces subcutáneamente con 20 μ g de MT-IL13/FC en coadyuvante de Freund incompleto. Después, dos semanas y tres días antes del sacrificio, los ratones se volvieron a inyectar intraperitonealmente con 20 μ g del mismo inmunógeno en PBS. Las células de bazo aisladas a partir de uno o más ratones inmunizados por antígenos se usaron para fusión. Se usaron también después procedimientos similares de inmunización y fusión con IL-13 humana expresada en *E. coli* (R & D Systems) como inmunógeno.

En la fusión que conduce a la generación de MAb 228B/C-1 anti-IL-13, se combinaron células del bazo $26,4 \times 10^6$ y células del bazo $58,8 \times 10^6$ a partir de dos ratones inmunizados. Para cada fusión, se prepararon suspensiones celulares individuales a partir del hígado de ratones inmunizados y se usaron con células de mieloma Sp2/0. Se fusionaron células Sp2/0 y células del bazo en una proporción 1:1 en un medio que contenía polietilenglicol al 50 % (P.M. 1450) (Kodak, Rochester, NY) y dimetilsulfóxido al 5 % (Sigma). Las células se ajustaron después a una concentración de $1,5 \times 10^5$ células del bazo por 250 μ l de la suspensión en medio DMEM (Invitrogen, CA), suplementado con suero bovino fetal al 10 %, 100 unidades/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomina, hipoxantina 0,1 mM, aminopterina 0,4 μ M y timidina 16 μ M. Se añadieron doscientoscincuenta microlitros de la suspensión celular a cada pocillo de aproximadamente cincuenta placas de microcultivo de 96 pocillos. Después de aproximadamente diez días de cultivo se retiraron los sobrenadantes para examinar para reactividad con MT-IL13/Fc en ELISA.

Se revistieron placas de microensayos de pocillos de Imulon 2 (Dynatech Laboratories, Chantilly, VA) añadiendo MT-IL13/Fc purificada (0,1 μ g/ml) durante toda una noche a temperatura ambiente. Después se retiró la solución de revestimiento quitando de la placa, se añadieron a cada pocillo 200 μ l de un tampón de bloqueo/dilución (PBS conteniendo seroalbúmina bovina al 2 % y TWEEN® 20 al 0,05 %) durante una hora bloqueando los sitios no específicos.

Una hora más tarde, los pocillos se lavaron después con tampón PBST (PBS conteniendo TWEEN® 20 al 0,05 %). Se recogieron cincuenta microlitros de sobrenadante de cultivo de cada pocillo de fusión, se mezclaron con 50 μ l de tampón de bloqueo/dilución y después se añadieron a los pocillos individuales de las placas de microensayo. Después de una hora de incubación, los pocillos se lavaron con PBST. Los anticuerpos murinos unidos se detectaron después por reacción con IgG antirratón (específica de Fc) de cabra conjugada con HRP (Jackson ImmunoResearch Lab, West Grove, PA) y se diluyeron a 1:2.000 con el tampón de bloqueo/dilución. Se añadieron a los pocillos solución de sustrato de peroxidasa conteniendo 3,3,5,5-tetrametilbenzidina al 0,1 % (Sigma, San Luis, MO) y peróxido de hidrógeno al 0,003 % (Sigma) para el desarrollo de color durante 30 minutos. La reacción se terminó por la adición de 50 μ l de H₂SO₄ 2 M por pocillo. La D.O.₄₅₀ de la mezcla de reacción se midió con un Lector de ELISA BioTek (BioTek Instruments, Winooski, VM).

Los sobrenadantes de cultivo de los pocillos positivos de rastreo de MT-IL13/Fc se probaron después para unión negativa a una proteína de fusión de Fy1 irrelevante. Los pocillos positivos finales se seleccionaron después para la clonación de células únicas por dilución limitante. Los sobrenadantes de cultivo de anticuerpos monoclonales se volvieron a ensayar confirmando su reactividad por ELISA. Los hibridomas seleccionados se cultivaron en matraces de agitación y en el sobrenadante de cultivo gastado recogido por purificación por cromatografía de afinidad con proteína A.

Los anticuerpos purificados se probaron por cuatro ensayos: i) Reactividad cruzada con MT-IL13/Fc expresada en células 293T y IL13 de ratón expresada en *E. coli*; ii) Inhibición de proliferación de IL13-autocrina de células HDLM-2 y células L-1236; iii) Inhibición de la fosforilación de STAT6 inducida por IL13 en células THP-1; e iv) Inhibición de CD14 IL13-regulada y expresión de CD23 en monocitos humanos.

- 5 Setenta y tres MAb anti-IL13 se obtuvieron de las fusiones llevadas a cabo en ratones inmunizados MT-IL13/Fc e IL13. Treintinueve de estos MAb se purificaron por caracterización por ELISA y ensayos basados en células. Trece de estos 39 MAb inhibieron proliferación inducida por IL13 autocrina de células HDLM-2 y células L-1236 (véase la descripción del ensayo y los resultados en el Ejemplo 5). Se encontró que cuatro de los MAb son muy fuertemente reactivos con IL13 humana en ELISA y se neutralizaron frente a la IL13 humana en ensayos basados en células funcionales. Estos MAb se designaron Mab 228B/C-1, 228A-4, 227-26, y 227-43. Estos anticuerpos se generaron todos usando la MT-IL13/Fc glicosilada como inmunógeno.

Ejemplo 3:

Reactividad de anticuerpos monoclonales anti-IL13 con IL13 humana y murina en ELISA

- 15 La reactividad de diversos anticuerpos monoclonales anti-IL13 se probó por ELISA. Diferentes pocillos de placas de microensayos de 96 pocillos se revistieron bien con IL13 humana no glicosilada expresada en *E. coli* (R & D Systems), bien con MT-IL13/Fc glicosilada expresada en células 293T, o bien con IL13 de ratón expresada en *E. coli* (R & D Systems) por la adición de 100 μ l de proteína IL13 a 0,1 μ g/ml en PBS. Después de incubación durante toda una noche a temperatura ambiente, los pocillos se trataron con PBSTB (PBST conteniendo BSA al 2 %) saturando los sitios de unión que quedan. Los pocillos se lavaron después con PBST.

- 20 Se añadieron cien microlitros de MAb anti-IL13 diluidos de forma seriada dos veces (0,5 μ g/ml (3,33 nM) a 0,05 ng/ml (0,00033 nM)) a los pocillos durante 1 hora a temperatura ambiente. Un MAb JES-5A2 anti-IL13 desde (BD Biosciences-Pharmingen, San Diego, CA) también se sometió a ensayo como un control positivo. Este anticuerpo se generó usando IL13 humana expresada en *E. coli* como inmunógeno. Se usó un MAb gp120 anti-VIH-1 murino de isotipo concordante como un control negativo irrelevante. Los pocillos se lavaron después con PBST. El anticuerpo unido se detectó por incubación con HRP-IgG (Fc) de cabra anti-ratón diluido (Jackson ImmunoResearch) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadió después solución de sustrato peroxidasa para el desarrollo de color como se describe anteriormente. La D.O.₄₅₀ se midió usando un lector de ELISA.

- 30 La fig. 1 muestra la unión dependiente de dosis de MAb anti-IL13 228B/C-1, 228A-4, 227-26, 227-43 y el control negativo en ELISA. Entre estos Mab, 228B/C-1 mostró la reactividad más fuerte. La fig. 2 muestra la unión dependiente de dosis de los MAb anti-IL13 para MT-IL13/Fc en ELISA. 228B/C-1 y 228A-4 mostraron la reactividad más fuerte con MT-IL13/Fc, mientras que 227-26 y 227-43 mostraron reactividad moderada.

Las figuras 1 y 2 muestran que 228B/C-1 tiene mayor afinidad tanto por las IL13 humanas glicosiladas como por las IL13 humanas no glicosiladas entre los MAb anti-IL13 puestos a prueba. Todos estos MAb anti-IL13 no reaccionaban de forma cruzada con IL13 de ratón en ELISA (datos no mostrados).

35 Ejemplo 4

Falta de competencia de unión de 228B/C-1-Hrp a IL13 humana por JES10-5A2

- 40 Abordando si JES10-5A2 y 228B/C-1 se unen al mismo epítipo en IL13 humana, se usó un ELISA de competición examinando el efecto de JES10-5A2 sobre unión de 228B/C-1-HRP a IL13 humana expresada en *E. coli*. Cada pocillo de placas de microensayo de 96 pocillos se incubó con 100 μ l de proteína IL13 a 0,1 μ g/ml en PBS. Después de incubación durante toda una noche a temperatura ambiente, los pocillos se trataron con PBSTB (PBST conteniendo BSA al 2 %) saturando los sitios de unión que quedan. Los pocillos se lavaron después con PBST. Se mezclaron cincuenta microlitros de 228B/C-1 y JES10-5A2 diluidos de forma seriada dos veces (a partir de una concentración final de 20 μ g/ml a 9,76 ng/ml) con 50 μ l de 228B/C-1-HRP pre-titrado (a dilución de 1:6.400). Las mezclas se añadieron después a los pocillos y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadió después solución de sustrato peroxidasa para el desarrollo de color como se describe anteriormente. La D.O.₄₅₀ se midió usando un lector de ELISA.

La fig. 3 demuestra que JES10-5A2 no compite con la unión de 228B/C-1-HRP IL13 a IL13 humana, indicando que 228B/C-1 y JES10-5A2 se unen a diferentes sitios en IL13 humana.

Ejemplo 5

- 50 **Examen de anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-IL13 por un ensayo de proliferación dependiente de IL-13-autocrina usando células L-1236 y células HDLM-2**

L-1236 y HDLM-2 son las líneas celulares de linfoma de Hodgkin obtenidas a partir de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ, Braunschweig, Alemania). Estas líneas celulares producen IL13 que a su vez activa su proliferación celular en una manera autocrina (Kapp U. y cols., J. Exp. Med. 189: 1939 (1999)).

Se cultivaron células (25.000 células/pocillo) en presencia o ausencia de diferentes MAb anti-IL13 (0,2, 0,02 y 0,002 $\mu\text{g/ml}$) en CO_2 al 5 % a 37 °C durante 3-5 días. La proliferación celular se midió después bien por un ensayo usando el compuesto de tetrazolio MTS (Promega, Madison, WI) (lecturas a D.O.₄₉₀) o por la incorporación de ³H-timidina (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

- 5 La adición de un MAb neutralizante anti-IL13 al cultivo de estas líneas celulares se espera que inhiba su proliferación mediante la unión y la inactivación del IL13 producido por estas células. Los resultados ilustrados en la Figura 4 muestran el efecto de MAb anti-IL13 de la presente invención sobre la proliferación de células L-1235. MAb 228B/C-1 muestra la mayor potencia de inhibición de proliferación celular L-1236 de una manera dosodependiente entre los anticuerpos neutralizantes. TA1-37 (un tratamiento con IL13 usando MAb generado por E. coli IL13 humana expresada como inmunógeno) no tenía actividad inhibitora alguna incluso a una dosis tan alta como 0,2 $\mu\text{g/ml}$. Se obtuvieron resultados similares con células HDLM-2.

Ejemplo 6

Ensayo para expresión de CD14 y CD23 regulada por IL13 en monocitos humanos primarios

- 15 IL13 induce supresión de expresión de CD14 y la regulación al alza en la expresión de CD23 en los monocitos humanos (de Waal Malefyt y cols., J. Immunol., 151: 6370 (1993), Chomarat y cols., Int. Rev. Immunol., 17: 1 (1998)). Se aislaron leucocitos de sangre periférica (PBL) a partir de sangre completa heparinizada, recién recogida de donantes humanos sanos por centrifugación de densidad de gradiente en Histopaque-1077 (Sigma). Se añadieron PBL ($1,5 \times 10^6$) suspendidos en medio RPMI-1640 (Invitrogen) con suero fetal bovino al 5 % a cada pocillo de una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos que contenían IL13 recombinante (final 10 ng/ml = 0,813 nM) y un anticuerpo monoclonal anti-IL13 o un anticuerpo irrelevante (diluciones seriadas tres veces, a partir de 12 $\mu\text{g/ml}$ = 80 nM finales). La expresión de CD14 o la expresión de CD23 en monocitos se suprimió o se reguló al alza, respectivamente, por la adición de IL13 humana 0,813 nM al medio de incubación. El control del medio contenía medio RPMI-1640/FBS sin IL13 recombinante.

- 25 Las células se incubaron en CO_2 al 5 % a 37 °C durante 2 días. Las células se recogieron por tinción con anti-CD14-FITC o anti-CD23-PE (BD Biosciences-Pharmingen). Los niveles de expresión de CD14 y CD23 en la población de monocitos se midieron por citometría de flujo y se representaron por la Intensidad de Fluorescencia Mediana (MFI).

- 30 Los efectos de Mab anti-IL13 en expresión de CD14 suprimida por IL13 en monocitos humanos se representan en la figura 5. Entre todos los MAb anti-IL13 probados, 228B/C-1 tuvo la potencia más alta en inhibir el efecto de IL13 en expresión de CD14. La inhibición completa del efecto de IL13 se logró a 0,33 nM. Las actividades inhibitoras de Mab 227-26 y 228A-4 fueron moderadas, mientras que la de JES10-5A2 fue débil. El efecto de IL13 no ha podido ser completamente inhibido por el documento JES10-5A2 incluso a 80 nM.

- 35 Los efectos de Mab anti-IL13 en regulación al alza de CD23 inducida por IL13 en monocitos humanos se representan en la figura 6. De forma similar a los resultados en expresión de CD14 (figura 5), 228B/C-1 fue más potente en inhibir el efecto de IL13 en expresión de CD23 entre los Mab anti-IL13 probados. Se logró inhibición completa por 228B/C-1 a 0,33 nM. La potencia inhibitora de JES10-5A2 fue débil.

Basándose en los resultados presentados en las figuras 5 y 6, la inhibición completa de IL13 por 228B/C-1 puede lograrse a una proporción estequiométrica molar de 1:2 (MAb:IL13) y por lo tanto, 228B/C-1 es un MAb neutralizante de afinidad muy alta de MAb frente a IL13 humana.

Ejemplo 7

40 Ensayo de fosforilación de STAT6 inducida por IL13 en células THP-1

IL13 puede activar la línea de células mieloides THP-1 (ATCC, Manassas, VA) induciendo fosforilación de STAT6 que es un paso crítico en la ruta de transducción de señales de IL13 (Murata T y cols., Int. Immunol. 10: 1103-1110 (1998)). Los Mab anti-IL13 se probaron para inhibición de IL13 en este ensayo.

- 45 Las células THP-1 se mantuvieron en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) (Invitrogen) suplementado con suero fetal bovino al 5 %. En el día de los experimentos, las células se lavaron y se incubaron en DMEM libre de suero a 37 °C en CO_2 al 5 % durante 2 horas. Las células $0,3 \times 10^5$ en 80 μl de medio libre de suero se añadieron después a cada pocillo de una placa de fondo redondo de 96 pocillos. Cientoveinte microlitros de medio que contienen IL13 humana (concentración final de 10 ng/ml = 0,813 nM) y MAb anti-IL13 (diluciones seriadas 5 veces, a partir de la concentración final de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ = 3,333 nM). Los pocillos de control negativo bien no contienen nada de IL13 o bien contienen IL13 y un MAb de ratón irrelevante de isotipo concordante.

- 55 Las mezclas se incubaron a 37 °C a CO_2 al 5 % durante 10 minutos. Las placas se centrifugaron después a 300 x g durante 3 minutos a 4 °C. Después de desechar el sobrenadante, los sedimentos celulares se resuspendieron en 100 μl de tampón de muestra no reductora de Laemmli (tampón de carga de SDS-PAGE, BioRad, CA) y después se transfirieron a tubos de microcentrifuga. Los tubos se calentaron a 95 °C durante 5 minutos y después se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se recogieron y se

analizaron por SDS-PAGE de gradiente al 4-20 %. Las proteínas separadas se transfirieron a membranas de PVDF que después se incubaron con MAb anti-Stat6 humano (Y641, fosfoespecífico) de ratón (BD Biosciences Pharmingen) diluido.

5 El anticuerpo unido se detectó por anticuerpos IgG antiratón de cabra conjugados con HRP (Fc) (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Las proteínas inmunorreactivas se identificaron en una película, usando detección potenciada de quimioluminiscencia (Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce). La fig. 7 representa los resultados del efecto de Mab anti-IL13 sobre fosforilación inducida por IL13 de Stat6 en células THP-1. Stat6 se fosforila en las células THP-1 tratadas con IL13 humana 0,813 nM. La inhibición dependiente de la fosforilación Stat6 se encontró cuando las células se trataron con Mab 228B/C-1, 228A-4, 227-26, 227-43 y JES10-5A2. MAb 228B/C-1 es el más potente neutralizando anticuerpos entre los Mab anti-IL13 probados. La inhibición completa por 228B/C-1 se logró a una concentración entre 0,667 nM y 0,133 nM. La proporción estequiométrica molar aproximada entre 228B/C-1 y IL13 para inhibición completa fue de 1:2. Es consistente con los datos mostrados en las figuras 5 y 6.

Ejemplo 8

15 **Clonación molecular de genes de cadenas pesada y ligera que codifican los anticuerpos monoclonales anti-IL13**

El RNA total se aisló a partir de células de hibridoma usando un kit de QIAGEN (Valencia, CA). Se llevó a cabo reacción de transcripción reversa (ADNc de primera hebra) como sigue: 1-1,5 mg de ARN total se mezcló con 1 ml de dNTP 10 mM, 50 ng de hexámeros al azar y agua libre de RNasa en un volumen final de 12 ml.

20 La mezcla de reacción se incubó a 65 °C durante 5 minutos y se situó en hielo inmediatamente durante 1 minuto. Después de una breve centrifugación, se añadieron los reactivos siguientes: 4 ml de tampón de primera hebra 5X (Tris-HCl 250 mM, pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM), 2 ml de DTT 0,1 mM y 1 ml de inhibidor de RNasa RNaseOUT (40 U/ml). Después de mezclar, la reacción se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se añadió después un mililitro de Superscript II TR (50 U/ml) a la mezcla para incubación a 25 °C durante 10 minutos seguidos por 50 minutos a 42 °C. Después de una breve centrifugación, la reacción se incubó durante 15 minutos a 70 °C inactivando la transcriptasa reversa. Un microlitro de ARNasa H (2 U/ml) se añadió después y la reacción se incubó durante 20 minutos a 37 °C destruyendo el ARN.

30 Amplificando las regiones variables de cadenas pesadas y cadenas ligeras, se usó un procedimiento descrito por O'Brien y Jones (O'Brien S. y Jones T., "Humanizing antibodies by CDR grafting". Antibody Engineering, Springer Lab manual, Eds. Kontermann y Doble, S (2001)). Brevemente, se seleccionaron cebadores 5' a partir de la región peptídica de señalización (11 grupos para la cadena ligera y 12 grupos de cebadores degenerados para la cadena pesada) y se seleccionaron cebadores 3' a partir de la región constante bien de cadena ligera o bien de cadena pesada. Se mezclaron cebadores de 5' y 3' (1,5 ml de 10 mM) con 5 ml de tampón de PCR 10X (Tris-HCl 250 mM, pH 8,8, MgSO₄ 20 mM, KCl 100 mM, (NH₄)₂ SO₄ 100 mM, Tritón X-100 al 1 %, BSA libre de nucleasa 1 mg/ml), 1 ml de ADNc según se preparó anteriormente, 1 ml de u.f.c. Turbo (Stratagene) y agua ajustando el volumen total de la reacción a 50 ml. La PCR se llevó a cabo como sigue: 1 ciclo a 94 °C durante 4 minutos; 25 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, a 53 °C durante 30 segundos y a 72 °C durante 45 segundos; y 1 ciclo a 72 °C durante 7 minutos. Las mezclas de reacción se resolvieron por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %.

40 EL fragmento de ADN amplificado se purificó y clonó en un vector pcDNA3.1. La clonación se llevó a cabo usando el kit de clonación de Invitrogen TOPO siguiendo el protocolo sugerido del fabricante (Invitrogen). Se usaron para la purificación de plásmidos de quince a veinte colonias de E. coli transformadas. Los plásmidos se secuenciaron usando un cebador de T7. Las secuencias predominantes para las cadenas pesadas y ligeras se clonaron en un vector de expresión de M13 Fab por mutagénesis de hibridación (Glaser S. y cols. Antibody Engineering (Oxford University Press, Nueva York (1995)), Near RI, BioTechniques 12: 88 (1992)). Las propiedades de unión del Fab expresado se confirmaron por ELISA. Las figuras 8-10 representan secuencias añadidas de aminoácidos VH y VL para 228B/C, 228A-4 y 227-26, respectivamente.

Ejemplo 9

Humanización del clon 228B/C

A. Protocolo General

50 Las regiones variables de anticuerpo murino 228B/C se clonaron y se secuenciaron según se describe en el Ejemplo 8. Un Fab quimérico en un vector fágico se construyó como un control que combina las regiones variables del 228B/C y la región constante de la cadena kappa humana y la parte CH1 de la IgG humana.

55 Iniciando el procedimiento de humanización, una secuencia de genes *v* adecuados seleccionada a partir de las secuencias génicas de línea germinal humana conocida proporciona las regiones estructurales una a tres (FM1-FM3) y una secuencia génica J se seleccionó proporcionando estructura 4 (FM4) de acuerdo con los criterios descritos en el documento WO04/070010. Este modelo puede elegirse en base a, *por ejemplo*, su longitud general,

el tamaño de las CDR, los residuos aminoacídicos situadas localizados en la unión entre la estructura y las CDR, la homología general, etcétera. El modelo elegido puede ser una mezcla de más de una secuencia o puede ser una plantilla.

5 La construcción de un vector de expresión que comprende las variantes de cadenas pesadas y/o ligeras generadas comprendía las fórmulas:

FRH1-CDRH1-FRH2-CDRH2-FRH3-CDRH3-FRH4(i) y

FRL1-CDRL1-FRL2-CDRL2-FRL3-CDRL3-FRL4 (ii),

10 en las que FRH1, FRH2, FRH3, FRH4, FRL1, FRL2, FRL3 y FRL4 representan las variantes de las secuencias de cadenas pesadas y de cadenas ligeras de plantillas estructurales elegidas a partir de las plantillas de línea germinal y las CDR representan aquellas del anticuerpo parental. Las diferencias entre las secuencias del anticuerpo parental murino y de la plantilla humana seleccionada se determinaron sirviendo como una base para generar una biblioteca de Fab de anticuerpo. Esta colección se puede generar para la cadena ligera individualmente y después para la cadena pesada o simultáneamente. La afinidad de la maduración de las regiones CDR puede también ser analizarse simultáneamente o secuencialmente con la humanización de la estructura.

15 La biblioteca de Fab de variantes se generó conteniendo (1) los residuos de aminoácido murino, (2) el residuo de aminoácido del gen de la línea germinal humana, u opcionalmente, (3) un aminoácido seleccionado al azar, en cada una de las posiciones seleccionadas encontradas que difieren de la secuencia estructural murina. Las variantes deseadas se generaron fusionando oligonucleótidos solapantes y después incorporando el residuo elegido en las posiciones marco que eran de interés. Se hizo una amplificación del producto fusionado usando dos cebadores, uno
20 de los cuales estaba marcado con biotina. La marca de biotina se usó para la purificación de una hebra individual del cebador y ésta se usó como un oligo mutagénico en una reacción de mutagénesis basada en Kunkel usando el vector de interés en un formato de U-plantilla (Rosok, M. J., y cols., (1996) *Journal of Biological Chemistry* 271: 22611-22618). Después de fusionar y elongar el plásmido, la reacción sufrió digestión con una enzima de restricción única, XbaI, que escinde la plantilla original, pero no la hebra mutada recién sintetizada. El plásmido se electroporó
25 en células competentes para amplificación y se mezcló con una célula tipo *E. coli* competente de fago para generación de partículas de fagos. Las construcciones de plásmidos son capaces de sintetizar un Fab que se secreta dentro del sobrenadante. Se seleccionaron placas individuales y los anticuerpos se eluyeron para análisis.

30 La biblioteca se analizó para calidad y completitud. Tras secuenciar un muestreo al azar de la biblioteca, se determinó el número de candidatos seleccionados que tenían la inserción correcta de la región Vk (o Vh). Este número se usó determinando la eficacia general de la biblioteca. Una vez que estableció la biblioteca, los candidatos se analizaron usando un ensayo basado en ELISA funcional determinando qué candidatos produjeron Fab específicos para IL-13. Aquellos candidatos que demostraron actividad para IL-13 comparable con el clon quimérico se sometieron a ensayo adicionalmente para reproducibilidad. Varios de los candidatos se secuenciaron determinando como de tolerantes fueron las posiciones estructurales marcadas como objetivo para la humanización.

35 Después de que se encontró que las bibliotecas eran representativas, se analizaron variantes determinando la afinidad de unión y se secuenciaron aquellas que se encontró que tenían afinidad de unión comparable o mayor que el anticuerpo de control quimérico. Si los aislados analizados no contenían un residuo de línea germinal humana en una posición conocida en la estructura, se concluyó que el residuo de aminoácidos humano no se toleró en esa posición. En este punto, si solamente se prueban los aminoácidos murinos y humanos, se puede hacer otra
40 biblioteca de Fab disponiendo al azar los aminoácidos en las posiciones donde los residuos humanos de plantilla no se encontraron. Los Fab con residuos de sustitución adecuados (no murinos) no deberían seleccionarse y convertirse en MAb completos. Además, las plantillas consenso se pueden usar como la estructura inicial.

B. Humanización de Vk de anticuerpo monoclonal contra IL-13

45 La humanización de la región variable de cadena ligera (Vk) se llevó a cabo primero. Sin embargo, alguien puede empezar con cualquiera de las cadenas o humanizar ambas cadenas simultáneamente. La plantilla humana elegida fue la Plantilla Humana 2 e implicó estudiar los efectos en 9 residuos cercanos a las CDR dentro de la cadena ligera determinando si podrían humanizarse sin una pérdida de actividad funcional. Las posiciones que se han estudiado en la cadena ligera para la segunda ronda de examen fueron 4, 9, 12, 73, 81, 82, 83, 84 y 109.

50 Se generó una biblioteca variando cada una de estas posiciones bien con el residuo de plantilla murino o bien con el residuo de plantilla humano. Se examinaron aproximadamente 860 variantes usando un ensayo de ELISA funcional. Solamente 18 candidatos demostraron una función comparable al clon quimérico. Estos candidatos se ensayaron adicionalmente. Seis candidatos de los 18 demostraron una afinidad mayor por antígenos comparados con el clon quimérico y estos 6 se secuenciaron. Los resultados de secuenciación se presentaron en fig. 11A y B y a partir de estos resultados, las posiciones 4, 12 y 81 favorecen al residuo murino.

55 C. Humanización de Vh

Con el fin de evaluar la contribución de los residuos estructurales de cadena pesada a la función general del anticuerpo candidato, se estableció una biblioteca variando 10 posiciones dentro de la estructura de plantilla DP27 humana que difirieron de la parental murina, manteniendo mientras la cadena ligera murina. La biblioteca se generó usando oligonucleótidos solapantes sintetizados para la Vh y la generación de la Vk murina usando PCR. Los Vk y Vh se insertaron después dentro del vector de expresión de Fab usando mutagénesis y la biblioteca se escaneó después en busca de Fab funcionales. La complejidad de la biblioteca fue $(2^{10}/70\%) \times 3 = 3840$.

Se rastrearon un total de 1056 candidatos, usando un ensayo de ELISA de formato de 96 pocillos. Los candidatos a partir de esta biblioteca que se eligieron para secuenciación fueron aquellos que produjeron los valores más altos a partir de los resultados de la pantalla. Cinco de estos candidatos de alta actividad se secuenciaron determinando su nivel de humanización y sus secuencias se presentaron en la fig. 12A y B. A partir de estos resultados, tres de los residuos estructurales en la cadena pesada favorecieron el residuo de ratón (n.º: 24, 68 y 94).

La segunda estructura estudiada fue la plantilla humana NEW. Se generó una biblioteca combinatoria en la que tanto las Vk como las Vh se humanizaron simultáneamente. Nueve residuos en la Vk estaban variados entre los residuos murinos y humanos y se eligieron también nueve residuos para la Vh. Se rastrearon aproximadamente 5200 candidatos (55 placas de 96 pocillos) a partir de esta biblioteca. A partir de la pantalla, aproximadamente 300 candidatos proporcionaron resultados comparables con el clon quimérico. A partir de este grupo, se secuenciaron treinta candidatos determinando el nivel de humanización de estos clones funcionales.

Los resultados de secuenciación de las cadenas ligeras se presentaron en la figura 11A y B. Las secuencias de cadenas pesadas se presentaron en la fig. 12 A y B. La posición 83 en la Vk tuvo una incidencia alta para retención del residuo murino, mientras que varias posiciones en la plantilla de Vh favorecieron el residuo murino. En particular, la posición 94 retuvo el residuo murino en 29 de los 30 candidatos examinados. Aunque ningún candidato pareció tener estructuras completamente humanizadas, varias regiones variables que estaban altamente humanizadas bien en la Vk o bien en la Vh se usaron para humanización adicional. La Vk más humanizada se combinó con la Vh más humanizada sometiendo a ensayo actividad funcional. (Véase la fig. 13).

Una segunda biblioteca que combina los restos estructurales de las Vk y Vh de interés se generó usando DP27 como la plantilla de cadena pesada y HT2 como la plantilla de cadena ligera. Como se describe anteriormente, se sintetizaron oligonucleótidos solapantes que contenían la estructura humana bien con residuos humanos o bien con residuos murinos en cada posición en cuestión. Estos oligos se mezclaron y después se fusionaron generando las regiones variables completas. Las regiones se amplificaron por PCR y después se elaboraron en fragmentos de hebra simple. Los fragmentos se fosforilaron y después se usaron en una reacción de mutagénesis incorporando las regiones variables dentro del vector basado en M13. La biblioteca se examinó después en busca de Fab funcionales que fueron específicos para IL-13 en un ensayo basado en ELISA. Las secuencias para la cadena ligera y las cadenas pesadas se muestran en la figuras 11 C y D y 12 C y D, respectivamente.

A partir de los resultados de secuenciación, la cadena de Vk fue capaz de tolerar residuos humanos por toda esta solicitud y así esta cadena se humanizó totalmente. Para la cadena pesada, dos posiciones fueron intolerantes de los residuos humanos: la posición 24 y la 94. Así, la región variable de cadena pesada estuvo humanizada en ~ 98 %.

D. Generación de los candidatos humanizados combinatorios

Dado que ningún candidato detectado a partir del examen de cualquiera de las bibliotecas estaba totalmente humanizado, la humanización se manipuló. Se generaron una serie de candidatos en los que se obtuvieron los niveles de la humanización deseada. La Vk más humanizada a partir de la biblioteca HT2 se combinó con la Vh más humanizada bien a partir de las bibliotecas de NEW o bien a partir de las bibliotecas de DP27. Estos candidatos combinatorios se ensayaron después determinando que mantenían la función específica llevando mientras el nivel de humanización más alto. Los candidatos elegidos a partir de HT2-NEW fueron HT2-NEW n.º: 73 para la cadena pesada y HT2-NEW n.º: 115 para la cadena ligera. Los candidatos elegidos a partir de la cadena ligera HT2-DP27 fueron HT2-DP27 n.º: 89 y HT2-DP27 n.º: 144 y los candidatos para la cadena pesada fueron HT2-DP27 n.º: 123 y HT2-DP27 n.º: 276. Para HT2-DP27, las construcciones se elaboraron como sigue: Vk n.º: 89 con Vh n.º: 276 y Vk n.º: 89 con Vh n.º: 123; Vk 144 con Vh n.º: 276 y Vk n.º: 144 con Vh n.º: 123. Además, se realizó una construcción con Vk n.º: 144 DP27 con Vh n.º: 73 NEW determinando si las interacciones de NEW y DP27 con la cadena ligera HT2 diferían.

Estas combinaciones se analizaron por ELISA para determinar si había alguna pérdida de función adicional tras una humanización adicional. Para estos ensayos, el antígeno IL-13 se capturó sobre la placa en una cantidad limitante. Los Fab anti-IL13 se añadieron después a la placa a una concentración conocida y se ajustó después hacia abajo la placa a una dilución de 1:3. La unión se detectó con un anticuerpo secundario, que es específico para Fab. La fig. 13 representa los resultados del ensayo funcional. Fig. 13A-115Vk/73Vh; fig. 13B- 89Vk/276Vh; fig. 13C-144Vk/276Vh; y fig. 13D-144Vk/123Vh. A partir de estos datos, los resultados observados sugirieron que las combinaciones manipuladas de las regiones variables humanizadas no afectaron adversamente la unión de los Fab al antígeno.

Debido a que los resultados en las figuras 11 y 12 sugirieron que la cadena ligera HT2 podría estar totalmente humanizada y que todas las posiciones menos dos en DP27 (24 y 94) podrían humanizarse, se manipuló el candidato humanizado ideal en quedaban solamente dos residuos murinos. Después la generación de este candidato particular, el clon se ensayó en comparación con su padre así como los otros candidatos determinando si

- 5 hubo cualquier pérdida de función. A partir de los datos presentados en la fig. 14A, el candidato humanizado no muestra una pérdida de función significativa con este grado alto de humanización (89Vk/276G). También se hizo humanización para el candidato de estructura HT2-NEW. Este candidato tiene un nivel de humanización final del 98 %, ya que hay dos residuos murinos que permanecen en la cadena pesada. La fig. 14B representa los resultados de ELISA para esta construcción (115Vk/73Vh FL).
- 10 Se ha hecho un intento para humanizar adicionalmente 89Vk/276G reemplazando los dos residuos murinos que quedan. Después de mutar las posiciones a los residuos humanos, los clones candidatos se ensayaron por ELISA y se compararon con el parental. Sin embargo, se observó una pérdida de función significativa tras reemplazar los residuos murinos con aquellos de la plantilla elegida. Por lo tanto, se generó otra biblioteca en la que las dos posiciones del Vh se asignaron al azar teniendo en cuenta todos los aminoácidos posibles en estas dos posiciones.
- 15 Los candidatos se examinaron usando un ensayo de ELISA funcional y treinta candidatos que proporcionaron resultados comparables al clon parental (89Vk/276G) se secuenciaron determinando qué aminoácidos estuvieron presentes en las posiciones marcadas como objetivo. Se muestra más adelante una lista de los candidatos y los aminoácidos en las dos posiciones.

Candidato	24	94	Candidato	24	94
228B/C	V	G	RL49	A	T
DP27	F	R	RL59	I	M
89/276G	V	G	RL61	S	T
RL7	A	S	RL62	T	T
RL8	L	S	RL70	S	L
RL11	T	V	RL72	V	T
RL12	I	I	RL78	I	M
RL15	L	L	RL79	V	T

Candidato	24	94	Candidato	24	94
RL19	S	L	RL84	L	T
RL27	G	V	RL88	L	S
RL32	G	G	RL89	L	S
RL35	S	L	RL91	G	L
RL36	G	V	RL95	I	L
RL40	L	S	RL97	T	T
RL45	T	T	RL18	S	R

Así, a partir de este estudio, hay varios aminoácidos que aparentemente se toleran en las posiciones designadas y aún no resultan en pérdida significativa de función. Así, cambiando los residuos estructurales a aminoácidos que no se encuentran en la secuencia murina ni en la estructura humana, se generó un Fab totalmente funcional sin efecto perjudicial sobre la unión al antígeno objetivo. Los candidatos que estuvieron a prueba adicionalmente a partir de

- 25 esta biblioteca al azar fueron RL-19 y RL-36.

Ejemplo 10

Optimización de CDR

Tras determinar la secuencia estructural óptima para el anticuerpo anti-IL13 candidato, se llevó a cabo optimización de las CDR. Para este procedimiento, la secuencia de aminoácidos de CDR se distribuyó al azar y después las bibliotecas se examinaron identificando aquellos candidatos que tenían igual o mejor actividad funcional que el clon parental. Para esta biblioteca, el candidato parental fue RL-36 (véase anteriormente). Las seis CDR se asignaron al azar, una posición en un momento y las bibliotecas se analizaron usando un ELISA funcional. Los candidatos fuertemente reactivos se secuenciaron para comparación con la CDR parental. Cabe señalar que todas las secuencias únicas enumeradas en las tablas más adelante aparecen también en la Figura 20 con identificadores SEQ ID NO apropiados.

- 30
- 35

A Optimización de CDR2-L1

CDR-L1 comprendió 15 aminoácidos. Cada una de estas posiciones se distribuyó al azar usando oligonucleótidos sintetizados que fueron lo mezclado en cantidades equimoleculares usándose en una reacción de mutagénesis. La eficiencia de la incorporación de los oligonucleótidos mutágenos se determinó que era el 40 %. Usando este porcentaje, el número de candidatos que se necesitaría rastrear fue 3600. Los clones se ensayaron usando un ELISA funcional y se secuenciaron esos clones que proporcionaron la actividad funcional. A partir del número de candidatos que se examinaron, se identificaron 166 candidatos positivos. A partir de este grupo, se secuenciaron 10 candidatos determinando los cambios dentro del CDR. A partir de las secuenciación resultan los resultados mostrados más adelante, las posiciones 11 y 14 que conducen a la afinidad incrementada son N a Q y M a L.

- 40

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CDR-L1	R	A	S	K	S	V	D	S	Y	G	N	S	F	M	H
L1-21	R	A	S	K	S	V	D	S	Y	G	N	S	F	L	H
L1-39	R	A	S	K	S	V	D	S	Y	G	Q	S	F	M	H
L1-47	K	A	S	K	S	V	D	S	Y	G	N	S	F	M	H
L1-50	R	A	S	K	S	V	D	S	Y	G	N	S	Y	M	H
L1-59	R	A	S	K	S	V	D	S	Y	G	Q	S	F	M	H
L1-61	R	A	S	K	S	V	D	S	Y	G	N	S	F	M	H
L1-62	R	A	S	K	S	V	D	S	Y	G	N	S	F	L	H
L1-63	R	A	S	K	S	V	D	S	Y	G	N	S	F	L	H
L1-117	N	A	S	K	S	V	D	S	Y	G	N	S	F	M	H
L1-125	R	A	S	K	S	V	D	S	Y	G	N	S	F	M	H

B. Optimización de CDR2-L2

5 CDR-L2 comprendió 7 aminoácidos. Esta biblioteca se preparó como se describe anteriormente. La eficiencia de esta biblioteca fue el 80 % y se sometieron a ensayo 840 clones. El número de los clones positivos identificado a partir del ensayo fue de 75 y se secuenciaron 11. A partir de los resultados mostrados a continuación, varias posiciones dentro de esta CDR proporcionaron actividad mejorada, aunque las posiciones y los aminoácidos de reemplazamiento aparecieron al azar. Este resultado respalda la observación de que la CDR-L2 es la más lejana del sitio de unión a antígenos y como tal ejercería la menor influencia sobre la unión de antígenos.

	1	2	3	4	5	6	7
CDR-L2	L	A	S	N	L	E	S
L2-10	L	A	S	N	L	N	S
L2-13	L	A	S	N	L	E	S
L2-25	L	A	S	N	L	Q	S
L2-37	L	A	T	N	L	E	S
L2-41	L	A	S	N	L	K	S
L2-44	L	A	S	N	L	E	K
L2-45	L	A	S	R	L	E	S
L2-53	L	A	S	N	L	H	S
L2-58	L	A	S	N	L	S	S
L2-65	L	A	S	F	L	E	S
L2-70	L	A	N	N	L	E	S

10 **C. Optimización de CDR-L3**

15 La CDR-L3 estaba compuesta de 9 aminoácidos. Esta biblioteca tras generación proporcionó una eficiencia del 50 %, requiriendo examinarse ~1700 clones. Desde este rastreo, se identificaron 257 candidatos positivos y se secuenciaron diez. A partir de estos resultados, solamente una posición proporcionó un cambio desde la secuencia parental. Varios candidatos demostraron la misma secuencia que sugiere que este cambio posicional estaba altamente favorecido (N a A).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
CDR-L3	Q	Q	N	N	E	D	P	R	T
L3-1	Q	Q	N	N	E	D	P	R	T
L3-32	Q	Q	N	A	E	D	P	R	T
L3-90	Q	Q	N	N	E	D	P	R	T
L3-100	Q	Q	N	N	E	D	P	R	T
L3-150	Q	Q	N	N	E	D	P	R	T
L3-170	Q	Q	N	A	E	D	P	R	T
L3-185	Q	Q	N	A	E	D	P	R	T
L3-207	Q	Q	N	A	E	D	P	R	T
L3-225	Q	Q	N	N	E	D	P	R	T

D. Optimización de CDR-H1

5 CDR-H1 comprendió 5 aminoácidos. La eficiencia de esta biblioteca fue del 80 %, requiriendo escanearse solamente aproximadamente 600 candidatos. A partir del examen, hubo 138 clones positivos y once de los clones se secuenciaron. A partir de los resultados enumerándose más adelante, la segunda posición dentro de esta CDR pareció ofrecer la mayor oportunidad de mejora de unión de antígenos. Sin embargo, varios aminoácidos afectan favorablemente la unión.

	1	2	3	4	5
CDR-H1	A	Y	S	V	N
H1-2	A	K	S	V	N
H1-12	G	Y	S	V	N
H1-18	A	K	S	V	N
H1-24	A	K	S	V	N
H1-31	A	H	S	V	N
H1-89	A	Y	S	V	N
H1-90	G	Y	S	V	N
H1-114	A	S	S	V	N
H1-115	A	H	S	V	N
H1-123	A	R	S	V	N
H1-126	A	R	S	V	N

E. Optimización de CDR-H2

10 La CDR-H2 comprendió 16 aminoácidos. La eficiencia de esta biblioteca fue del 70 %, lo que significa que necesitaron examinarse más de 2.100 candidatos. A partir del examen, se identificaron 192 candidatos positivos y se secuenciaron trece determinando los cambios que ocurrieron dentro del CDR. A partir de los resultados de secuenciación enumerados más adelante, varias posiciones mejoraron la afinidad de unión pero ninguno de los cambios aminoácidos pareció significativamente diferente del parental.

15

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
CDR-H2	M	I	W	G	D	G	K	I	V	Y	N	S	A	L	K	S
H2-38	M	I	W	G	D	G	K	I	S	Y	N	S	A	L	K	S
H2-43	M	I	W	G	D	G	K	I	V	Y	N	S	A	L	E	S
H2-51	M	I	W	G	D	G	K	I	V	Y	N	S	A	L	K	S
H2-66	M	I	W	G	D	G	K	I	S	Y	N	S	A	L	K	S
H2-79	M	I	W	G	D	G	K	I	V	Y	N	S	D	L	K	S
H2-86	M	I	W	G	D	G	K	V	V	Y	N	S	A	L	K	S
H2-101	M	I	W	G	D	G	K	I	V	Y	N	S	E	L	K	S
H2-109	M	I	W	G	D	G	K	I	A	Y	N	S	A	L	K	S
H2-119	M	I	W	G	D	G	K	I	V	Y	N	S	A	L	K	E
H2-121	M	V	W	G	D	G	K	I	V	Y	N	S	A	L	K	S
H-129	M	I	W	G	D	G	K	I	V	Y	N	S	A	L	K	S
H-169	M	I	W	G	D	G	K	I	V	Y	N	S	A	L	A	S
H2-176	M	I	W	G	D	G	K	K	V	Y	N	S	A	L	K	S

F. Optimización de CDR-H3

5 CDR-H3 comprendió 10 aminoácidos. El CDR en general se cree que es el que impone la mayor influencia en la unión a antígeno, debido a que este bucle está generalmente en el medio del sitio de unión. Esta biblioteca tenía una eficiencia del 40 % y así se necesitaron escanearse 2400 candidatos. De éstos, se identificaron 174 candidatos positivos y diez se secuenciaron determinando los cambios dentro de las CDR. Los resultados enumerados a continuación indicaron que el cambio de Y a R en la tercera posición puede ser uno importante para la mejora en la unión.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
H3	D	G	Y	Y	P	Y	A	M	D	N
H3-1	D	G	R	Y	P	Y	A	M	D	N
H3-30	D	G	Y	Y	P	Y	A	M	S	N
H3-73	D	G	Y	Y	P	Y	A	M	A	N
H3-89	D	G	Y	Y	P	Y	A	M	A	N
H3-130	D	G	R	Y	P	Y	A	M	D	N
H3-131	D	G	R	Y	P	Y	A	M	D	N
H3-133	D	G	Y	Y	P	Y	A	L	D	N
H3-135	D	G	R	Y	P	Y	A	M	D	N
H3-161	D	G	Y	Y	P	Y	A	M	D	N
H3-162	D	G	Y	Y	P	Y	A	M	K	N

10 **G. Genoteca combinatoria**

Una vez se determinaron los cambios dentro de las CDR que proporcionaron la mayor mejora general en unión a antígenos, los mejores candidatos se combinaron después viendo si estos cambios mejoraron la unión. Así, un candidato se manipuló combinando todas las sustituciones aminoacídicas favorables.

5 Generando la biblioteca combinatoria, el clon inicial fue el que incorporó la alteración en CDR-L1-59 (N a Q). A este clon, se le hicieron otros cambios para CDR-L3, N a A (posición 4), para CDR-H1, Y a cada R, H, K o S (posición 2), para CDR-H3, Y a R (posición 3) y D bien a K o bien a S (posición 9). No se hicieron cambios para CDR-L2 o CDR-H2. Más de 1100 candidatos de esta biblioteca se analizaron usando un ensayo funcional de ELISA. Se identificaron un total de 120 candidatos como que tienen actividad mayor que el clon parental. Las secuencias de esos clones se muestran en la fig. 15.

10 Para confirmar que estos candidatos combinatorios mantenían función, se llevó a cabo un ensayo de competición. Para este ensayo, se capturó IL-13 en una placa de ELISA. Los candidatos, que son Fab purificados, se premezclaron en concentraciones variantes a una concentración constante de Fab anti-IL-13. Esta mezcla se añadió a la placa de ELISA. Se detectó el anti-IL-13 quimérico marcado capaz de unión a la IL-13 unida a placa.

A partir de los resultados de esta competición, los dos candidatos sometidos a ensayo demostraron capacidad equivalente compitiendo con el candidato quimérico (228 B/C n.º: 3) por unión a IL-13 (fig. 16). El Fab irrelevantes es 51, que no demuestra ninguna capacidad compitiendo. La figura 17 representa las secuencias de tres candidatos maduros de afinidad.

15 Ejemplo 11

Mapeo de epítomos

20 MAb Anti-IL13 228B/C-1 se une a un epítipo conformacional y se une a IL13 de macaco de Java con la misma afinidad alta que a la IL13 humana. Sin embargo, 228B/C no se une a IL13 murina. Así, la estrategia ideada para el mapeo de epítipo fue intercambiar pequeñas porciones de la IL13 de mono con la secuencia de ratón correspondiente. Los oligonucleótidos solapantes se sintetizaron como se muestra en la figura 18. Dos rondas de PCR se llevaron a cabo ensamblando las construcciones híbridas de IL13 de tal forma que parte de la IL13 del mono se reemplazó por la secuencia correspondiente de ratón (fig. 18). Las regiones codificantes de IL13 amplificadas por PCR final se clonaron dentro del vector pcDNA3.1 en fase con una marca V5 usando kit de clonación TOPO (Invitrogen). Toda la región amplificada por PCR se confirmó secuenciando para contener solamente las mutaciones de intercambio de dominios deseados y no mutación indeseada adicional en los vectores de expresión.

30 El epítipo de unión de MAb anti-IL13 se identificó como un péptido octámero a partir de aminoácido n.º: 49 a 56, ESLINVS (SEQ ID NO: 18). Este epítipo está localizado en la hélice-B y en el bucle-BC en IL13 humana. Cuando el péptido de epítomos derivados de IL13 de macaco de Java se usó en la correspondiente secuencia murina IL13, la molécula IL13 híbrida resultante puede unirse a 228B/C con afinidad similar a la de la IL13 de macaco de Java original, se validó adicionalmente esa unión de MAb 228B/C a IL13 de macaco de Java o humana en este péptido entre los residuos n.ºs: 49-56. La comparación de secuencias entre IL13 humana, de macaco de Java y murina revela que solamente tres residuos, ILe52, Val54, Gly56 en la IL13 humana no están conservados, sugiriendo que los residuos críticos para interacción de IL13 y anti-IL13 a través de este péptido octámero se determinan por uno o combinación de algunos de estos tres residuos.

35 Este epítipo se confirmó adicionalmente por análisis de puntos peptídicos. La totalidad del péptido IL13 humano se exploró con una serie de péptidos solapantes 12-meros sintetizados por medio de SPOT en membrana de celulosa. El único péptido reactivo de MAb anti-IL13 se identificó como un péptido 12-mero de aminoácidos n.ºs: 44-56, YCAALESLINVS (SEQ ID NO: 19), que se solapan con la región identificada por experimentos de intercambio de dominios.

40 Depósitos

Los siguientes cultivos se han depositado con la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas Va. EE.UU. 20110-2209 (ATCC):

Hibridoma	N.º de ATCC:	Fecha de depósito
Anti-IL13 228B/C-1	PTA-5657	20 de noviembre, 2003
Anti-IL13 228A-4	PTA-5656	20 de noviembre, 2003
Anti-IL13 227-26	PTA-5654	20 de noviembre, 2003
Anti-1L13 227-43	PTA-5655	20 de noviembre, 2003

45 Este depósito se hizo con arreglo a lo dispuesto en el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines de Patentes de Procedimiento y los Reglamentos a continuación (Tratado de Budapest). Esto garantiza el mantenimiento de un cultivo viable durante 30 años desde la fecha de depósito. El organismo se hará disponible por ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest, que asegura

disponibilidad permanente y no restringida de la progenie del cultivo para el público tras expedición de la Patente de los EE.UU. pertinente.

5 El cesionario de la presente solicitud ha acordado que si el cultivo en depósito muriera o se perdiera o se destruyera cuando se cultivase en condiciones adecuadas, prometerá reemplazarlo a la notificación de inmediato con un espécimen viable del mismo cultivo. La disponibilidad de la cepa depositada no debe interpretarse como una licencia para poner en práctica la invención en contravención de los derechos concedidos en virtud de la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes sobre patentes.

La memoria descriptiva escrita anteriormente se considera que es suficiente para permitir a alguien experto en la técnica poner en práctica la invención. La presente invención se ilustra en las realizaciones depositadas.

10

Listado de secuencias

- <110> TANOX, INC.
 - FUNG, Sek Chung
 - SHING, Sanjaya
 - 5 HUANG, Dan
 - MOYLE, Matthew
 - LU, Mason
 - YAN, Changing
- <120> Anticuerpos anti-IL13 y usos de los mismos
- 10
- <130> TNX-1050
- <150> Documento US60/532.130
- <151> 23-12-2003
- 15
- <160> 152
- <170> PatentIn version 3.2
- 20 <210> 1
- <211> 114
- <212> Proteína
- <213> Homo sapiens
- 25 <400> 1

ES 2 385 038 T3

Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu
 1 5 10 15
 Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly
 20 25 30
 Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala
 35 40 45
 Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr
 50 55 60
 Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln
 65 70 75 80
 Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe
 85 90 95
 Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Arg
 100 105 110
 Phe Asn

<210> 2

<211> 114

5 <212> Proteína

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (13)..(13)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se dé en la naturaleza

<400> 2

Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Xaa Leu Ile Glu
 1 5 10 15
 Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly
 20 25 30
 Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala
 35 40 45
 Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr
 50 55 60
 Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln
 65 70 75 80
 Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe
 85 90 95
 Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Arg
 100 105 110
 Phe Asn

<210> 3

<211> 113

5 <212> Proteína

<213> Especie del género murino

<220>

<221> CADENA

10 <222> (1)..(113)

<223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA LIGERA DE ANTICUEPO MONOCLONAL 228B/C

<400> 3

ES 2 385 038 T3

Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr
20 25 30
Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp
65 70 75 80
Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
85 90 95
Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Ala

<210> 4

5 <211> 118

<212> Proteína

<213> Especie del género murino

<220>

10 <221> CADENA

<222> (1)..(118)

<223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA PESADA DE ANTICUÉPO MONOCLONAL 228B/C

<400> 4

ES 2 385 038 T3

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
20 25 30
Asn Ile Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Ile Phe Leu
65 70 75 80
Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Glu Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 5

<211> 118

5 <212> Proteína

<213> Especie del género murino

<220>

<221> CADENA

10 <222> (1)..(118)

<223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA LIGERA DE ANTICUERO MONOCLONAL 228A-4

<400> 5

ES 2 385 038 T3

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
20 25 30
Asn Ile Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Ile Phe Leu
65 70 75 80
Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Glu Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 6

<211> 118

5 <212> Proteína

<213> Especie del género murino

<220>

<221> CADENA

10 <222> (1)..(118)

<223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA PESADA DE ANTICUERO MONOCLONAL 228A-4

<400> 6

ES 2 385 038 T3

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Asn Ile Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Ile Phe Leu
 65 70 75 80
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Glu Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 g Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 ar Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 7

5 <211> 114

<212> Proteína

<213> Especie del género murino

<220>

10 <221> CADENA

<222> (1)..(114)

<223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA LIGERA DE ANTICUEPO MONOCLONAL 227-26

<220>

15 <221> CADENA

<222> (1)..(114)

<223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA LIGERA DE ANTICUEPO MONOCLONAL 227-26-1

<400> 7

ES 2 385 038 T3

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95
Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
Arg Ala

<210> 8

<211> 120

5 <212> Proteína

<213> Especie del género murino

<220>

<221> CADENA

10 <222> (1)..(120)

<223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA PESADA DE ANTICUERO MONOCLONAL 227-26-1

<400> 8

ES 2 385 038 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Asp Asp Leu Val Leu Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Trp Ile Asn Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly His Ile Ala Pro Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Phe Asn Glu Met Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Ile Gln Leu Ser Ser Leu Ser Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Asp Ile Phe Leu Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 9

<211> 50

5 <212> ADN

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> Cebador de oligonucleótido en sentido correcto para una secuencia de IL13 mutante

10

<400> 9

aagcttccc caggccctgt gcctccctct acagccctca ggaagctcat 50

<210> 10

15 <211> 30

<212> ADN

<213> ARTIFICIAL

<220>

20 <223> Cebador de oligonucleótido en sentido inverso para una secuencia de IL13 mutante

<400> 10

ES 2 385 038 T3

ctcgagggtg aaccgtccct cgcgaaaaag 30

<210> 11

<211> 22

5 <212> ADN

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> Cebador de oligonucleótido degenerado en sentido correcto para una secuencia de IL13 de mono

10

<400> 11

gyyctrngcy ycatggcgct yt 22

<210> 12

15 <211> 25

<212> ADN

<213> ARTIFICIAL

<220>

20 <223> Cebador de oligonucleótido degenerado en sentido inverso para una secuencia de IL13 de mono

<400> 12

tffcagttga accgtccyty gcgaa 25

25 <210> 13

<211> 399

<212> ADN

<213> Macaca fascicularis

30 <400> 13

ES 2 385 038 T3

```

atggcgctct tgttgaccat ggtcattgct ctcacttgcc tcggcggctt tgcctcccca      60
agccctgtgc ctccctctac agccctcaag gagctcattg aggagctggg caacatcacc      120
cagaaccaga aggccccgct ctgcaatggc agcatggtgt ggagcatcaa cctgacagct      180
ggcgtgtact gtgcagccct ggaatccctg atcaacgtgt caggctgcag tgccatcgag      240
aagaccaga ggatgctgaa cggattctgc cgcacaagg tctcagctgg gcagttttcc      300
agcttgctg tccgagacac caaatcgag gtggcccagt ttgtaaagga cctgctcgta      360
catttaaaga aactttttcg caatggacgg ttcaactga                               399

```

<210> 14

<211> 34

5 <212> ADN

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> Cebador de oligonucleótido en sentido correcto para IL13 de Macaco de Java

10

<400> 14

aagcttcacc atggcgctct tgttgaccat ggtc 34

<210> 15

15 <211> 40

<212> ADN

<213> ARTIFICIAL

<220>

20 <223> Cebador de oligonucleótido en sentido inverso para IL13 de Macaco de Java

<400> 15

tcacaagatc tgggctcctc gaggtgaac cgtccattgc 40

25 <210> 16

<211> 23

<212> ADN

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> Cebador de oligonucleótido en sentido correcto para Fc gamma1

<400> 16

5 ctcgaggagc ccagatcttg tga 23

<210> 17

<211> 35

<212> ADN

10 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> Cebador de oligonucleótido en sentido inverso para Fc gamma1

15 <400> 17

gctctagagc ctctattacc cggagacagg gagag 35

<210> 18

<211> 8

20 <212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> SITIO DE UNIÓN A EPÍTOPO

25

<400> 18

Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly

1 5

30 <210> 19

<211> 12

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

35 <220>

<223> SITIO DE UNIÓN A EPÍTOPO

ES 2 385 038 T3

<400> 19

Tyr Cys Ala Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser

1 5 10

5 <210> 20

<211> 23

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

10 <220>

<223> FRL1 228B/C-1

<400> 20

Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys
 20

15

<210> 21

<211> 23

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

20

<220>

<223> FRL1 PLANTILLA HT2

<400> 21

25

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
 20

<210> 22

<211> 23

30 <212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRL1 VARIANTE B

<400> 22

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

5

<210> 23

<211> 23

<212> Proteína

10 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRL1 VARIANTE J

15 <400> 23

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

<210> 24

<211> 23

20 <212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRL1 VARIANTE L

25

<400> 24

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

<210> 25

<211> 23

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

5

<220>

<223> FRL1 VARIANTE HT-NEW n.º: 300

<400> 25

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

10

<210> 26

<211> 23

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

15

<220>

<223> FRL1 VARIANTE HT2-DP27 n.º: 29

20 <400> 26

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Val Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

<210> 27

<211> 23

25 <212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRL1 VARIANTE HT2-DP27 n.º: 53

30

<400> 27

ES 2 385 038 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

<210> 28

<211> 23

5 <212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRL1 VARIANTE HT2-DP27 n.º: 66

10

<400> 28

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

<210> 29

15 <211> 15

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

20 <223> FRL2 228B/C

<400> 29

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

25

<210> 30

<211> 32

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

30

<220>

ES 2 385 038 T3

<223> FRL3 228 B/C

<400> 30

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

5

<210> 31

<211> 32

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

10

<220>

<223> FRL3 HT2

<400> 31

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

15

<210> 32

<211> 32

<212> Proteína

20 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRL3 VARIANTE B

25 <400> 32

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

<210> 33

<211> 32

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

5

<220>

<223> FRL3 VARIANTE J

<400> 33

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Asp Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

10

<210> 34

<211> 32

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

15

<220>

<223> FRL3 VARIANTE L

<400> 34

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Asp Pro Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

20

<210> 35

<211> 32

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

25

<220>

<223> FRL3 VARIANTE N

30

<400> 35

ES 2 385 038 T3

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Asp Pro Val Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 36

<211> 32

5 <212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRL3 VARIANTE P

10

<400> 36

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Asp Ser Val Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 37

15 <211> 32

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

20 <223> FRL3 VARIANTE R

<400> 37

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

25 <210> 38

<211> 32

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

ES 2 385 038 T3

<220>

<223> FRL3 VARIANTE HT2-NEW n.º: 1

<400> 38

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

<210> 39

<211> 32

<212> Proteína

10 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRL3 VARIANTE HT2-NEW n.º: 9

15 <400> 39

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

<210> 40

<211> 32

20 <212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRL3 VARIANTE HT2-NEW n.º: 14

25

<400> 40

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

<210> 41

<211> 32

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

5 <220>

<223> FRL3 VARIANTE HT2-NEW n.º: 21

<400> 41

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

10

<210> 42

<211> 32

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

15

<220>

<223> FRL3 VARIANTE HT2-NEW n.º: 67

<400> 42

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

20

<210> 43

<211> 32

<212> Proteína

25 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRL3 VARIANTE HT2-NEW n.º: 74

30 <400> 43

ES 2 385 038 T3

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Pro Val Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 44

<211> 32

5 <212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRL3 VARIANTE HT2-NEW n.º: 78

10

<400> 44

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Asp Ser Val Glu Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

15 <210> 45

<211> 32

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

20 <220>

<223> FRL3 VARIANTE HT2-NEW n.º: 322

<400> 45

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Asp Ser Leu Glu Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

25

<210> 46

<211> 32

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRL3 VARIANTE HT2-NEW n.º: 162

5 <400> 46

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

<210> 47

<211> 32

10 <212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRL3 VARIANTE HT2-DP27 n.º: 7

15

<400> 47

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

<210> 48

20 <211> 32

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

25 <223> FRL3 VARIANTE HT2-DP27 n.º: 57

<400> 48

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

<210> 49

<211> 32

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

5

<220>

<223> FRL3 VARIANTE HT2-DP27 n.º: 73

<400> 49

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

10

<210> 50

<211> 32

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

15

<220>

<223> FRL3 VARIANTE HT2-DP27 n.º: 92

20

<400> 50

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Asp Thr Val Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

25

<210> 51

<211> 32

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRL3 VARIANTE HT2-DP27 n.º: 118

30

<400> 51

ES 2 385 038 T3

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Pro Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 52

<211> 32

5 <212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRL3 VARIANTE HT2-DP27 n.º: 123

10

<400> 52

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 53

15 <211> 32

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

20 <223> FRL3 VARIANTE HT2-DP27 n.º: 83

<400> 53

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Asp Pro Leu Glu Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

25 <210> 54

<211> 32

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRL3 VARIANTE HT2-DP27 n.º: 135

<400> 54

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

<210> 55

<211> 32

<212> Proteína

10 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRL3 VARIANTE HT2-DP27 n.º: 273

15 <400> 55

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

<210> 56

<211> 32

20 <212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRL3 VARIANTE HT2-DP27 n.º: 301

25

<400> 56

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

<210> 57

<211> 12

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

5

<220>

<223> FRL4 228 B/C

<400> 57

10 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala

1 5 10

<210> 58

<211> 11

15 <212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRL4 HT2

20

<400> 58

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

1 5 10

25 <210> 59

<211> 11

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

30 <220>

<223> FRL4 VARIANTE B

<400> 59

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

35 1 5 10

<210> 60

<211> 30

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

5 <220>

<223> FRH1 228 B/C

<400> 60

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15

10

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Asn
20 25 30

<210> 61

<211> 30

<212> Proteína

15 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRH1 DP27

20 <400> 61

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser
20 25 30

<210> 62

<211> 30

25 <212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRH1 NEW

30

<400> 62

ES 2 385 038 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ser Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 63

<211> 30

5 <212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRH1 VARIANTE HT2-NEW n.º: 73

10

<400> 63

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ser Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 64

15 <211> 30

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

20 <223> FRH1 VARIANTE HT2-DP27 n.º: 7

<400> 64

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Asn
20 25 30

25 <210> 65

<211> 30

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

ES 2 385 038 T3

<220>

<223> FRH1 VARIANTE HT2-DP27 n.º: 40

<400> 65

5 Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser
20 25 30

<210> 66

<211> 30

<212> Proteína

10 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRH1 VARIANTE HT2-DP27 n.º: 268

15 <400> 66

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

<210> 67

<211> 14

20 <212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRH2 228 B/C

25

<400> 67

Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly
1 5 10

30 <210> 68

<211> 14

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

5 <223> FRH2 DP27

<400> 68

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala

1 5 10

10

<210> 69

<211> 14

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

15

<220>

<223> FRH2 NEW

<400> 69

20 Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 70

<211> 14

25

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRH2 VARIANTE 1

30

<400> 70

Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Gly

1 5 10

35

<210> 71

<211> 14

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRH2 VARIANTE 3

5

<400> 71

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly

1 5 10

10 <210> 72

<211> 14

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

15 <220>

<223> FRH2 VARIANTE HT2-DP27 N.º: 7

<400> 72

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Gly

20 1 5 10

<210> 73

<211> 14

<212> Proteína

25 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRH2 VARIANTE HT2-DP27 N.º: 43

30 <400> 73

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 74

35 <211> 14

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRH2 VARIANTE HT2-DP27 N.º: 50

5 <400> 74

Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 75

10 <211> 14

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

15 <223> FRH2 VARIANTE HT2-DP-27 N.º: 100

<400> 75

Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala

1 5 10

20

<210> 76

<211> 32

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

25

<220>

<223> FRH3 228 B/C

<400> 76

Arg Leu Asn Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys
1 5 10 15

30

Met Ser Ser Leu Gln Ser Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Gly
 20 25 30

<210> 77

<211> 32

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRH3 DP27

5

<400> 77

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

<210> 78

10 <211> 32

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

15 <223> FRH3 NEW

<400> 78

Arg Val Thr Met Leu Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg
1 5 10 15
Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

20 <210> 79

<211> 32

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

25 <220>

<223> FRH3 VARIANTE 1

<400> 79

ES 2 385 038 T3

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly
20 25 30

<210> 80

<211> 32

5 <212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRH3 VARIANTE 3

10

<400> 80

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly
20 25 30

15 <210> 81

<211> 32

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

20 <220>

<223> FRH3 VARIANTE 4

<400> 81

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Gly
20 25 30

25

<210> 82

<211> 32

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRH3 HT2-NEW n.º: 1

5

<400> 82

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

<210> 83

10

<211> 32

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

15

<223> FRH3 VARIANTE HT2-NEW n.º: 9

<400> 83

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

20

<210> 84

<211> 32

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

25

<220>

<223> FRH3 VARIANTE HT2-NEW n.º: 14

<400> 84

Arg Val Asn Met Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg
1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 85

<211> 32

5 <212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRH3 VARIANTE HT2-DP27 n.º: 26

10

<400> 85

Arg Leu Asn Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

15 <210> 86

<211> 32

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

20 <220>

<223> FRH3 VARIANTE HT2-DP27 n.º: 275

<400> 86

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Ile Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Gly
20 25 30

25

<210> 87

<211> 32

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRH3 VARIANTE HT2-DP27 n.º: 301

5 <400> 87

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

<210> 88

<211> 32

10 <212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRH3 VARIANTE HT2-DP27 n.º: 580

15

<400> 88

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

<210> 89

20 <211> 32

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

25 <223> FRH3 VARIANTE HT2-DP27 n.º: 345

<400> 89

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

<210> 90

<211> 32

<212> Proteína

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRH3 VARIANTE HT2-DP27 n.º: 634

10 <400> 90

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

<210> 91

<211> 11

15 <212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRH4 228B/C

20

<400> 91

Trp Gly His Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

25 <210> 92

<211> 11

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

30 <220>

<223> FRH4 DP27

<400> 92

Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 93

<211> 112

5 <212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CADENA LIGERA VARIABLE DE CL5

10

<400> 93

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly
 1           5           10           15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr
                20                25                30
Gly Gln Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
          35          40          45
Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50          55          60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65          70          75          80
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Ala
          85          90          95
Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
          100          105          110
    
```

15 <210> 94

<211> 118

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

20 <220>

<223> CADENA PESADA VARIABLE DE CL5

<400> 94

ES 2 385 038 T3

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Gly Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr
 20 25 30
 Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu
 65 70 75 80
 Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Val Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Lys Asn Trp Gly Gln Gly Ser
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 95

<211> 118

5 <212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CADENA LIGERA VARIABLE DE CL-13

10

<400> 95

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Gln Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
 85 90 95
 Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

ES 2 385 038 T3

<210> 96

<211> 118

<212> Proteína

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CADENA PESADA VARIABLE DE CL-13

10 <400> 96

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Gly Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Lys
20 25 30
Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu
65 70 75 80
Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Val Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Ser Asn Trp Gly Gln Gly Ser
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 97

15 <211> 118

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

20 <223> CADENA LIGERA VARIABLE DE CL-50

<400> 97

ES 2 385 038 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Gln Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Ala
 85 90 95
 Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 98

<211> 118

5 <212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CADENA PESADA VARIABLE DE CL-50

10

<400> 98

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Gly Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Lys
 20 25 30
 Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu
 65 70 75 80
 Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Val Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Lys Asn Trp Gly Gln Gly Ser
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 99

<211> 15

<212> Proteína

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CDR-L1 228/C

10 <400> 99

Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His

1 5 10 15

<210> 100

15 <211> 15

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

20 <223> CDR-L1 VARIANTE 1

<400> 100

Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr Gly Gln Ser Phe Met His

1 5 10 15

25

<210> 101

<211> 15

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

30

<220>

<223> CDR-L1 VARIANTE 2

<400> 101

35 Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr Gly Gln Ser Phe Leu His

1 5 10 15

<210> 102

<211> 15

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

5

<220>

<223> CDR-L1 VARIANTE 3

<400> 102

10 Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Tyr Met His

1 5 10 15

<210> 103

<211> 15

15 <212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CDR-L1 VARIANTE 4

20

<400> 103

Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Leu His

1 5 10 15

25 <210> 104

<211> 7

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

30 <220>

<223> CDR-L2 228B/C

<400> 104

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser

35 1 5

<210> 105

<211> 7

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

5 <220>

<223> CDR-L2 VARIANTE 1

<400> 105

Leu Ala Ser Asn Leu Asn Ser

10 1 5

<210> 106

<211> 7

<212> Proteína

15 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CDR-L2 VARIANTE 2

20 <400> 106

Leu Ala Ser Asn Leu Gln Ser

1 5

<210> 107

25 <211> 7

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

30 <223> CDR-L2 VARIANTE 3

<400> 107

Leu Ala Thr Asn Leu Glu Ser

1 5

35

<210> 108

<211> 7

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

5 <223> CDR-L2 VARIANTE 4

<400> 108

Leu Ala Ser Asn Leu Lys Ser

1 5

10

<210> 109

<211> 7

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

15

<220>

<223> CDR-L2 VARIANTE 5

<400> 109

20 Leu Ala Ser Asn Leu Glu Lys

1 5

<210> 110

<211> 7

25 <212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CDR-L2 VARIANTE 6

30

<400> 110

Leu Ala Ser Arg Leu Glu Ser

1 5

35 <210> 111

<211> 7

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CDR-L2 VARIANTE 7

5

<400> 111

Leu Ala Ser Asn Leu His Ser

1 5

10 <210> 112

<211> 7

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

15 <220>

<223> CDR-L2 VARIANTE 8

<400> 112

Leu Ala Ser Asn Leu Ser Ser

20 1 5

<210> 113

<211> 7

<212> Proteína

25 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CDR-L2 VARIANTE 9

30 <400> 113

Leu Ala Ser Phe Leu Glu Ser

1 5

<210> 114

35 <211> 7

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CDR-L2 VARIANTE 10

5 <400> 114

Leu Ala Asn Asn Leu Glu Ser

1 5

<210> 115

10 <211> 9

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

15 <223> CDR-L3 228B/C

<400> 115

Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Arg Thr

1 5

20

<210> 116

<211> 9

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

25

<220>

<223> CDR-L3 VARIANTE 1

<400> 116

30 Gln Gln Asn Ala Glu Asp Pro Arg Thr

1 5

<210> 117

<211> 5

35 <212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CDR-H1 228B/C

<400> 117

5 Ala Tyr Ser Val Asn

1 5

<210> 118

<211> 5

10 <212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CDR-H1 VARIANTE 1

15

<400> 118

Ala Lys Ser Val Asn

1 5

20 <210> 119

<211> 5

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

25 <220>

<223> CDR-H1 VARIANTE 2

<400> 119

Ala Asn Ser Val Asn

30 1 5

<210> 120

<211> 5

<212> Proteína

35 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CDR-H1 VARIANTE 3

<400> 120

Gly Tyr Ser Val Asn

5 1 5

<210> 121

<211> 5

<212> Proteína

10 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CDR-H1 VARIANTE 4

15 <400> 121

Ala His Ser Val Asn

1 5

<210> 122

20 <211> 5

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

25 <223> CDR-H1 VARIANTE 5

<400> 122

Ala Arg Ser Val Asn

1 5

30

<210> 123

<211> 16

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

35

<220>

<223> CDR-H2 228B/C

<400> 123

Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser

1 5 10 15

5

<210> 124

<211> 16

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

10

<220>

<223> CDR-H2 VARIANTE 1

<400> 124

15 Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Ser Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 125

<211> 16

20 <212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CDR-H2 VARIANTE 2

25

<400> 125

Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Glu Ser

1 5 10 15

30 <210> 126

<211> 16

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

35 <220>

<223> CDR-H2 VARIANTE 3

<400> 126

Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser

1 5 10 15

5 <210> 127

<211> 16

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

10 <220>

<223> CDR-H2 VARIANTE 4

<400> 127

Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Asp Leu Lys Ser

15 1 5 10 15

<210> 128

<211> 16

<212> Proteína

20 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CDR-H2 VARIANTE 5

25 <400> 128

Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Val Val Tyr Asn Ser Asp Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 129

30 <211> 16

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

35 <223> CDR-H2 VARIANTE 6

<400> 129

Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Glu Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 130

5 <211> 16

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

10 <223> CDR-H2 VARIANTE 7

<400> 130

Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Ala Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser

1 5 10 15

15

<210> 131

<211> 16

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

20

<220>

<223> CDR-H2 VARIANTE 8

<400> 131

25 Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Glu

1 5 10 15

<210> 132

<211> 16

30 <212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CDR-H2 VARIANTE 9

35

<400> 132

Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser

ES 2 385 038 T3

1 5 10 15

<210> 133

<211> 16

5 <212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CDR-H2 VARIANTE 10

10

<400> 133

Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Ala Ser

1 5 10 15

15 <210> 134

<211> 16

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

20 <220>

<223> CDR-H2 VARIANTE 11

<400> 134

Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Lys Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser

25 1 5 10 15

<210> 135

<211> 10

<212> Proteína

30 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CDR-H3 228B/C

35 <400> 135

Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn

1 5 10

<210> 136

<211> 10

<212> Proteína

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CDR-H3 VARIANTE 1

10 <400> 136

Asp Gly Arg Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn

1 5 10

<210> 137

15 <211> 10

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

20 <223> CDR-H3 VARIANTE 2

<400> 137

Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Lys Asn

1 5 10

25

<210> 138

<211> 10

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

30

<220>

<223> CDR-H3 VARIANTE 3

<400> 138

35 Asp Gly Arg Tyr Pro Tyr Ala Met Lys Asn

1 5 10

<210> 139

<211> 10

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

5

<220>

<223> CDR-H3 VARIANTE 4

<400> 139

10 Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Ser Asn

1 5 10

<210> 140

<211> 10

15 <212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CDR-H3 VARIANTE 5

20

<400> 140

Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Ala Asn

1 5 10

25 <210> 141

<211> 10

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

30 <220>

<223> CDR-H3 VARIANTE 6

<400> 141

Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Leu Asp Asn

35 1 5 10

<210> 142

ES 2 385 038 T3

<211> 112

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

5 <220>

<223> CADENA LIGERA VARIABLE DE CL-89

<400> 142

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr
 20 25 30

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
 85 90 95

Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

10

<210> 143

<211> 118

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

15

<220>

<223> CADENA PESADA VARIABLE CL-276G

<400> 143

ES 2 385 038 T3

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr
 20 25 30
 Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu
 65 70 75 80
 Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Gly Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 144

5 <211> 112

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

10 <223> CADENA LIGERA VARIABLE DE RL-36

<400> 144

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
 85 90 95
 Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

ES 2 385 038 T3

<210> 145

<211> 118

<212> Proteína

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CADENA PESADA VARIABLE DE RL-36

10 <400> 145

Gln val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Gly Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr
20 25 30
Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu
65 70 75 80
Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Val Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 146

15 <211> 118

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

20 <223> CADENA PESADA VARIABLE RL-19

<400> 146

ES 2 385 038 T3

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ser Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr
20 25 30
Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu
65 70 75 80
Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Leu Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 147

<211> 118

5 <212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CADENA PESADA VARIABLE RL-11

10

<400> 147

ES 2 385 038 T3

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Thr Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr
 20 25 30
 Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu
 65 70 75 80
 Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Val Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 148

<211> 118

5 <212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CADENA PESADA VARIABLE RL-8

10

<400> 148

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Leu Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr
 20 25 30
 Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu
 65 70 75 80
 Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

ES 2 385 038 T3

Ser Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 149

<211> 118

5 <212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CADENA PESADA VARIABLE RL-45

10

<400> 149

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Thr Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr
20 25 30

Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu
65 70 75 80

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Thr Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 150

15 <211> 112

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

20 <223> CADENA LIGERA VARIABLE RL-36-L1,59

ES 2 385 038 T3

<400> 150

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr
20 25 30
Gly Gln Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
85 90 95
Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

5

<210> 151

<211> 118

<212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

10

<220>

<223> CADENA PESADA VARIABLE RL-36-L1,59

<400> 151

ES 2 385 038 T3

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Gly Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr
20 25 30
Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu
65 70 75 80
Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Val Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 152

<211> 248

5 <212> Proteína

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FV DFE CADENA SIMPLE

10

<400> 152

ES 2 385 038 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-IL-13 de ser humano antagonista o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-13 humana, en el que dicho anticuerpo inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo producido por hibridoma 228B/C que se designa con el número de depósito de ATCC PTA-5657, a IL-13.
- 5 2. El anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo se une a un epítipo que tiene la secuencia de aminoácidos ESLINVSG o YCAALESLINVS.
3. El anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1 o 2 en el que dicho anticuerpo comprende (a) una región de cadena ligera variable (VL) que comprende una CDRL1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 99, una CDRL2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 104 y una CDRL3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 115; y (b) una región de cadena pesada variable (VH) que comprende una CDRH1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 117, una CDRH2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 123 y una CDRH3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 135.
- 10
4. El anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1 o 2, que comprende secuencias humanizadas de un anticuerpo producido por hibridoma 228B/C-1, que se designa con el número de depósito de ATCC, PTA-5657.
- 15
5. El anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1 o 2, en el que dicho anticuerpo comprende una cadena de la región VL elegida a partir de una cualquiera de las SEQ ID NO^s: 3, 142, 144 y 150 y una región de la cadena de VH elegida a partir de una cualquiera de las SEQ ID NO^s: 4, 143, 145, 146, 147, 148 y 149.
- 20
6. El anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1 o 2, en el que dicho anticuerpo comprende las regiones de unión a antígeno derivadas de las regiones variables de cadena ligera y/o pesada de un anticuerpo producido por hibridoma 228B/C-1 (PTA-5657).
7. El anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1 o 2 en el que dicho anticuerpo comprende una cadena de la región VL que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 142 y una región de la cadena de VH que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 143.
- 25
8. El anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1 o 2 que comprende:
 - (a) una cadena de la región VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la fórmula: FRL1-CDRL1-FRL2-CDRL2-FRL3-CDRL3-FRL4, en la que FRL1 consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO^s: 20 a 25; CDRL1 consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO^s: 99 a 103; FRL2 consiste en la SEQ ID NO: 29; CDRL2 consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO^s: 104 a 114; FRL3 consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO^s: 30 a 56; CDRL3 consiste en cualquiera de las SEQ ID NO^s: 115 a 116; y FRL4 consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO^s: 57 a 59; y
 - (b) una cadena de la región VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la fórmula: FRH1-CDRH1-FRH2-CDRH2-FRH3-CDRH3-FRH4, en la que FRH1 consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO^s: 60 a 66; CDRH1 consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO^s: 117 a 122; FRH2 consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO^s: 67 a 75; CDRH2 consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO^s: 123 a 134; FRH3 consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO^s: 76 a 90; CDRH3 consiste en cualquiera de las SEQ ID NO^s: 135 a 141; y FRH4 consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO^s: 91 a 92.
- 30
9. El anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
10. El anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el anticuerpo es un anticuerpo IgG.
11. El anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el anticuerpo es un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.
- 35
12. El anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el anticuerpo está humanizado.
13. El anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el anticuerpo es un anticuerpo de cadena individual, un anticuerpo monovalente, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico o un fragmento Fab.
- 40
14. El fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que es un Fab.
- 50

- 15.** El anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 13, que es un anticuerpo multiespecífico que es un anticuerpo biespecífico.
- 16.** Una línea celular de hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal 228B/C-1, que se designa con el número de depósito de ATCC PTA-5657.
- 5 **17.** Un polinucleótido que codifica un anticuerpo antagonista o un fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.
- 18.** Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 17.
- 19.** Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 18.
- 10 **20.** Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antagonista o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-13 humana de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y un vehículo fisiológicamente aceptable.
- 21.** Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antagonista o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-13 humana de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para usar en el tratamiento de asma.
- 15 **22.** Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antagonista o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-13 humana de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para usar en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.
- 23.** Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-13 humana de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para usar en el tratamiento del asma bronquial, rinitis alérgica, urticaria, o la dermatitis alérgica o para usar en la prevención del asma bronquial, rinitis alérgica, dermatitis alérgica o anafilaxia.
- 20 **24.** Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-13 humana según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para usar en el tratamiento del asma alérgica, asma no alérgica, rinitis alérgica, dermatitis atópica, conjuntivitis alérgica, eczema, urticaria, alergias alimentarias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, colitis ulcerosa, infección por VRS, uveítis, esclerodermia, u osteoporosis.
- 25 **25.** Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antagonista o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-13 humana de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para usar en el tratamiento de fibrosis pulmonar idiopática o inflamatoria y enfermedad pulmonar fibrótica.
- 30 **26.** La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25, para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 21-25, caracterizado porque el anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno del mismo se administra por inhalación, inyección de gran tamaño o infusión.
- 27.** Un procedimiento para producir un anticuerpo antagonista anti-IL-13 humana o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende la etapa de expresar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo codificado por el polinucleótido de la reivindicación 17 o por el vector de la reivindicación 18 a partir de una célula huésped.
- 35 **28.** El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 27, que comprende adicionalmente la etapa de purificar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo expresado a partir de la célula huésped.
- 40 **29.** Un anticuerpo anti-IL-13 humana antagonista o fragmento de unión a antígeno del mismo obtenido a partir de la línea celular de hibridoma de la reivindicación 16 o de la célula huésped de la reivindicación 19.
- 30.** Un anticuerpo anti-IL-13 humana antagonista o fragmento de unión a antígeno del mismo obtenido a partir del procedimiento de la reivindicación 27 o 28.

Fig. 1 Unión de mAb anti-IL13 a IL-13 humana en ELISA

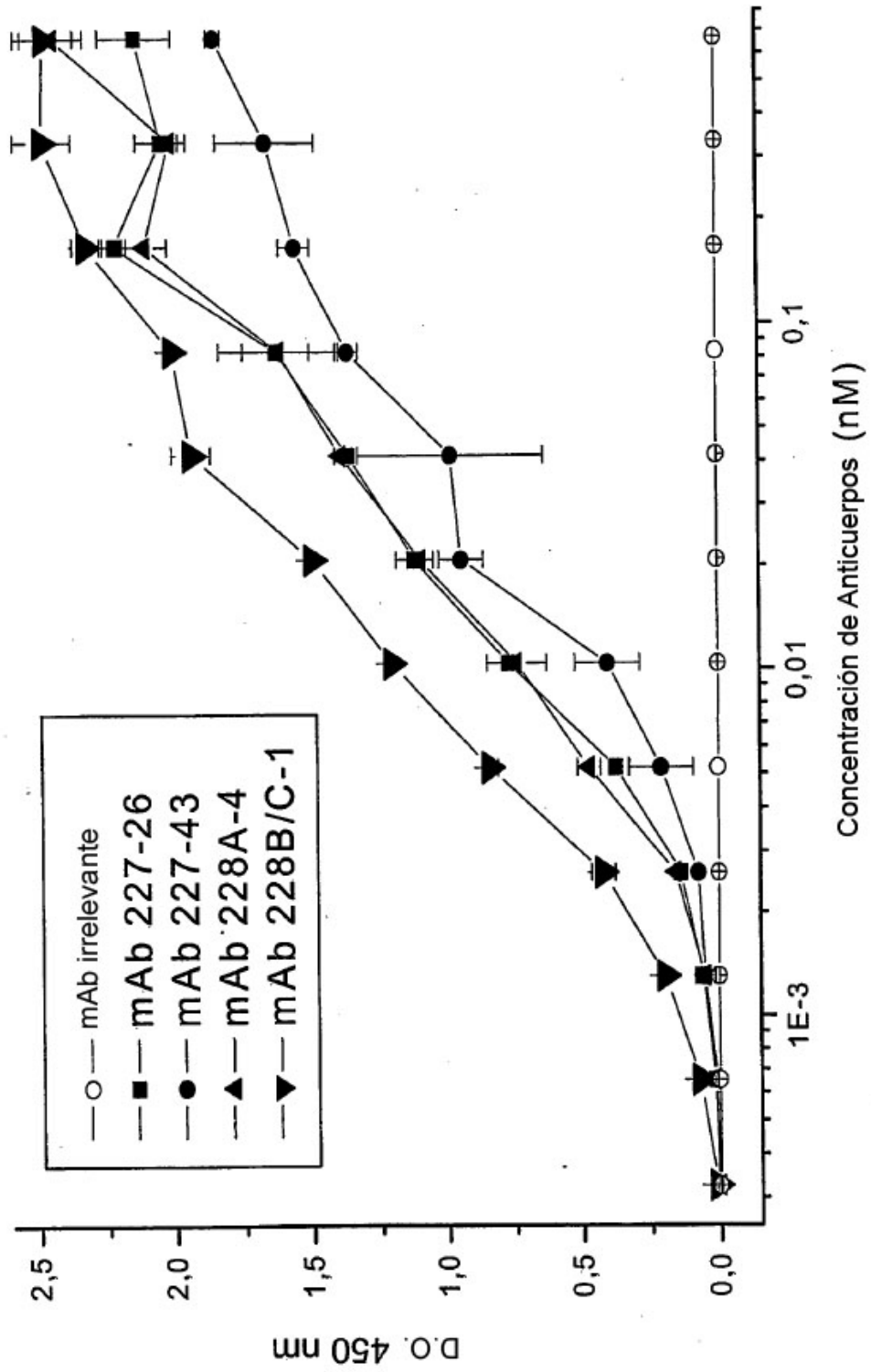


Fig. 2 Unión de mAb anti-IL13 a MT-IL13/Fc

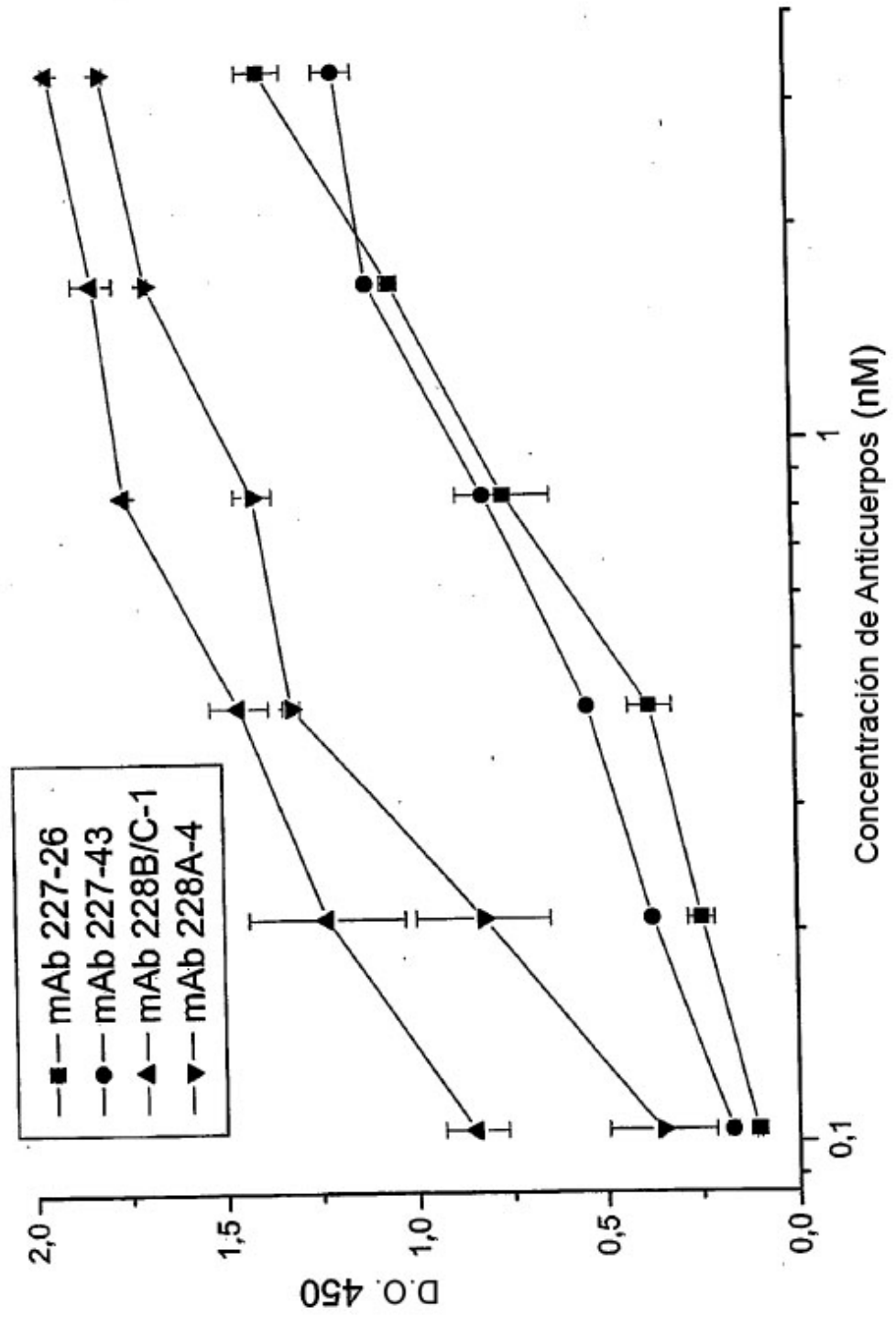


Fig. 3 mAb JES10-A52 anti-IL13 no compete con la unión de mAb 228B/C-1-HRP a IL-13 humana en ELISA

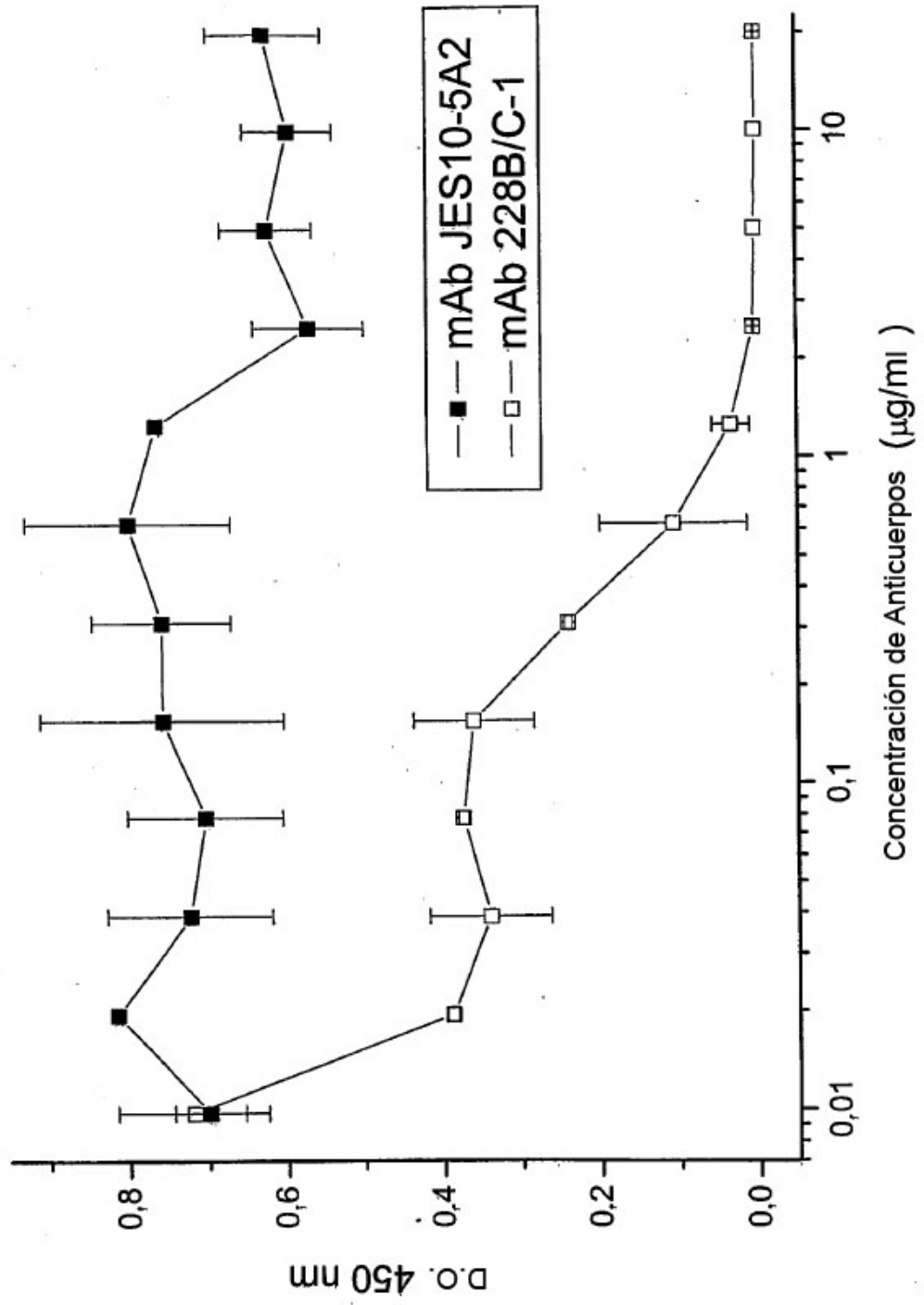


Fig. 4 Efecto de mAb anti-IL13 sobre la proliferación de células L1236

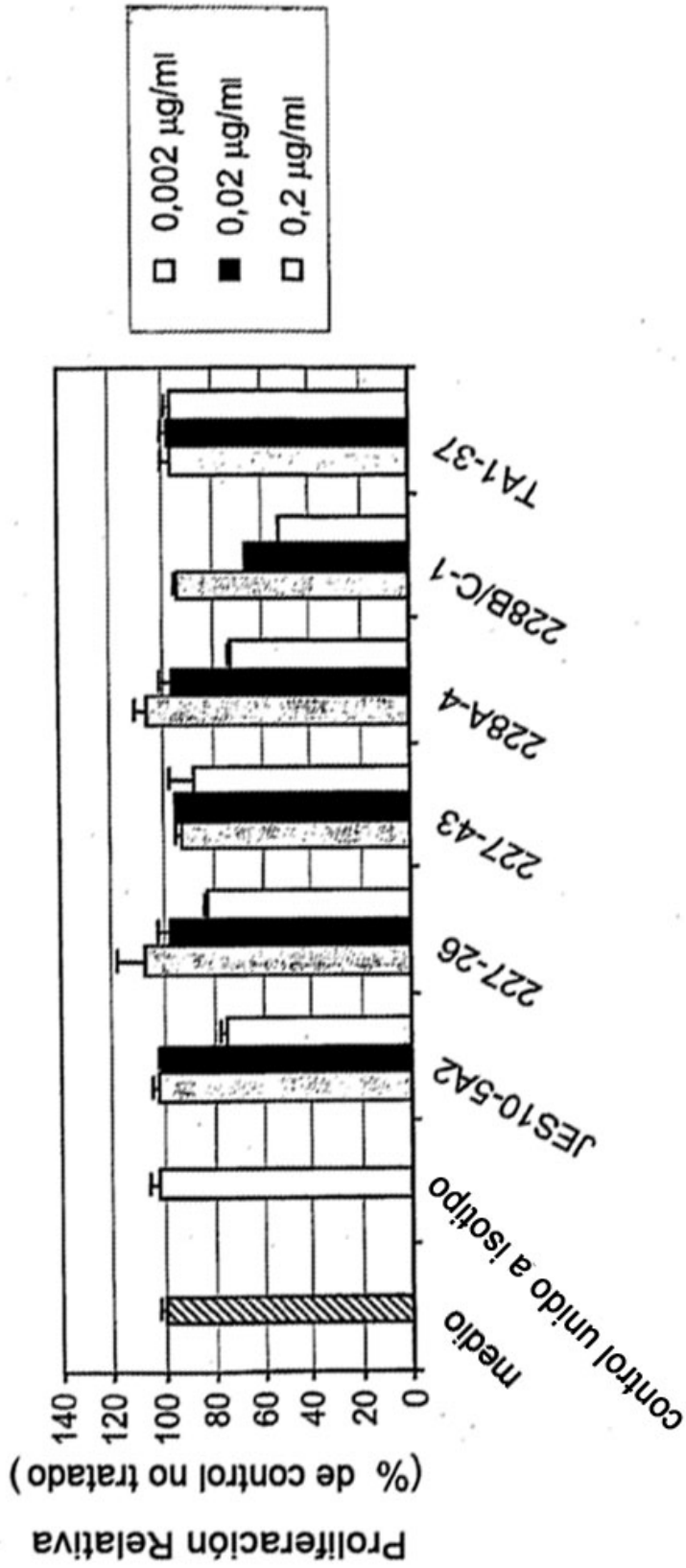


Fig. 5 Efecto de mAb anti-IL13 en supresión inducida por IL13 de expresión de CD14 en monocitos humanos

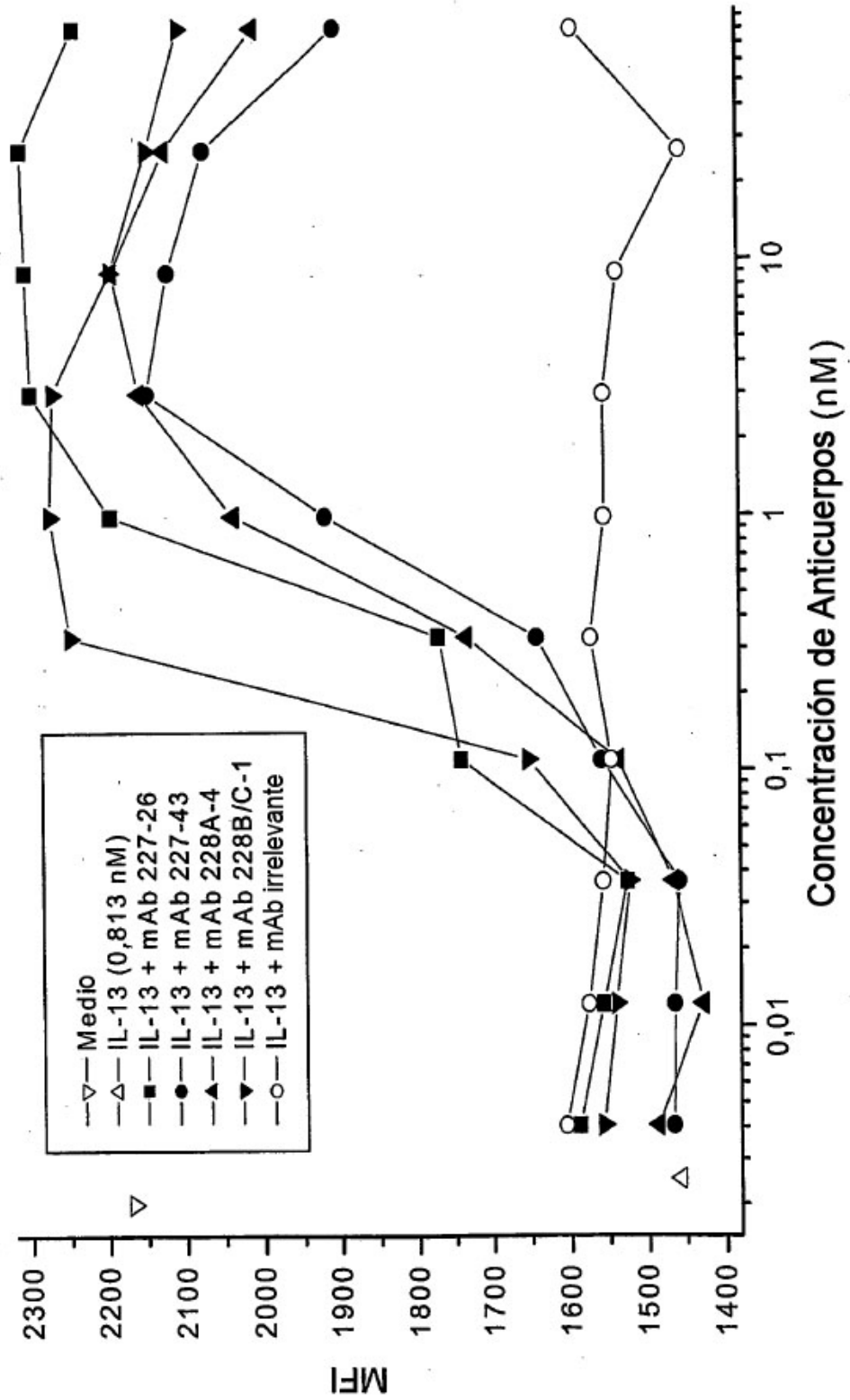


Fig. 6 Efecto de mAb anti-IL13 en regulación al alza inducida por IL13 de expresión de CD30 en monocitos humanos

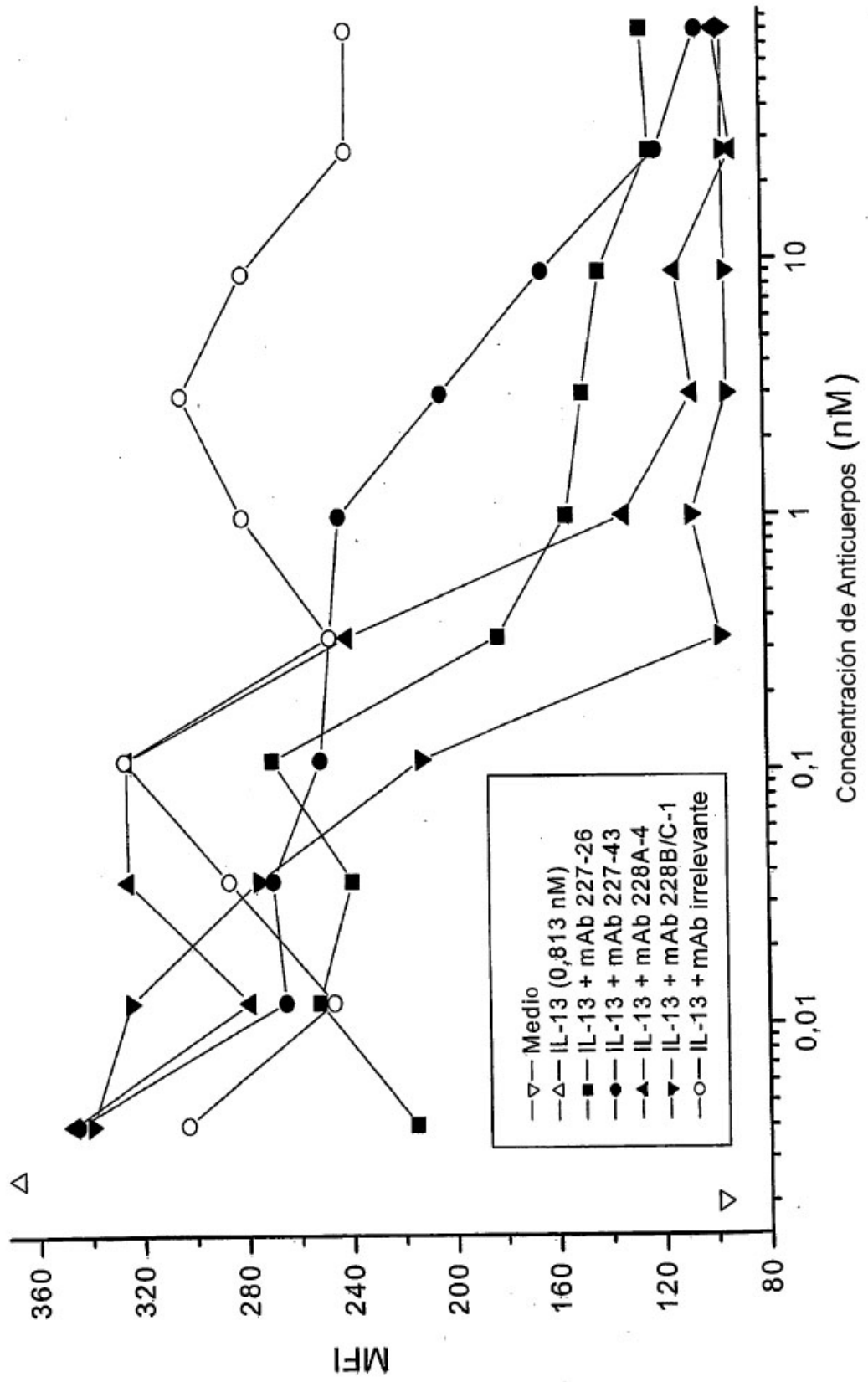


Fig. 7 Los mAb anti-IL13 inhiben fosforilación de Stat6 inducida por IL13 en células THP-1

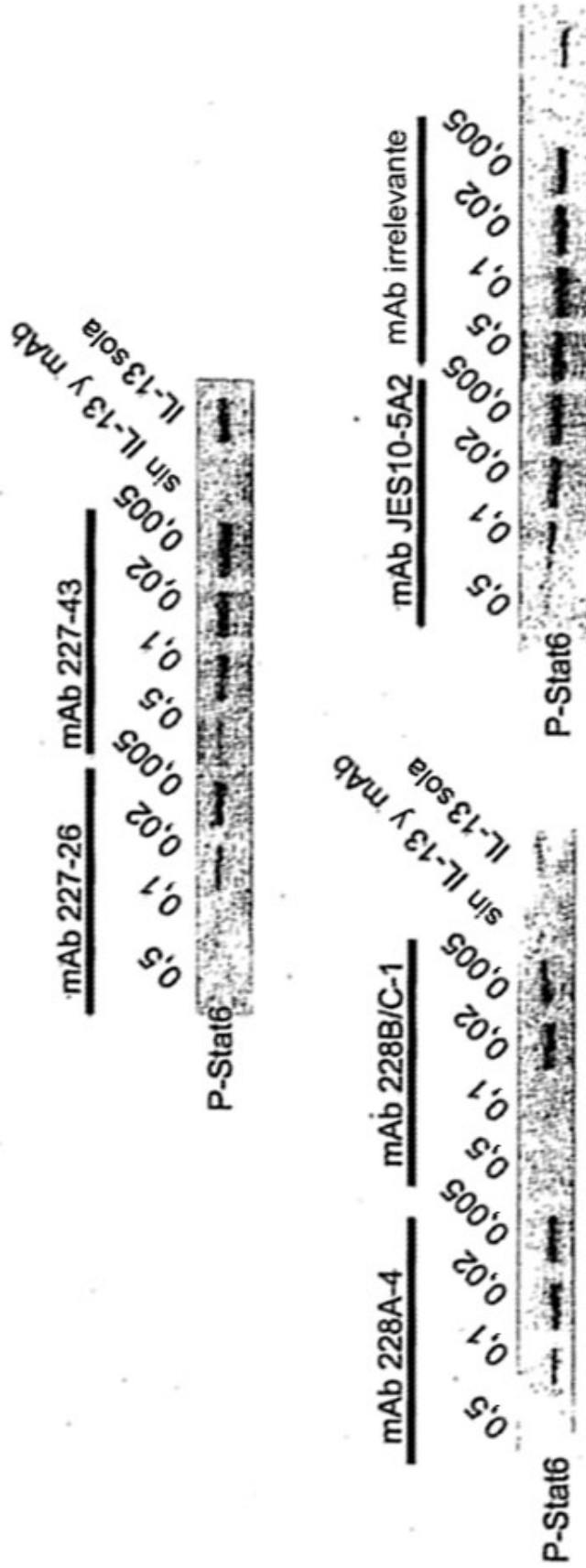


FIGURA 8

Anticuerpo 228B/C-1

Cadena pesada (VH)

1 10 20 30
 Q V Q L Q E S G P G L V A P S Q S L S I T C T V S G F S L N A Y S V N W V
 40 50 52a 53 60 65 70
 R Q P P G K G L E W L G M I W G D G K I V Y N S A L K S R L N I S K D S S
 80 82 90 95 100 b c d e f 101
 K S Q V F L K M S S L Q S D D T A R Y Y C A G D G Y Y P Y A M D N W G H G T
 118
 S V T V S S (SEC ID N°: 4)

Cadena ligera (VK)

10 20 30
 N I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T I S C R A S K S V D S Y G N S F M H W
 40 50 60 70
 Y Q Q K P G Q P P K L L I Y L A S N L E S G V P A R F S G S G S R T D F T L T I
 80 90 100 113
 D P V E A D D A A S Y Y C Q Q N N E D P R T F G G G T K L E I K R A (SEC ID N°: 3)

Subrayado: CDR de Kabat. Negrita/cursiva: CDR1 de Chotia.

FIGURA 9
Anticuerpo 228A-4
Cadena pesada (VH)

1 Q V Q L K E S G P G L V A P S Q S L S I T C T V S G F S L T D Y N I N W I R Q 30
 40 P P G K G L E W L G M I W G D G S T A Y N S A L K S R L S I S K D N S K S Q I F 70
 80 82ab c 83 90 95 100 b c d e f 101 110
 L K M N S L Q T E D T A R Y Y C A R D G Y F P Y A M A Y W G Q G T

118
 S V T V S S (SECIDN: 6)

Cadena ligera (VK)

1 N I V L T Q S P T S L A V S L G Q R A T I S C R A S E S V D S Y G N G F I H W 30
 40 Y Q Q K P G Q P P K L L I Y L A S N L E S G V P A R F S G S G S R T D F T L T I 70
 80 D P M E A D D A A T Y Y C Q Q N N E D P R T F G G G T K L E I K R A 113 (SECIDN: 5)

Subrayado: CDR de Kabat. Negrita/cursiva: CDR1 de Chotia.

FIGURA 10
Anticuerpo 227-26
Cadena pesada (VH)

1 Q V Q L Q Q S G D D L V L P G A S V K L S C K A S G Y T F T S Y W I N W I 30
 20
 40 K Q R P G Q G L E W I G H I A P G S G S T Y F N E M F K G K A T L T V D T 70
 50 52a 53 60 65
 80 S S S T A Y I Q L S S L S S E D S A V Y F C A R S D I F L S Y A M D Y W G Q 100 b c d e f
 90 95

118
 G T S V T V S S (SEC ID N°: 8)

Cadena ligera (VK)

1 D V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S I V H S N G N T Y L Q 30
 20
 40 W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K 70
 50 60
 80 I S R V E A E D L G V Y Y C F Q G S H V P Y T F G G G T K L E I K R A 114
 100 (SEC ID N°: 7)

Subrayado: CDR de Kabat. Negrita/cursiva: CDR1 de Chotia.

FM1	FIGURA 11C		ID	SEC ID N.º	SEC ID N.º																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23			COR1	FM2	40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54	COR2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
H12-4027 #7	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000

SEC ID N.º

FM3	FIGURA 11 D	SEC ID N.º	FMA	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
O	V	60	44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	61	45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	62	46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	63	47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	64	48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	65	49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	66	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	67	51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	68	52	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	69	53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	70	54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	71	55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	72	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	73	57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	74	58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	75	59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	76	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	77	61	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	78	62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	79	63	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	80	64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	81	65	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	82	66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	83	67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	84	68	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	85	69	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	86	70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	87	71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	88	72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	89	73	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	90	74	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	91	75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	92	76	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	93	77	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	94	78	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	95	79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	96	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	97	81	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	98	82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	99	83	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	100	84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	101	85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	102	86	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	103	87	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	104	88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	105	89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	106	90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	107	91	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	108	92	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	109	93	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	110	94	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	111	95	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	112	96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	113	97	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	114	98	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	115	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	116	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	117	101	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	118	102	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	119	103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	120	104	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	121	105	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	122	106	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	123	107	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	124	108	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	125	109	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	126	110	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	127	111	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	128	112	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	129	113	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	V	130	114	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

FIGURA 12C

FM1		SEC ID N.º FR2		SEC ID N.º	
HT2-0p27 #7	QVTLRESGPA	1	1	30	48
HT2-0p27 #13	QVTLRESGPA	2	1	31	49
HT2-0p27 #19	QVTLRESGPA	3	1	32	50
HT2-0p27 #29	QVTLRESGPA	4	1	33	51
HT2-0p27 #34	QVTLRESGPA	5	1	34	52
HT2-0p27 #40	QVTLRESGPA	6	1	35	53
HT2-0p27 #43	QVTLRESGPA	7	1	36	54
HT2-0p27 #50	QVTLRESGPA	8	1	37	55
HT2-0p27 #53	QVTLRESGPA	9	1	38	56
HT2-0p27 #56	QVTLRESGPA	10	1	39	57
HT2-0p27 #57	QVTLRESGPA	11	1	40	58
HT2-0p27 #73	QVTLRESGPA	12	1	41	59
HT2-0p27 #89	QVTLRESGPA	13	1	42	60
HT2-0p27 #92	QVTLRESGPA	14	1	43	61
HT2-0p27 #100	QVTLRESGPA	15	1	44	62
HT2-0p27 #111	QVTLRESGPA	16	1	45	63
HT2-0p27 #112	QVTLRESGPA	17	1	46	64
HT2-0p27 #118	QVTLRESGPA	18	1	47	65
HT2-0p27 #123	QVTLRESGPA	19	1	48	66
HT2-0p27 #136	QVTLRESGPA	20	1	49	67
HT2-0p27 #144	QVTLRESGPA	21	1	50	68
HT2-0p27 #148	QVTLRESGPA	22	1	51	69
HT2-0p27 #15	QVTLRESGPA	23	1	52	70
HT2-0p27 #28	QVTLRESGPA	24	1	53	71
HT2-0p27 #53	QVTLRESGPA	25	1	54	72
HT2-0p27 #164	QVTLRESGPA	26	1	55	73
HT2-0p27 #177	QVTLRESGPA	27	1	56	74
HT2-0p27 #199	QVTLRESGPA	28	1	57	75
HT2-0p27 #150	QVTLRESGPA	29	1	58	76
HT2-0p27 #268	QVTLRESGPA	30	1	59	77
HT2-0p27 #270	QVTLRESGPA	31	1	60	78
HT2-0p27 #198	QVTLRESGPA	32	1	61	79
HT2-0p27 #273	QVTLRESGPA	33	1	62	80
HT2-0p27 #282	QVTLRESGPA	34	1	63	81
HT2-0p27 #304	QVTLRESGPA	35	1	64	82
HT2-0p27 #155B	QVTLRESGPA	36	1	65	83
HT2-0p27 #274	QVTLRESGPA	37	1	66	84
HT2-0p27 #275	QVTLRESGPA	38	1	67	85
HT2-0p27 #276	QVTLRESGPA	39	1	68	86
HT2-0p27 #299	QVTLRESGPA	40	1	69	87
HT2-0p27 #308	QVTLRESGPA	41	1	70	88
HT2-0p27 #467	QVTLRESGPA	42	1	71	89
HT2-0p27 #530	QVTLRESGPA	43	1	72	90
HT2-0p27 #590	QVTLRESGPA	44	1	73	91
HT2-0p27 #374	QVTLRESGPA	45	1	74	92
HT2-0p27 #443	QVTLRESGPA	46	1	75	93
HT2-0p27 #458	QVTLRESGPA	47	1	76	94
HT2-0p27 #470	QVTLRESGPA	48	1	77	95
HT2-0p27 #471	QVTLRESGPA	49	1	78	96
HT2-0p27 #488	QVTLRESGPA	50	1	79	97
HT2-0p27 #510	QVTLRESGPA	51	1	80	98
HT2-0p27 #824	QVTLRESGPA	52	1	81	99
HT2-0p27 #854	QVTLRESGPA	53	1	82	100

FIGURA 13A

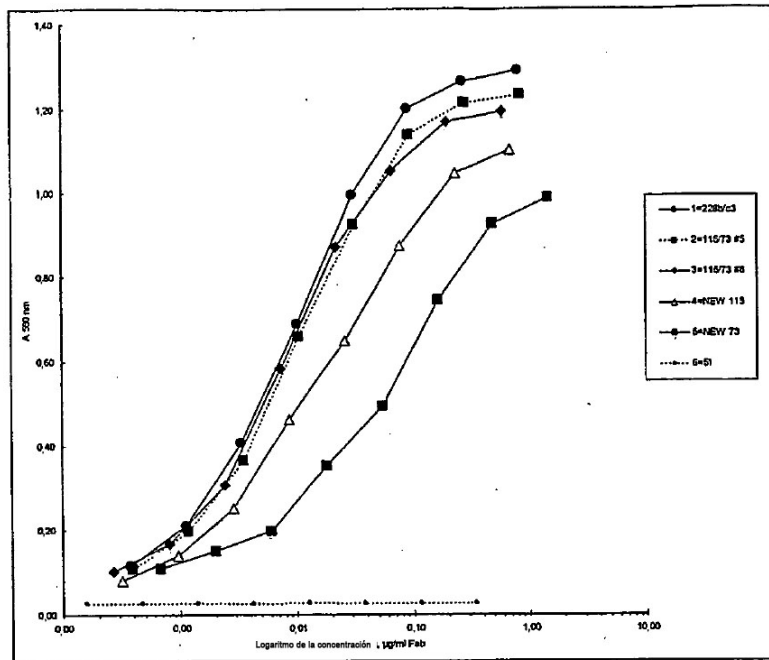


FIGURA 13B

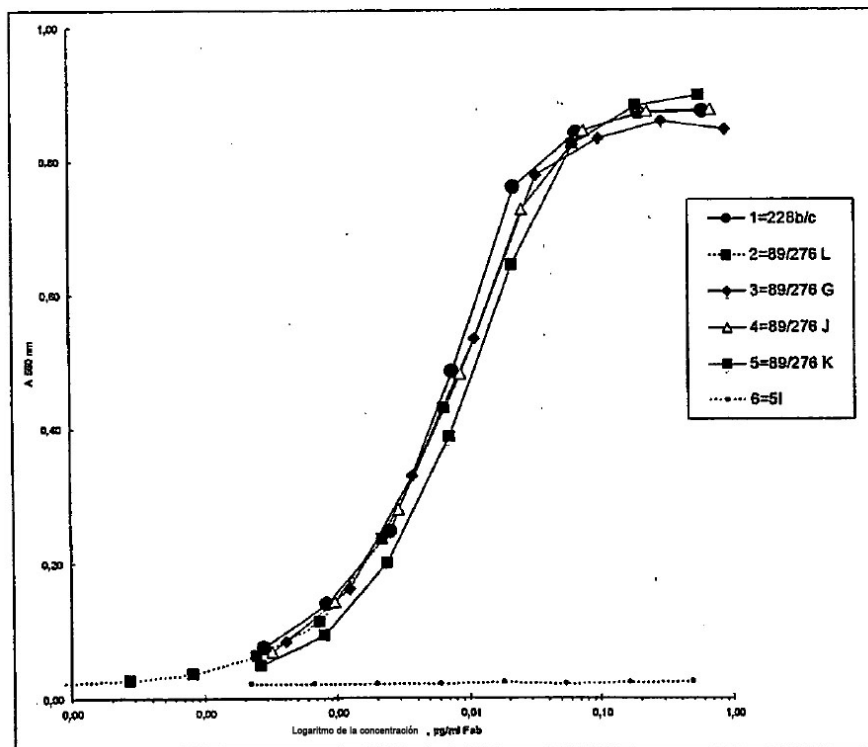


FIGURA 13C

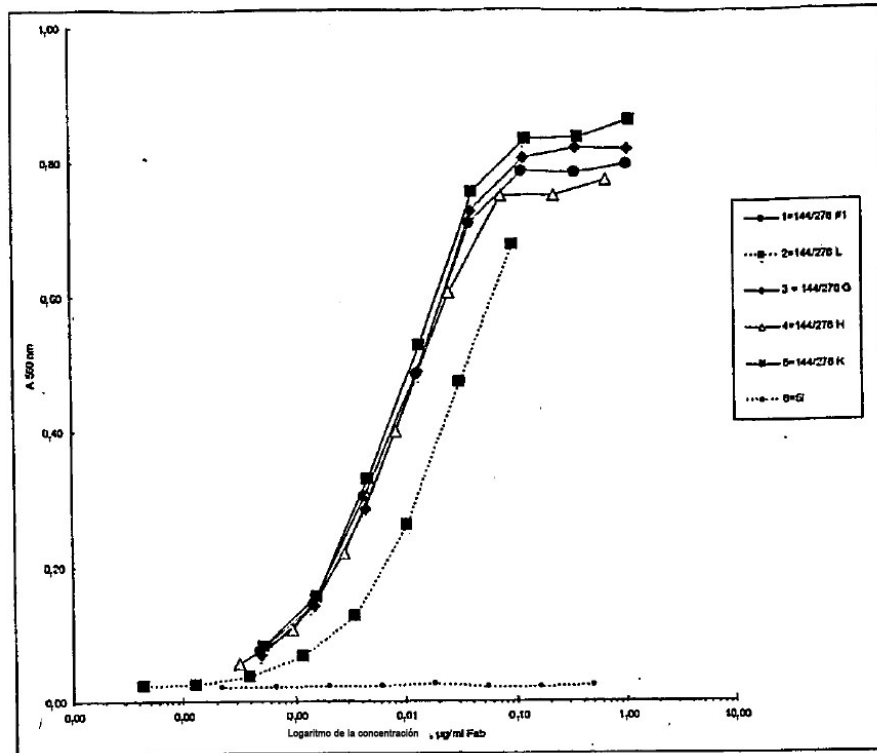


FIGURA 13D

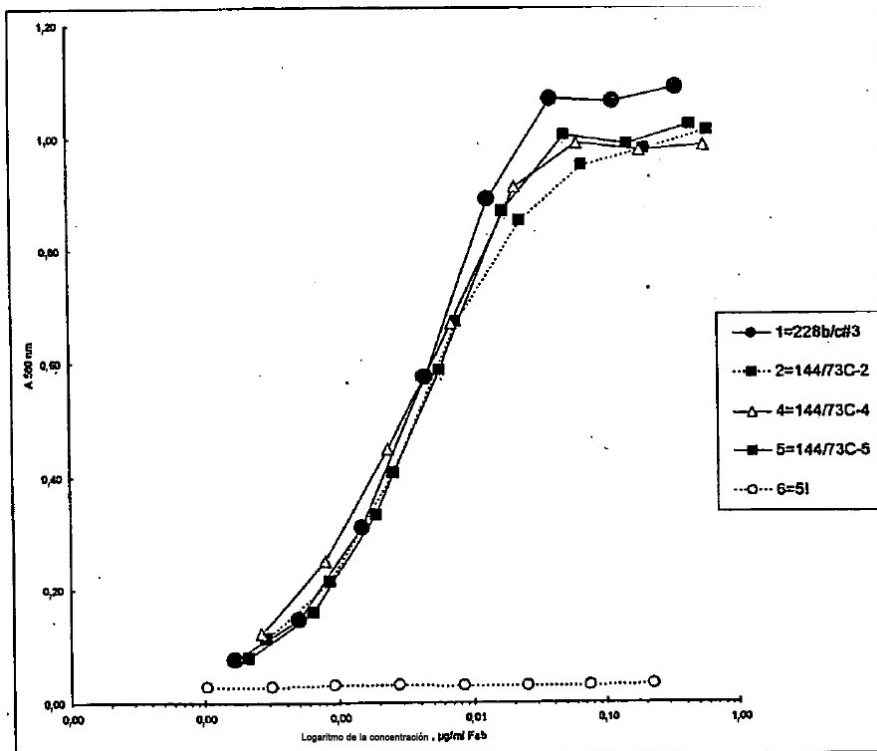


FIGURA 14A

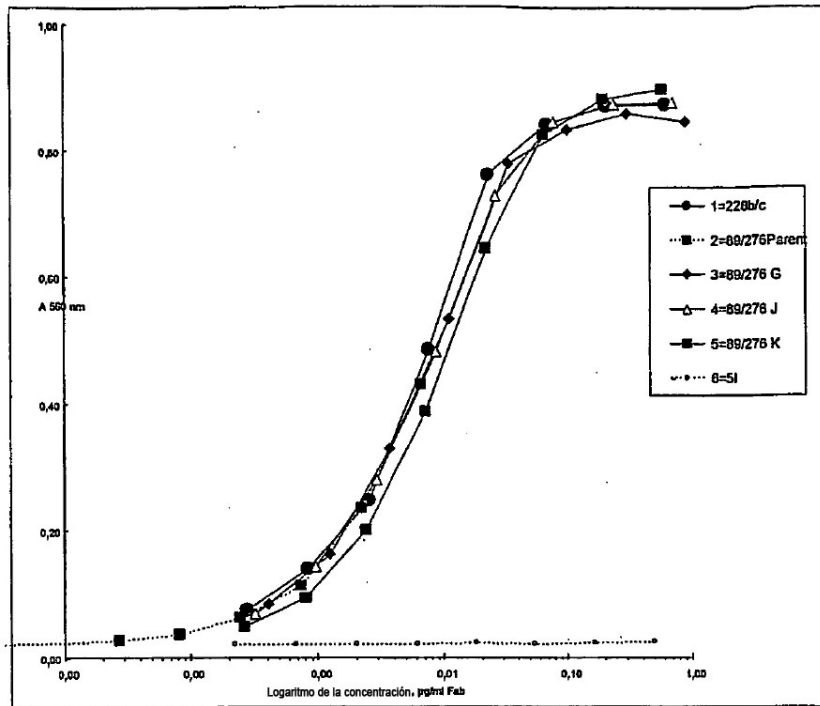


FIGURA 14B

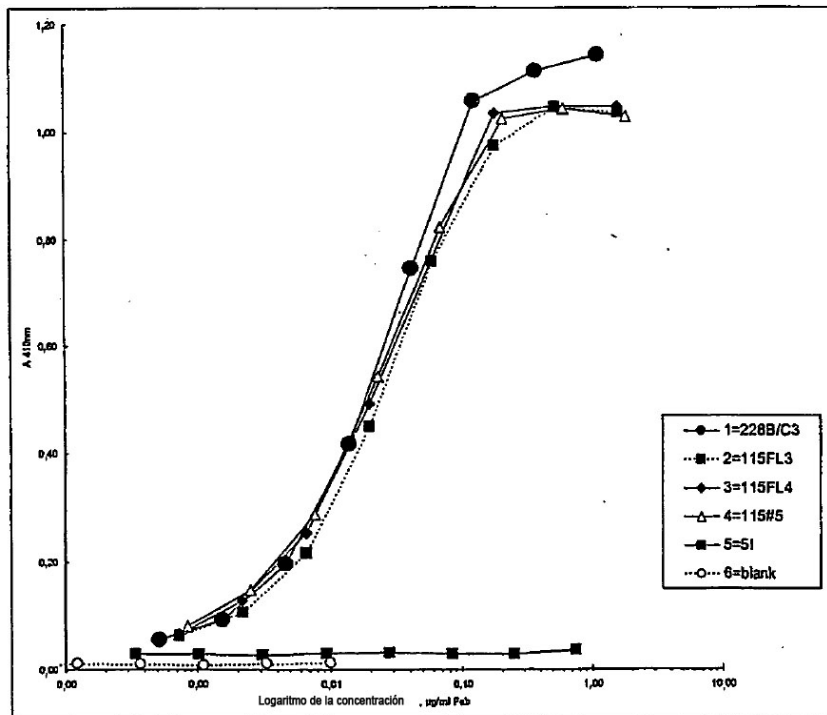


FIGURA 15

L1-59
(parental)
CDR-L1 R A S K S V D S Y G Q S F M H

CL-5 R A S K S V D S Y G Q S F M H
CL-13 R A S K S V D S Y G Q S F M H
CL-42 R A S K S V D S Y G Q S F M H
CL-48 R A S K S V D S Y G Q S F M H
CL-50 R A S K S V D S Y G Q S F M H
CL-56 R A S K S V D S Y G Q S F M H
CL-65 R A S K S V D S Y G Q S F M H
CL-69 R A S K S V D S Y G Q S F M H
CL-82 R A S K S V D S Y G Q S F M H
CL-94 R A S K S V D S Y G Q S F M H

L1-59
(parental)
CDR-L3 Q Q N N E D P R T

CL-5 Q Q N A E D P R T
CL-13 Q Q N N E D P R T
CL-42 Q Q N A E D P R T
CL-48 Q Q N N E D P R T
CL-50 Q Q N A E D P R T
CL-56 Q Q N A E D P R T
CL-65 Q Q N N E D P R T
CL-69 Q Q N A E D P R T
CL-82 Q Q N N E D P R T
CL-94 Q Q N A E D P R T

L1-59
(parental)
CDR-H1 A Y S V N

CL-5 A Y S V N
CL-13 A K S V N
CL-42 A N S V N
CL-48 A N S V N
CL-50 A K S V N
CL-56 A K S V N
CL-65 A S S V N
CL-69 A N S V N
CL-82 A N S V N
CL-94 A N S V N

L1-59
(parental)
CDR-H3 D G Y Y P Y A M D N

CL-5 D G Y Y P Y A M K N
CL-13 D G Y Y P Y A M S N
CL-42 D G Y Y P Y A M K N
CL-48 D G Y Y P Y A M K N
CL-50 D G Y Y P Y A M K N
CL-56 D G Y Y P Y A M S N
CL-65 D G R Y P Y A M K N
CL-69 D G Y Y P Y A M D N
CL-82 D G Y Y P Y A M K N
CL-94 D G Y Y P Y A M K N

FIGURA 16

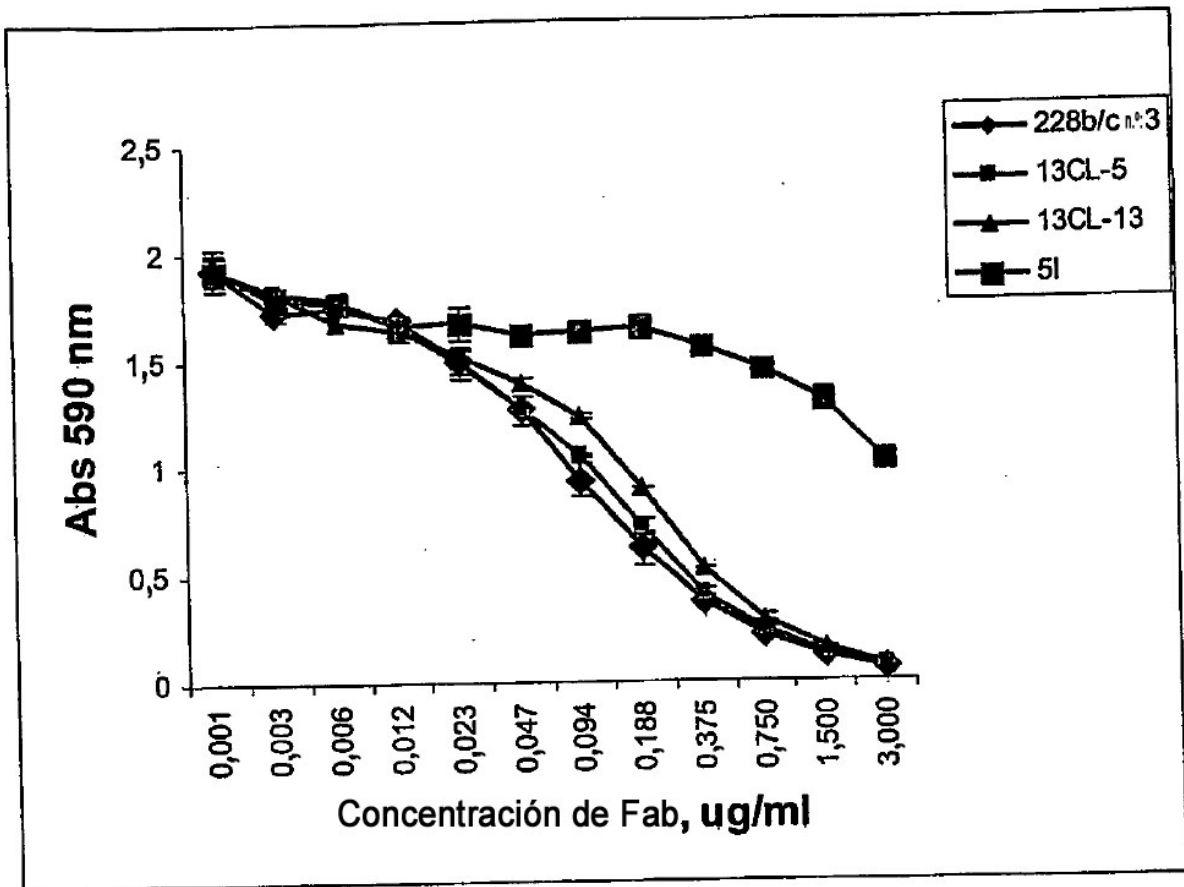


Figura 17: Secuencias aminoácidas de región variable para candidatos anti-IL3

CL-5 (candidato maduro de afinidad) V_k:
 DIVMTQSPDLSVSLGERATINCRASKSVDSYGQSFMHWYQQKPGQPKLLIYLASNLESGVPPDRFSGSGGTDFT
 LTISSLQAEDVAVYYCQQAEDPRIFGGGKVEIKR (SECIDN.º: 93)

CL-5 (candidato maduro de afinidad) V_h:
 QVTLRESGPALVKPTQTLTCTGSGFSLSAYSVNWIRQPPGKALEWLA MIWGDGKIVYNSALKSRLLTISKDTSKN
 QVVLTMNMDPVDTATYYCAVDGYYPYAMKNWGGSLVTVSS (SECIDN.º: 94)

CL-13 (candidato maduro de afinidad) V_k:
 DIVMTQSPDLSVSLGERATINCRASKSVDSYGQSFMHWYQQKPGQPKLLIYLASNLESGVPPDRFSGSGGTDFT
 LTISSLQAEDVAVYYCQQAEDPRIFGGGKVEIKR (SECIDN.º: 95)

CL-13 (candidato maduro de afinidad) V_h:
 QVTLRESGPALVKPTQTLTCTGSGFSLSAKSVNWIRQPPGKALEWLA MIWGDGKIVYNSALKSRLLTISKDTSKN
 QVVLTMNMDPVDTATYYCAVDGYYPYAMSNWGGSLVTVSS (SECIDN.º: 96)

CL-50 (candidato maduro de afinidad) V_k:
 DIVMTQSPDLSVSLGERATINCRASKSVDSYGQSFMHWYQQKPGQPKLLIYLASNLESGVPPDRFSGSGGTDFT
 LTISSLQAEDVAVYYCQQAEDPRIFGGGKVEIKR (SECIDN.º: 97)

CL-50 (candidato maduro de afinidad) V_h:
 QVTLRESGPALVKPTQTLTCTGSGFSLSAKSVNWIRQPPGKALEWLA MIWGDGKIVYNSALKSRLLTISKDTSKN
 QVVLTMNMDPVDTATYYCAVDGYYPYAMKNWGGSLVTVSS (SECIDN.º: 98)

FIGURA 18

Alineamiento de secuencias proteicas de IL13

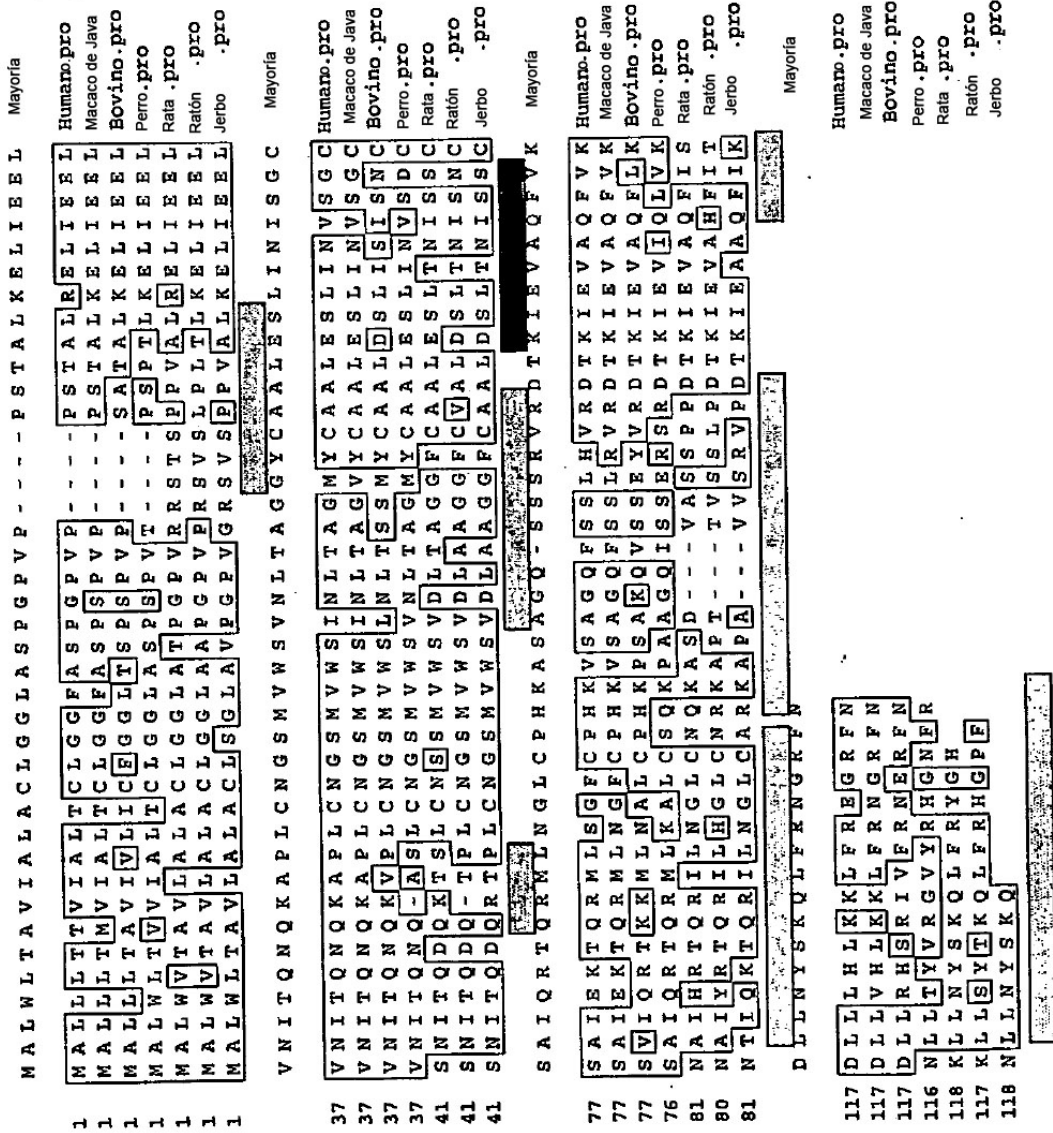


Figura 19 IL3 y el epitopo de unión de MAb 228B/C

			10	20	30	40	
							↓ ↓
1	M A L L L T T V I A L T C L G G F A S P G P V P P S T - - - A L R E L I E E L						humano
1	M A L L L T T M V I A L T C L G G F A S P S P V P P S T - - - A L R E L I E E L						mono
1	M A L L W V T A V L A L L A C L G G L A P G P V P P S V S L P L T L K E L I E E L						ratón
			50	60	70	80	
37	V N I T Q N Q K A P L C N G S M V W S I N N L T A G M Y C A A L E S L I N V S G C						humano
37	V N I T Q N Q K A P L C N G S M V W S I N N L T A G V Y C A A L E S L I N V S G C						mono
41	S N I T Q D Q - T P E L L C N G S M V W S V D L L A A G G F C V A L D S L T N I S N C						ratón
			90	100	110	120	
							↓ ↓
77	S A I E K T Q R M L S G F F C P H K V S S A N G G Q F S S L H V R D T K I E V A Q F V K						humano
77	S A I E K T Q R M L N G F F C P H K V S S A N G G Q F S S L R R V R D T K I E V A Q F V K						mono
80	N A I Y R T Q R I L L H G L C N R K A P P T - T V S S L P - - - D T K I E V A H F I T						ratón
			130				
							↓ ↓
117	D L L L H L K K L F R E G R F N						humano
117	D L L V H L K K L F R N G R F N						mono
117	K L L S Y T K Q L F R H G P F						ratón

FIGURA 20

CDR-L1			CDR-H1		
P	RASKSVDSYGNSFMH	SEC ID N ^o . 99	P	AYSVN	SEC ID N ^o . 117
V1	RASKSVDSYGOSFMH	SEC ID N ^o . 100	V1	AKSVN	SEC ID N ^o . 118
V2	RASKSVDSYGOSFLH	SEC ID N ^o . 101	V2	ANSVN	SEC ID N ^o . 119
V3	RASKSVDSYGNSYMH	SEC ID N ^o . 102	V3	GYSVN	SEC ID N ^o . 120
V4	RASKSVDSYGNSFLH	SEC ID N ^o . 103	V4	AHSVN	SEC ID N ^o . 121
			V5	ARSVN	SEC ID N ^o . 122
CDR-L2			CDR-H2		
P	LASNLES	SEC ID N ^o . 104	P	MIWGDGKIVYNSALKS	SEC ID N ^o . 123
V1	LASNLNS	SEC ID N ^o . 105	V1	MIWGDGKISYNSALKS	SEC ID N ^o . 124
V2	LASNLOS	SEC ID N ^o . 106	V2	MIWGDGKIVYNSALES	SEC ID N ^o . 125
V3	LATNLES	SEC ID N ^o . 107	V3	MIWGDGKIVYNSALKS	SEC ID N ^o . 126
V4	LASNLS	SEC ID N ^o . 108	V4	MIWGDGKIVYNSDLKS	SEC ID N ^o . 127
V5	LASNLEK	SEC ID N ^o . 109	V5	MIWGDGKVVYNSALKS	SEC ID N ^o . 128
V6	LASRLES	SEC ID N ^o . 110	V6	MIWGDGKIVYNSSELKS	SEC ID N ^o . 129
V7	LASNLHS	SEC ID N ^o . 111	V7	MIWGDGKIAVYNSALKS	SEC ID N ^o . 130
V8	LASNLSS	SEC ID N ^o . 112	V8	MIWGDGKIVYNSALKE	SEC ID N ^o . 131
V9	LASFLES	SEC ID N ^o . 113	V9	MVWGDGKIVYNSALKS	SEC ID N ^o . 132
V10	LANNLES	SEC ID N ^o . 114	V10	MIWGDGKIVYNSALAS	SEC ID N ^o . 133
			V11	MIWGDGKVVYNSALKS	SEC ID N ^o . 134
CDR-L3			CDR-H3		
P	QONNEDPRT	SEC ID N ^o . 115	P	DGYYPYAMDN	SEC ID N ^o . 135
V1	QONAEDPRT	SEC ID N ^o . 116	V1	DGRYPYAMDN	SEC ID N ^o . 136
			V2	DGYYPYAMKN	SEC ID N ^o . 137
			V3	DGRYPYAMKN	SEC ID N ^o . 138
			V4	DGYYPYAMSN	SEC ID N ^o . 139
			V5	DGYYPYAMAN	SEC ID N ^o . 140
			V6	DGYYPYALDN	SEC ID N ^o . 141

FIGURA 21A: secuencias aminoacídicas de regiones variables para ciertos candidatos anti-il13

CL-89 Vh (SEC ID N.º: 142):

DIVMTQSPDLSVSLGERATINCRASKSVDSYGNSEMFHWYQQKPKLLIYLASNLESGVDPDRFSGSGSGT
DFTLTISLQAEDVAVYYCQQNNEDPRIFGGGTKVEIKR

CL-276G Vh (SEC ID N.º: 143):

QVTLRESGPALVKPTQTLTCTVSGFSLSAYSVNWIRQPPGKALEWLAMIWGDGKIVYNSALKSRRLTISKDTS
KNQVVLTMTNMDPVDATYCYCAGDGYYPYAMDNDWGGSLVTVSS

RL-36 (candidato de biblioteca aleatoria) Vh (SEC ID N.º: 144):

DIVMTQSPDLSVSLGERATINCRASKSVDSYGNSEMFHWYQQKPKLLIYLASNLESGVDPDRFSGSGSGT
DFTLTISLQAEDVAVYYCQQNNEDPRIFGGGTKVEIKR

RL-36 (candidato de biblioteca aleatoria) Vh (SEC ID N.º: 145):

QVTLRESGPALVKPTQTLTCTGSGFSLSAYSVNWIRQPPGKALEWLAMIWGDGKIVYNSALKSRRLTISKDTS
KNQVVLTMTNMDPVDATYCYCAVDGYYPYAMDNDWGGSLVTV
SS

RL-19 (candidato de biblioteca aleatoria) Vh (SEC ID N.º: 146):

QVTLRESGPALVKPTQTLTCTSSGFSLSAYSVNWIRQPPGKALEWLAMIWGDGKIVYNSALKSRRLTISKDTS
KNQVVLTMTNMDPVDATYCYCALDGYYPYAMDNDWGGSLVTV
SS

FIGURA 21B: secuencias aminoacídicas de regiones variables para ciertos candidatos anti-IL13:

RL-11 (candidato de biblioteca aleatoria) Vh (SEC ID N.º: 147):

QVTLRESGPALVKPTQTLTCTTSGFSLAYSVNWIRQPPGKALEWLA MIWGDGKIVYNSALKSRRLTISKDTS
 KNQVLTMTNMDPVDATYYCAVDGYYPYAMDNDWGGSLVTV
 SS

RL-8 (candidato de biblioteca aleatoria) Vh (SEC ID N.º: 148):

QVTLRESGPALVKPTQTLTCTTSGFSLAYSVNWIRQPPGKALEWLA MIWGDGKIVYNSALKSRRLTISKDTSK
 NQVLTMTNMDPVDATYYCASDGYYPYAMDNDWGGSLVTV
 SS

RL-45 (candidato de biblioteca aleatoria) Vh (SEC ID N.º: 149):

QVTLRESGPALVKPTQTLTCTTSGFSLAYSVNWIRQPPGKALEWLA MIWGDGKIVYNSALKSRRLTISKDTS
 KNQVLTMTNMDPVDATYYCATDGYYPYAMDNDWGGSLVTV
 SS

RL36-L1,59 (candidato madurado de afinidad L1) Vk (SEC ID N.º: 150):

DIVMTQSPDLSVSLGERATINCRASKSVDSYGSEFMHW YQQKPGQPKLLIYLASNLESVGPDRFSGSGGT
 DFTLTISLQAEDVAVYYCQNNEDPRIFGGGKVEIKR

RL36-L1,59 (candidato madurado de afinidad L1) Vh (SEC ID N.º: 151):

QVTLRESGPALVKPTQTLTCTTSGFSLAYSVNWIRQPPGKALEWLA MIWGDGKIVYNSALKSRRLTISKDTS
 KNQVLTMTNMDPVDATYYCAVDGYYPYAMDNDWGGSLVTVSS

Candidato scFV n.º: 212 (SEC ID N.º: 152):

QVTLRESGPALVKPTQTLTCTVSGFSLAYSVNWIRQPPGKALEWLA MIWGDGKIVYNSALKSRRLTISKDTS
 KNQVLTMTNMDPVDATYYCAGDGYYPYAMDNDWGGSLVTV
 SSGGSSRSSSGGGGGGDIVMTQSPDLSVSLGERATINCRASKSVDSYGNSEFMHWYQQKPGQPKLLI
 YLASNLESVGPDRFSGSGTDFTLTISVQAEDVAVYYCQQN
 NEDPRIFGGGKVEIKR