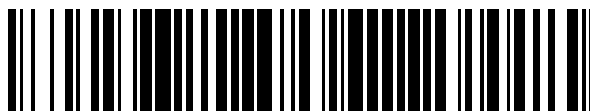


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 567**

51 Int. Cl.:
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 5/20 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07868510 .4**
96 Fecha de presentación: **19.10.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2068922**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.06.2009**

54 Título: **Anticuerpos anti-IL-13R alfa 1 y usos de los mismos**

30 Prioridad:
19.10.2006 US 852780 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2012

73 Titular/es:
CSL LIMITED
45 Poplar Road
Parkville VIC 3052 , AU

72 Inventor/es:
NASH, Andrew Donald;
BACA, Manuel;
FABRI, Louis Jerry;
ZALLER, Dennis;
STROHL, William R. y
AN, Zhiqiang

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 388 567 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-IL-13R alfa 1 y usos de los mismos

Antecedentes de la Invención

5 La interleucina-13 (IL-13) está implicada en la inducción de la producción de IgE e IgG4, así como la diferenciación de los linfocitos T cooperadores (Th) en un fenotipo secretor (Th2). Estas etapas inmunoestimuladoras son críticas en el desarrollo de enfermedades atópicas, que son una gran amenaza para la salud humana, tales como la anafilaxia (Howard y col., *Am J Hum Genet* 70(1):230-236, 2002; Noguchi y col., *Hum Immunol* 62(11):1251-1257, 2001), así como las afecciones más leves, tales como la fiebre del heno, la rinitis alérgica y la sinusitis crónica que, aunque no ponen en peligro la vida, son responsables de una considerable morbilidad en todo el mundo.

10 La IL-13 es un mediador en la patología de las fases aguda y crónica del asma. Durante un ataque de asma, su expresión aumenta y sus efectos incluyen la reducción de la capacidad de las células epiteliales del pulmón para mantener una barrera firme contra los patógenos y las partículas inhaladas (Ahdieh y col., *Am J. Physiol. Cell Physiol.* 281 (6):C2029-2038, 2000) y la estimulación de la hiperreactividad de las vías respiratorias inducida por alérgenos (Morse y col., *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 282(1):L44-49, 2002). A largo plazo, la IL-13 promueve cambios estructurales no inflamatorios en las vías respiratorias asmáticas, tales como una mayor expresión de los genes de mucinas, daños en las vías respiratorias y obstrucción de las vías aéreas pequeñas (Howard y col., 2002, *supra*; Danahay y col., *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 282(2):L226-236, 2002).

20 Los efectos biológicos de IL-13 están mediados por un complejo receptor dimérico que incluye las subunidades IL-13R α 1 e IL-4R α . Se postula que la unión de IL-13 a IL-13R α 1 desencadena la dimerización con IL-4R α y la activación de mediadores intracelulares que incluyen las cinasas Janus JAK1 y JAK2, así como STAT6, ERK y p38 (David y col., *Oncogene* 20 (46):6660-6668, 2001; Perez y col., *J. Immunol.* 168(3):1428-1434, 2002).

25 La IL-13 muestra muchos efectos biológicos solapados con los de IL-4. La IL-13 y la IL-4 están relacionadas por secuencia y están implicadas en muchos procesos relacionados, tales como la mielopoyesis y la regulación de las funciones pro-inflamatorias de los monocitos/macrófagos. Por ejemplo, se ha demostrado que tanto IL-13 como IL-4 tienen efecto sobre los linfocitos B de una manera similar, regulando positivamente las moléculas de superficie tales como MHC de clase II y moléculas CD23, y promoviendo la secreción de IgG4 e IgE.

30 Las actividades solapadas de IL-13 e IL-4 pueden explicarse en parte por su complejo receptor dimérico compartido. El complejo receptor de IL-13 se compone de un IL-13R α 1 y un IL-4R α ; este mismo complejo receptor es también el complejo receptor de IL-4 de Tipo II (Callard y col., *Immunology Today* 17(3):108, 1996). Como tal, en la búsqueda por lograr el control terapéutico del complejo receptor de IL-13 bloqueando la señalización mediada por citocinas, puede resultar útil tener no sólo una molécula que inhiba la señalización mediada por IL-13, sino una molécula que inhiba la señalización mediada por IL-13 e IL-4.

35 Gauchat y col. (*Eur. J. Immunol.* 28:4286-4298, 1998) informaron acerca de anticuerpos murinos contra IL-13R α 1 humano que bloqueaban la interacción de una IL-13 marcada con una IL-13R α 1 soluble inmovilizado y marcado. Estos anticuerpos también inhibían la unión de IL-13 a IL-13R α 1 en células HEK-293 transfectadas. Sin embargo, ninguno de estos anticuerpos neutralizaba la actividad biológica inducida por IL-13, lo que sugiere que no eran antagonistas del complejo receptor IL-13R α 1/IL-4R α completo. En un artículo posterior, Gauchat y col. (*Eur. J. Immunol.* 30:3157-3164, 2000) informaron acerca de un anticuerpo de rata, denominado C41, contra IL-13R α 1 murino que se unía a células HEK-293 transfectadas con IL-13R α 1 murino. Sin embargo, C41 no neutralizaba las actividades biológicas inducidas por IL-13. Además, C41 no reaccionaba con la forma soluble de IL-13R α 1 humano. Akaiwa y col. (*Cytokine* 13:75-84, 2001) informaron acerca de un anticuerpo que reconocía IL-13R α 1 soluble mediante inmunoensayo enzimático y una IL-13R α 1 de longitud completa marcado transfectado en células COS7. El anticuerpo se utilizó para la inmunohistoquímica pero no hay ningún indicio de que fuese un anticuerpo neutralizante.

45 En el documento WO 03/46009 se muestran anticuerpos murinos contra IL-13R α 1 humana que inhibían la respuesta de las células TF-1 a IL-13 pero no a IL-4, y Krause y col. (*Mol Immunol.* 43(11):1799-807, 2006) describen anticuerpos murinos contra IL-13R α 1 humana que inhiben la proliferación de las células TF-1 dependiente de IL-13. Los anticuerpos contra hIL-13R α 1 también se conocen a partir de los documentos WO 97/15663, WO 03/080675, WO 06/072564 y Vermot-Desroches y col., 2000 *Tissue Antigens* 5(Supp. 1):52-53 (sumario de la reunión).

50 A pesar de estos informes, sigue existiendo la necesidad de anticuerpos contra IL-13R α 1 humano que sean adecuados para la administración a seres humanos y que bloqueen la actividad de IL-13.

Sumario de la Invención

55 La presente invención se refiere en general a anticuerpos aislados, en concreto anticuerpos monoclonales humanos, humanizados, desinmunizados, quiméricos o primatizados, que se unen a hIL-13R α 1 a través de uno o varios de los restos de aminoácidos 248-252 de hIL-13R α 1.

En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une a hIL-13R α 1 a través de uno o varios de los restos de aminoácidos 248-252 de hIL-13R α 1, inhibe la señalización de IL-13 y no presenta reacción cruzada con IL-13R α 1 de mono cynomolgus. En otra forma de realización de la presente invención, el anticuerpo monoclonal inhibe la liberación de eotaxina inducida por IL-13 en células NHDF.

5 Una mutación por sustitución en un péptido del dominio 3 de hIL-13R α 1 de los restos Val-Phe-Tyr-Val-Gln (SEC ID NO: 44) que corresponde a las posiciones 248-252 de la SEC ID NO: 1 con los restos Ile-Leu-Glu-Val-Glu (SEC ID NO: 45) conduce a una pérdida de la unión entre el anticuerpo y el péptido hIL-13R α 1 mutante resultante en comparación con la unión entre el anticuerpo y el péptido hIL-13R α 1 sin la mutación por sustitución.

10 Una mutación por sustitución en un péptido que incluye el dominio 3 de hIL-13R α 1 de cualquiera de: el resto de fenilalanina que corresponde a la posición 249 de la SEC ID NO: 1 con un resto de alanina; el resto de tirosina que corresponde a la posición 250 de la SEC ID NO: 1 con un resto de alanina; el resto de glutamina que corresponde a la posición 252 de la SEC ID NO: 1 con un resto de alanina; en la que dicha mutación conduce a una pérdida de la unión entre el anticuerpo y el péptido hIL-13R α 1 mutante resultante en comparación con la unión entre el anticuerpo y el péptido hIL-13R α 1 sin las sustituciones.

15 Un grupo de anticuerpos de la presente invención son los anticuerpos monoclonales humanos 4B5, 8B11 y 15F4. En concreto, tales anticuerpos contienen una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEC ID NO: 4, la SEC ID NO: 8 y la SEC ID NO: 12.

20 Las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 se establecen en: (i) las SEC ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente; (ii) las SEC ID NO: 9, 10 y 11, respectivamente; o (iii) las SEC ID NO: 13, 14 y 15, respectivamente. Las secuencias de la región variable de la cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 se establecen en: las SEC ID NO: 17, 18 y 19, respectivamente. Otros anticuerpos de la divulgación incluyen conjuntos de secuencias de CDR de la cadena pesada y/o ligera de 4B5, 8B11 y 15F4 o modificaciones de secuencias conservativas de las mismas u homólogos de las mismas. Otros anticuerpos de la presente divulgación incluyen las secuencias de la región variable de la cadena pesada y/o ligera de 4B5, 8B11 y 15F4 o modificaciones de secuencias conservativas de las mismas u homólogos de las mismas. Los anticuerpos abarcados específicamente por la invención incluyen aquellos producidos por líneas celulares de hibridoma tal como los números de depósito de la ATCC PTA6931, PTA6936 y PTA6935.

En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos que compiten por la unión a hIL-13R α 1 con cualquiera de 4B5, 8B11 o 15F4.

30 Los anticuerpos de la invención incluyen, por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, tales como un isotipo IgG1 o IgG4. De manera alternativa, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpo, tales como fragmentos Fab o Fab'2, o anticuerpos monocatenarios.

En las formas de realización específicas, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos humanos. De manera alternativa, los anticuerpos son anticuerpos humanizados, primatizados, desinmunizados, o quiméricos.

35 La presente divulgación también proporciona un inmunoconjugado que incluye un anticuerpo de la invención unido a un agente terapéutico, tal como una citotoxina o un isótopo radiactivo. La presente divulgación también proporciona una molécula biespecífica que incluye un anticuerpo de la presente invención, unido a un segundo resto funcional que tiene una especificidad de unión diferente que el anticuerpo.

40 También se proporcionan composiciones que incluyen un anticuerpo o un inmunoconjugado o una molécula biespecífica de la presente divulgación y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En el presente documento también están comprendidas moléculas de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la presente invención, así como los vectores de expresión que contienen tales ácidos nucleicos y las células hospedadoras que albergan tales vectores de expresión.

45 En otro aspecto, la divulgación proporciona procedimientos para identificar anticuerpos capaces de unirse a hIL-13R α 1 a través del dominio 3 de la región extracelular del receptor.

Otro aspecto de la divulgación proporciona un procedimiento para inhibir la señalización mediada por el receptor de IL-13 poniendo en contacto una célula que expresa IL-13R α 1 con un anticuerpo de la presente invención en condiciones que permitan que dicho anticuerpo se una a IL-13R α 1.

50 En otro aspecto más, la invención proporciona el anticuerpo de la presente invención para su uso en el tratamiento del asma, la EPOC, la dermatitis atópica, la rinitis alérgica, la eosinofilia esofágica, el linfoma de Hodgkin, la enfermedad intestinal inflamatoria, la psoriasis, la artritis psoriásica y la fibrosis.

Otras características y ventajas de la invención se pondrán de manifiesto a partir de los siguientes ejemplos y de la descripción detallada que no deben interpretarse como limitativos.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una representación de la región extracelular de IL-13R α 1 de ratón con aminoácidos que difieren de los de la secuencia humana mostrada en minúsculas. Se preparó un panel de proteínas IL-13R α 1 quiméricas humano/de ratón, presentadas en fagos, reemplazando sistemáticamente segmentos identificados individuales de la región extracelular de IL-13R α 1 humano con el correspondiente segmento subrayado de la secuencia derivada del ratón (es decir, HM1 a HM11).

La figura 2 es una representación de la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos derivada de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 4B5. Las CDR y los ácidos nucleicos que codifican las CDR están subrayados.

La figura 3 es una representación de la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos derivada de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 8B11. Las CDR y los ácidos nucleicos que codifican las CDR están subrayados.

La figura 4 es una representación de la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos derivada de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 15F4. Las CDR y los ácidos nucleicos que codifican las CDR están subrayados.

La figura 5 es una representación de la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos derivada de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 15F4. Las CDR y los ácidos nucleicos que codifican las CDR están subrayados.

La figura 6 es una comparación de secuencias de los dominios Fc de los isotipos IgG1 (SEC ID NO: 38), IgG2 (SEC ID NO: 39), IgG4 (SEC ID NO: 40) y el IgG2m4 (SEC ID NO: 41).

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación se refiere a anticuerpos aislados, especialmente anticuerpos monoclonales humanos, que se unen a IL-13R α 1 humano a través del dominio 3 de la región extracelular del receptor, y que inhiben determinadas propiedades funcionales de IL-13R α 1. La referencia a los "anticuerpos monoclonales" de la presente invención incluye las formas humanizadas, desimmunizadas y quiméricas de los mismos, así como las formas primatizadas. En determinadas formas de realización, los anticuerpos de la presente divulgación incluyen características estructurales concretas tales como regiones CDR que tienen secuencias de aminoácidos concretas. La presente divulgación proporciona anticuerpos aislados, procedimientos para generar tales anticuerpos, inmunoconjugados y moléculas biespecíficas que incluyen tales anticuerpos y composiciones farmacéuticas que contienen los anticuerpos, los inmunoconjugados o las moléculas biespecíficas de la invención. La divulgación también se refiere a procedimientos de uso de los anticuerpos para inhibir las respuestas a IL-13, por ejemplo en el tratamiento de diversos trastornos y enfermedades relacionadas con la IL-13 que incluyen el asma, la EPOC, la dermatitis atópica, la rinitis alérgica, la eosinofilia esofágica, el linfoma de Hodgkin, la enfermedad intestinal inflamatoria, la psoriasis, la artritis psoriásica y la fibrosis.

Se predice que la región extracelular de hIL-13R α consiste en 3 dominios globulares de fibronectina de tipo III, cada uno de aproximadamente 100 aminoácidos de longitud (Arima y col., J. Biol. Chem. 280(26):24915-22, 2005). El dominio amino-terminal de la fibronectina de tipo III (denominado en el presente documento dominio 1 o D1) va seguido de otros dos dominios de fibronectina de tipo III (denominados en el presente documento dominio 2 y dominio 3, o D2 y D3, respectivamente,) que tienen un módulo de homología del receptor de citocinas (Wells y de Vos, Ann. Rev. Biochem. 65:609-34, 1996). Para predecir los límites de secuencia de cada uno de estos dominios de fibronectina de tipo III, se alinearon las secuencias maduras de las regiones extracelulares de hIL-13R α 1 y hIL-4R α . La región extracelular de aproximadamente 200 restos de hIL-4R α consiste en un módulo de homología del receptor de citocinas, correspondiente a D2 y D3 de IL-13R α 1, pero no contiene ningún dominio cadena arriba correspondiente a D1. Por consiguiente, se tomó el primer resto de hIL-4R α maduro para definir el límite entre D1 y D2 en la secuencia de hIL-13R α 1 alineada. A continuación, se utilizó el límite entre los dos dominios de fibronectina de tipo III en IL-4R α , como se deduce de la estructura cristalina (Hage y col., Cell, 97(2):271-81, 1999), para definir el límite entre D2 y D3 en la secuencia de IL-13R α 1 alineada.

Por consiguiente, el dominio 1 de la región extracelular de hIL-13R α 1 corresponde a los aminoácidos 1 a 100 de la SEC ID NO: 1, el dominio 2 a los aminoácidos 101 a 200 de la SEC ID NO: 1, y el dominio 3 a los aminoácidos 201 a 317 de la SEC ID NO: 1. El dominio 3 también se establece en el presente documento como la SEC ID NO: 37.

De acuerdo con la presente divulgación, se generan anticuerpos que se unen a hIL-13R α 1 a través del dominio 3 de la región extracelular de la cadena del receptor y que inhiben la señalización de IL-13 a través del complejo IL-13R α 1/IL-4R α . Tales anticuerpos inhiben la actividad biológica mediada por IL-13. En una forma de realización específica, algunos anticuerpos de la presente divulgación inhiben la señalización de IL-13 y de IL-4 a través del complejo IL-13R α 1/IL-4R α .

Para los fines de la presente divulgación, las expresiones "receptor alfa 1 de la interleucina 13" e "IL-13R α 1" se utilizan indistintamente, y pueden incluir variantes, isoformas y homólogos de especie del IL-13R α 1 humano. Por consiguiente, los anticuerpos humanos de la presente divulgación pueden, en determinados casos, presentar una reacción cruzada con IL-13R α 1 de especies distintas a la humana. En otros casos, los anticuerpos pueden ser específicos para IL-13R α 1 humano y pueden no presentar reactividad cruzada entre especies u otros tipos de

5 reactividad cruzada. La secuencia de aminoácidos de IL-13R α 1 humano (también denominado hIL-13R α 1) tiene el número de acceso del GENBANK NP_001551 y la forma madura de la proteína, es decir, sin la secuencia señal, se establece en el presente documento como la SEC ID NO: 1. La secuencia de aminoácidos de IL-13R α 1 de mono cynomolgus tiene el número de acceso del GENBANK AAP78901 y la forma madura de la proteína que se establece en el presente documento como la SEC ID NO: 2. La secuencia de aminoácidos de IL-13R α 1 de ratón (también denominado ml-13R α 1) tiene el número de acceso del GENBANK 009030 y la forma madura de la proteína se establece en el presente documento como la SEC ID NO: 3.

En la Tabla 1 se proporcionan otras secuencias abarcadas por la presente divulgación.

TABLA 1

SEC ID NO:	Descripción
1	IL-13R α 1 humano maduro
2	IL-13R α 1 maduro de mono cynomolgus
3	IL-13R α maduro de ratón
4	VH de 4B5
5	CDR1 de VH de 4B5
6	CDR2 de VH de 4B5
7	CDR3 de VH de 4B5
8	VH de 8B11
9	CDR1 de VH de 8B11
10	CDR2 de VH de 8B11
11	CDR3 de VH de 8B11
12	VH de 15F4
13	CDR1 de VH de 15F4
14	CDR2 de VH de 15F4
15	CDR3 de VH de 15F4
16	VL de 15F4
17	CDR1 de VL de 15F4
18	CDR2 de VL de 15F4
19	CDR3 de VL de 15F4
20	hIL-13R α 1.ECR marcado con FLAG® en el extremo N-terminal
21	Ácido nucleico de VH de 4B5
22	Ácido nucleico de CDR1 de VH de 4B5
23	Ácido nucleico de CDR2 de VH de 4B5
24	Ácido nucleico de CDR2 de VH de 4B5
25	Ácido nucleico de VH de 8B11
26	Ácido nucleico de CDR1 de VH de 8B11
27	Ácido nucleico de CDR2 de VH de 8B11
28	Ácido nucleico de CDR3 de VH de 8B11
29	Ácido nucleico de VH de 15F4
30	Ácido nucleico de CDR1 de VH de 15F4
31	Ácido nucleico de CDR2 de VH de 15F4

(continuación)

SEC ID NO:	Descripción
32	Ácido nucleico de CDR3 de VH de 15F4
33	Ácido nucleico de VL de 15F4
34	Ácido nucleico de CDR1 de VL de 15F4
35	Ácido nucleico de CDR2 de VL de 15F4
36	Ácido nucleico de CDR3 de VL de 15F4
37	D3 de la región extracelular de hIL-13R α 1
38	Contiene el dominio Fc de IgG1
39	Contiene el dominio Fc de IgG2
40	Contiene el dominio Fc de IgG4
41	Contiene el dominio Fc de IgG2m4
42	Dominio Fc de IgG2m4
43	Dominio Fc del ácido nucleico de IgG2m4
44	Péptido de dominio 3 de hIL-13R α 1 natural
45	Péptido de dominio 3 mutante de hIL-13R α 1 natural
46	Región extracelular de mL-13R α 1

El término "anticuerpo", como se denomina en el presente documento, incluye anticuerpos completos (también conocidos como anticuerpos de longitud completa) y cualquier fragmento de unión al antígeno (es decir, "porción de unión al antígeno") de los mismos. Un "anticuerpo completo" se refiere a una proteína que comprende dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) conectadas entre sí por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada se compone de una región variable de la cadena pesada (abreviada en el presente documento como V_H) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada se compone de tres dominios C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}. Cada cadena ligera se compone de una región variable de la cadena ligera (abreviada en el presente documento como V_L) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera se compone de un dominio, C_L. Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, llamadas regiones marco conservadas (FR). Cada V_H y V_L se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas del extremo amino-terminal al extremo carboxilo-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedador, que incluyen diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema del complemento clásico.

La expresión "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a uno o varios fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad para unirse a hIL-13R α 1. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser realizada por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión comprendidos dentro de la expresión "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente compuesto por los dominios V_L, V_H, C_L y C_{H1}, (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente compuesto por dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra, (iii) un fragmento Fd compuesto por los dominios V_H y C_{H1}, (iv) un fragmento Fv compuesto por los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward y col., Nature 341:544-546, 1989), que se compone de un dominio V_H o V_L (Holt y col., Trends in Biotechnology, 21:484-489, 2003), y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada, en concreto la CDR3 de una V_H. Como entenderán los expertos en la materia, los fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse a hIL-13R α 1 pueden insertarse en diversos marcos, véase por ejemplo la patente de EE.UU. N°6.818.418, y las referencias contenidas en la misma, que analizan diversos armazones que puede utilizarse para presentar bucles del anticuerpo previamente seleccionados en base a la unión al antígeno. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, están codificados por genes separados, pueden unirse, utilizando procedimientos recombinantes, mediante un engarce sintético que les permita generarse como una cadena de proteínas única en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv)); véase, por ejemplo, Science 242:423-426, 1988 y Huston y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988. Tales anticuerpos monocatenarios también pretenden estar comprendidos dentro de la expresión "porción de

unión al antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo pueden obtenerse utilizando técnicas convencionales conocidas para los expertos en la materia, y pueden producirse sin haber producido primero un anticuerpo de longitud completa. Los fragmentos pueden cribarse para determinar propiedades pertinentes de la misma manera que los anticuerpos de longitud completa.

5 Un "anticuerpo aislado", tal como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a un anticuerpo que está prácticamente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une a hIL-13R α 1 está prácticamente libre de anticuerpos que se unen a antígenos distintos de IL-13R α 1). Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une a hIL-13R α 1 puede presentar reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de IL-13R α 1 de otras especies. Además, un anticuerpo aislado
10 puede estar prácticamente libre de otro material celular y/u otros productos químicos.

La expresión "anticuerpo monoclonal" o "AcMo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos prácticamente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un sitio antigénico único. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que por lo general incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes (epítopos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como se obtiene a partir de una población prácticamente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún
15 procedimiento concreto. Un anticuerpo monoclonal que es también un anticuerpo aislado puede ser denominado anticuerpo monoclonal aislado.

La expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de la secuencias de
25 inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o dirigida *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDR y, en concreto, la CDR3 y por lo tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones V_L y/o V_H de los anticuerpos son secuencias que, al estar derivadas y relacionadas con las secuencias de V_H y V_L de la línea germinal humana, pueden no existir de manera natural en el repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos
30 *in vivo*. Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que se han injertado secuencias de CDR derivadas de otras especies de mamíferos, tales como un ratón, sobre las secuencias marco humanas, es decir, un anticuerpo humanizado.

Tal como se utiliza en el presente documento, el dominio 3 de la región extracelular de hIL-13R α 1 corresponde a los aminoácidos 201 a 317 de la SEC ID NO: 1 y se establece en el presente documento como la SEC ID NO: 37. Por consiguiente, un anticuerpo que se une a hIL-13R α 1 a través del dominio 3 de la región extracelular del receptor es uno que demuestra unión a un péptido que consiste básicamente en los restos de aminoácidos del dominio 3
35 indicados anteriormente; por ejemplo las construcciones de dominio 3 presentadas en fagos del Ejemplo 3, donde la unión se determinó mediante ELISA. Los expertos en la materia se darán cuenta de que existen otros procedimientos para determinar la unión al dominio 3 de la región extracelular de hIL-13R α 1, por ejemplo mediante análisis BIACORE™ (PHARMACIA AB Corporation). Un anticuerpo que se une a hIL-13R α 1 a través del dominio 3 de la región extracelular del receptor también se unirá al receptor de longitud completa y a otros péptidos derivados del receptor, que incluyen la SEC ID NO: 37; por ejemplo, el péptido hIL-13R α 1.ECR del Ejemplo 1 que incluye los dominios 1, 2 y 3 de la región extracelular del receptor.

45 Tal como se utiliza en el presente documento, un anticuerpo que "se une a IL-13R α 1 humano" pretende referirse a un anticuerpo que se une a IL-13R α 1 humano con una K_D de 5 x 10⁻⁹ M o inferior, más preferentemente 2 x 10⁻⁹ M o inferior, e incluso más preferentemente de 1 x 10⁻⁹ M o inferior. Las expresiones relacionadas, tales como "los anticuerpos se unen a IL-13R α 1 humano" tienen el mismo significado. Un anticuerpo que "presenta una reacción cruzada con IL-13R α 1 de mono cynomolgus" pretende referirse a un anticuerpo que se une a IL-13R α 1 de mono
50 cynomolgus con una K_D de 5 x 10⁻⁹ M o inferior, e incluso más preferentemente de 2 x 10⁻⁹ M o inferior. Un anticuerpo que "no presenta reacción cruzada con IL-13R α 1 de ratón" pretende referirse a un anticuerpo que se une a IL-13R α 1 de ratón con una K_D de 1 x 10⁻⁷ M o superior. En determinadas formas de realización, los anticuerpos que no presentan reacción cruzada con IL-13R α 1 de ratón presentan una unión contra esta proteína básicamente indetectable en los ensayos de unión convencionales.

55 El término "K_a", tal como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a la velocidad de asociación de una interacción antígeno-anticuerpo concreta, mientras que el término "K_d", tal como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a la velocidad de disociación de una interacción antígeno-anticuerpo concreta. El término "K_D", tal como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a la constante de disociación, que se obtiene de la relación entre K_d y K_a (es decir, K_d/K_a) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores K_D para los anticuerpos pueden determinarse utilizando procedimientos bien establecidos en la técnica. Un procedimiento preferente para determinar la K_D de un anticuerpo es utilizando la resonancia de plasmón superficial, utilizando
60

preferentemente un sistema biodetector tal como un sistema BIACORE™.

En las subsecciones siguientes se describen con mayor detalle diversos aspectos de la presente invención.

Anticuerpos anti-hIL-13R α 1.

5 Los anticuerpos de la presente divulgación se caracterizan por propiedades o características funcionales concretas de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos se unen a IL-13R α 1 humano a través del dominio 3 de la región extracelular del receptor.

Además, los anticuerpos de la presente invención pueden presentar o no reacción cruzada con IL-13R α 1 de uno o varios primates no humanos, tal como el mono cynomolgus. Por consiguiente, en una forma de realización, los anticuerpos de la divulgación presentan reacción cruzada con IL-13R α 1 de cynomolgus.

10 En otra forma de realización, los anticuerpos de la presente invención no presentan reacción cruzada con IL-13R α 1 de ratón.

En formas de realización específicas, un anticuerpo de la presente divulgación se une a IL-13R α 1 con alta afinidad, por ejemplo con una K_D de 5×10^{-9} M o inferior, más preferentemente 2×10^{-9} M o inferior, e incluso más preferentemente 1×10^{-9} M o inferior.

15 Además, los anticuerpos de la presente invención son capaces de inhibir una o varias actividades funcionales de hIL-13R α 1. Por ejemplo, en una forma de realización, los anticuerpos pueden inhibir la liberación de eotaxina inducida por IL-13 en células NHDF. En otra forma de realización, los anticuerpos pueden inhibir la fosforilación de STAT6 inducida por IL-13 en células NHDF. En otra forma de realización más, los anticuerpos pueden inhibir la liberación de eotaxina inducida por IL-4 en células NHDF. En otra forma de realización más, los anticuerpos pueden
20 inhibir la fosforilación de STAT6 inducida por IL-4 en células NHDF. En las formas de realización específicas, los anticuerpos inhiben todas las actividades funcionales de hIL-13R α 1 anteriormente mencionadas.

Los anticuerpos de la presente divulgación pueden inhibir o no la unión de IL-13 a IL-13R α 1 aislado (es decir, IL-13R α 1 que no forma parte de un receptor dimérico con IL-4R α). Algunos anticuerpos de la divulgación pueden no inhibir la unión de IL-13 a IL-13R α 1 aislado, pero no obstante pueden inhibir las respuestas inducidas por IL-13 en
25 las células NHDF mediadas a través del complejo receptor de IL-13 de Tipo I.

Un grupo de anticuerpos de la invención incluyen aquellos que inhiben la unión de hIL-13 a hIL-13R α 1 aislado.

Otro grupo de anticuerpos de la presente invención son anticuerpos de longitud completa.

En formas de realización específicas, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos humanos. En otra forma de realización, dichos anticuerpos son anticuerpos humanizados, desimmunizados, primatizados o quiméricos.

30 Los anticuerpos de la invención pueden ser de cualquier isotipo de anticuerpo, por ejemplo, IgG, IgA, IgE e IgM y cualquiera de las sub-clases de isotipo, especialmente IgG1 e IgG4. Por lo general, resulta preferente IgG4 debido a que no se une al complemento y no crea funciones efectoras. También resulta preferente cualquier variante sintética u otra variante de la región constante que tenga estas u otras propiedades deseables para su uso en las formas de realización de la presente invención.

35 En la técnica se conocen ensayos convencionales para evaluar la capacidad de unión de los anticuerpos a IL-13R α 1 de diversas especies, que incluyen por ejemplo, los ELISA, las transferencias de Western y los RIA. En los Ejemplos también se describen ejemplos de ensayos adecuados. La cinética de unión (por ejemplo, la afinidad de unión) de los anticuerpos también puede evaluarse mediante ensayos convencionales conocidos en la técnica, tales como mediante análisis BIACORE™. En los Ejemplos se describen ejemplos de ensayos para evaluar los efectos de los
40 anticuerpos sobre las propiedades funcionales de IL-13R α 1 (por ejemplo, la unión al ligando, la inhibición de la actividad inducida por IL-13 en las células).

Por consiguiente, se entenderá que un anticuerpo que "inhibe" una o varias de estas propiedades funcionales de IL-13R α 1 como se determina de acuerdo con las metodologías conocidas en la técnica y descritas en el presente documento, se refiere a una disminución en la actividad concreta con respecto a la observada en ausencia del anticuerpo (por ejemplo, o cuando se encuentra presente un anticuerpo de control de especificidad irrelevante). Preferentemente un anticuerpo que inhibe una actividad de la IL-13 y/o de la IL-4 ocasiona una disminución de este tipo en por lo menos un 10% del parámetro medido, más preferentemente en por lo menos un 20%, 30%, 40%, 50%,
45 60%, 70%, 80%, 90% ó 95%.

50 En una forma de realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une a IL-13R α 1 a través del dominio 3 de la región extracelular del receptor e inhibe la señalización de IL-13. En las formas de realización específicas, la presente divulgación también presenta por lo menos una de las siguientes propiedades funcionales: (i) inhibe la liberación de eotaxina inducida por IL-13 en células NHDF, (ii) inhibe la liberación de eotaxina inducida por IL-4 en células NHDF; (iii) inhibe la fosforilación de STAT6 inducida por IL-13 en células NHDF; o (iv) inhibe la fosforilación de STAT6 inducida por IL-4 en células NHDF.

5 En una forma de realización específica, una mutación por sustitución en un péptido que incluye el dominio 3 de hIL-13R α 1 de los restos Val-Phe-Tyr-Val-Gln (SEC ID NO: 44), que corresponden a las posiciones 248-252 de la SEC ID NO: 1, con los restos de Ile-Leu-Glu-Val-Glu (SEC ID NO: 45) conduce a una pérdida de la unión entre un anticuerpo de la invención y el péptido hIL-13R α 1 mutante resultante en comparación con la unión entre dicho anticuerpo y el péptido hIL-13R α 1 sin dichas sustituciones.

10 En otra forma de realización, una mutación por sustitución en un péptido que incluye el dominio 3 de hIL-13R α 1 de cualquiera de: el resto de fenilalanina que corresponde a la posición 249 de la SEC ID NO: 1 con un resto de alanina; el resto de tirosina que corresponde a posición 250 de la SEC ID NO: 1 con un resto de alanina; o el resto de glutamina que corresponde a la posición 252 de la SEC ID NO: 1 con un resto de alanina; conduce a una pérdida de la unión entre un anticuerpo de la presente divulgación y el péptido hIL-13R α 1 mutante resultante en comparación con la unión entre dicho anticuerpo y el péptido hIL-13R α 1 sin dichas sustituciones.

Anticuerpos Monoclonales 4B5, 8B11 y 15F4.

15 Un grupo de anticuerpos anti-hIL-13R α 1 de la presente invención son los anticuerpos monoclonales humanos 4B5, 8B11 y 15F4, aislados y caracterizados estructuralmente como se describe en los Ejemplos. Las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 4B5, 8B11 y 15F4, y las secuencias correspondientes CDR1, CDR2, y CDR3 son como se expone más adelante en la Tabla 2. De manera similar, las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 15F4, y las secuencias correspondientes CDR1, CDR2, y CDR3 son como se exponen en forma de tabla más adelante. Las regiones CDR se definen utilizando el sistema de Kabat (Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health y Human Services, publicación del NIH N^o 91:3242, 1991), a excepción de la CDR1 de V_H, que se amplía para abarcar las definiciones estructural y de secuencia (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987), es decir, los restos 26-35 de V_H.

TABLA 2

Secuencia	SEC ID NO:
VH de 4B5	4
CDR1 de VH de 4B5	5
CDR2 de VH de 4B5	6
CDR3 de VH de 4B5	7
VH de 8B11	8
CDR1 de VH de 8B11	9
CDR2 de VH de 8B11	10
CDR3 de VH de 8B11	11
VH de 15F4	12
CDR1 de VH de 15F4	13
CDR2 de VH de 15F4	14
CDR3 de VH de 15F4	15
VL de 15F4	16
CDR1 de VL de 15F4	17
CDR2 de VL de 15F4	18
CDR3 de VL de 15F4	19

25 Se sabe que las regiones CDR de los anticuerpos determinan el reconocimiento del antígeno, y CDR3 es de especial importancia. Por lo tanto, en otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que incluye una secuencia de CDR3 seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID NO: 7, 11, 15 y una modificación de secuencias conservativas de las mismas, que: a) se une a hIL-13R α 1 a través del dominio 3 de la región extracelular del receptor, y b) presenta por lo menos una de las siguientes propiedades funcionales: (i) inhibe

la liberación de eotaxina inducida por IL-13 en células NHDF, (ii) inhibe la liberación de eotaxina inducida por IL-4 en células NHDF, (iii) inhibe la fosforilación de STAT6 inducida por IL-13 en células NHDF; o (iv) inhibe la fosforilación de STAT6 inducida por IL-4 en células NHDF.

5 En una forma de realización específica, tales anticuerpos incluyen una región variable de la cadena pesada en la que las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 son: (a) las SEC ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente; (b) las SEC ID NO: 9, 10 y 11, respectivamente, (c) las SEC ID NO: 13, 14 y 15, respectivamente; o (d) un conjunto de tales secuencias de CDR como se establece en (a), (b) o (c) con las modificaciones de secuencias conservativas en una cualquiera o varias de dichas secuencias de CDR.

10 En una forma de realización adicional, las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de la región variable de la cadena pesada son como se establece en las SEC ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente.

En otra forma de realización adicional, las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de la región variable de la cadena pesada son como se establece en las SEC ID NO: 9, 10 y 11, respectivamente.

En otra forma de realización adicional, las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de la región variable de la cadena pesada son como se establece en las SEC ID NO: 13, 14 y 15, respectivamente.

15 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que incluye una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de CDR3 seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NO: 19 y una modificación de secuencias conservativas de la misma, que: (a) se une a hIL-13R α 1 a través del dominio 3 de la región extracelular del receptor, y (b) presenta por lo menos una de las propiedades funcionales (i) a (iv) indicadas anteriormente.

20 En las formas de realización específicas, tales anticuerpos incluyen una región variable de la cadena ligera en la que las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 son como se establece en las SEC ID NO: 17, 18 y 19, respectivamente, o un conjunto de tales secuencias de CDR con modificaciones de secuencias conservativas en una cualquiera o varias de dichas secuencias de CDR.

25 En una forma de realización adicional, las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de la región variable de la cadena ligera son como se establece en las SEC ID NO: 17, 18 y 19, respectivamente.

30 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que incluye una secuencia de CDR3 de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de CDR3 de la región variable de la cadena ligera como se establece en las SEC ID NO: 15 y 19, respectivamente, o modificaciones de secuencias conservativas en una cualquiera o varias de dichas secuencias de CDR3, que: (a) se une a hIL-13R α 1 a través del dominio 3 de la región extracelular del receptor, y (b) presenta por lo menos una de las propiedades funcionales (i) a (iv) indicadas anteriormente.

35 En una forma de realización específica, tales anticuerpos incluyen las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de la región variable de la cadena pesada y las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de la región variable de la cadena ligera como se establece en las SEC ID NO: 13, 14, 15, 17, 18 y 19, respectivamente, o un conjunto de tales secuencias de CDR con modificaciones de secuencias conservativas en una cualquiera o varias de dichas secuencias de CDR.

En una forma de realización adicional, las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de la región variable de la cadena pesada y las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de la región variable de la cadena ligera son como se establece en las SEC ID NO: 13, 14, 15, 17, 18 y 19, respectivamente.

40 En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que incluye una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID NO: 4, 8 y 12, que: (a) se une a hIL-13R α 1 a través del dominio 3 de la región extracelular del receptor, y (b) presenta por lo menos una de las propiedades funcionales (i) a (iv) indicadas anteriormente.

45 En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que incluye una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID NO: 16, que: (a) se une a hIL-13R α 1 a través del dominio 3 de la región extracelular del receptor, y (b) presenta por lo menos una de las propiedades funcionales (i) a (iv) indicadas anteriormente.

En otro aspecto, tales anticuerpos monoclonales aislados incluyen una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera que comprende las SEC ID NO: 12 y 16, respectivamente.

50 *Anticuerpos homólogos.*

En otra forma de realización más, un anticuerpo de la divulgación incluye las regiones variables de la cadena pesada y/o ligera con secuencias de aminoácidos que son homólogas a las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos específicos descritos en el presente documento, y en la que los anticuerpos conservan las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-IL-13R α 1 de la presente invención.

Por ejemplo, la presente divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que incluye una secuencia de la región variable de la cadena pesada que presenta por lo menos un 90% de homología en las regiones variables con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID NO: 4, 8 y 12, que: (a) se une a hIL-13R α 1 a través del dominio 3 de la región extracelular del receptor, y (b) presenta por lo menos una de las propiedades funcionales (i) a (iv) indicadas anteriormente.

La referencia a " por lo menos un 90% de homología " incluye por lo menos un 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 y 100% de secuencias homólogas.

En otra forma de realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que incluye una secuencia de la región variable de la cadena ligera que presenta por lo menos un 90% de homología con la SEC ID NO: 16, que: (a) se une a hIL-13R α 1 a través del dominio 3 de la región extracelular del receptor, y (b) presenta por lo menos una de las propiedades funcionales (i) a (iv) indicadas anteriormente.

En una forma de realización específica, tales anticuerpos monoclonales aislados incluyen regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera que presentan por lo menos un 90% de homología con las SEC ID NO: 12 y 16, respectivamente.

En otras formas de realización, las secuencias de aminoácidos de V_H y/o V_L pueden presentar un 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con las secuencias establecidas anteriormente. Un anticuerpo que tiene secuencias de V_H y/o V_L que presentan una alta homología (es decir, un 90% o superior) con las secuencias de V_H de las SEC ID NO: 4, 8 y 12 y/o las secuencias de V_L de la SEC ID NO: 16, respectivamente, puede obtenerse por mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis aleatoria o dirigida) de moléculas de ácidos nucleicos que codifican las SEC ID NO: 4, 8 y 12 y/o la SEC ID NO: 16, seguido del ensayo del anticuerpo modificado codificado para la función conservada (es decir, las funciones establecidas en los puntos (i) a (iv) anteriormente indicados), utilizando los ensayos funcionales descritos en el presente documento.

En otra forma de realización más, un anticuerpo de la divulgación incluye las regiones variables de la cadena pesada y/o ligera con conjuntos de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 que son homólogas a los conjuntos de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de los anticuerpos específicos descritos en el presente documento, y en el que los anticuerpos conservan las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-hIL-13R α 1 de la invención.

Por ejemplo, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que incluye una región variable de la cadena pesada con un conjunto de secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 que presentan por lo menos un 90% de homología con un conjunto de secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 seleccionadas del grupo que consiste en: (a) las SEC ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente; (b) las SEC ID NO: 9, 10 y 11, respectivamente; o (c) las SEC ID NO: 13, 14 y 15, respectivamente; en el que el anticuerpo se une a hIL-13R α 1 a través del dominio 3 de la región extracelular del receptor y presenta por lo menos una de las propiedades funcionales (i) a (iv) indicadas anteriormente.

En otra forma de realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que incluye una región variable de la cadena ligera con un conjunto de secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 que presentan por lo menos un 90% de homología con un conjunto de secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 seleccionadas del grupo que consiste en las SEC ID NO: 17, 18 y 19, respectivamente; en el que el anticuerpo se une a hIL-13R α 1 a través del dominio 3 de la región extracelular del receptor y presenta por lo menos una de las propiedades funcionales (i) a (iv) indicadas anteriormente.

En otra forma de realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que incluye una región variable de la cadena pesada con un conjunto de secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de la cadena ligera con un conjunto de secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 que presentan por lo menos un 90% de homología con un conjunto de secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada y ligera seleccionado del grupo que consiste en las SEC ID NO: 13, 14, 15, 17, 18 y 19, respectivamente; en el que el anticuerpo se une a hIL-13R α 1 a través del dominio 3 de la región extracelular del receptor y presenta por lo menos una de las propiedades funcionales (i) a (iv) indicadas anteriormente.

Tal como se utiliza en el presente documento, el porcentaje de homología entre dos secuencias de aminoácidos, o entre dos conjuntos de secuencias de CDR, o entre dos secuencias de nucleótidos, es equivalente al porcentaje de identidad entre las dos secuencias, o los dos conjuntos de secuencias de CDR. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias, o los dos conjuntos de secuencias de CDR, es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, el % de homología = # de posiciones idénticas/# total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que deben introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias, o los dos conjuntos de las secuencias de CDR correspondientes (es decir, comparando entre sí las secuencias de CDR de la cadena pesada y/o ligera correspondientes). La comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre secuencias pueden lograrse utilizando un algoritmo matemático, tal como se describe en los ejemplos no limitativos que se presentan más adelante.

El porcentaje de identidad entre las secuencias de aminoácidos y/o las secuencias de nucleótidos puede determinarse utilizando procedimientos generalmente conocidos para los expertos en la materia, por ejemplo el

algoritmo de Meyers y Miller, Comput. Appl. Biosci, 4: 11-17, 1988, que ha sido incorporada en el programa ALIGN (versión 2.0). Además, el porcentaje de identidad entre las secuencias de aminoácidos o las secuencias de nucleótidos puede determinarse utilizando el programa GAP en el paquete de software GCG utilizando sus parámetros por defecto.

5 *Anticuerpos con modificaciones conservativas.*

Tal como se utiliza en el presente documento, las expresiones "modificaciones de secuencias conservativas" y "modificaciones conservativas" se utilizan indistintamente y pretenden referirse a modificaciones de aminoácidos que no modifiquen o reduzcan significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos pero que pueden mejorar tales propiedades. Tales modificaciones conservativas incluyen sustituciones, adiciones y supresiones de aminoácidos, y preferentemente son sustituciones conservativas de aminoácidos. Las modificaciones pueden introducirse en un anticuerpo de la invención mediante técnicas convencionales conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservativas son aquellas en las que el resto de aminoácido se reemplaza con un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, uno o varios restos de aminoácidos dentro de las regiones CDR de un anticuerpo de la invención pueden sustituirse con otros restos de aminoácidos de la misma familia de cadenas laterales y el anticuerpo modificado puede someterse a ensayo para determinar la función conservada utilizando los ensayos funcionales descritos en el presente documento.

Anticuerpos que compiten con 4B5, 8B11 o 15F4.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona anticuerpos anti-hIL-13R α 1 que compiten por la unión a hIL-13R α 1 con los anticuerpos 4B5, 8B11 o 15F4 descritos en el presente documento. Tales anticuerpos competitivos pueden identificarse en base a su capacidad para presentar competencia cruzada (por ejemplo, para inhibir competitivamente la unión de, de forma estadísticamente significativa) con los anticuerpos 4B5 y 8B11 o 15F4 en ensayos de unión a IL-13R α 1 convencionales. La capacidad de un anticuerpo de ensayo para inhibir la unión de 4B5, 8B11 o 15F4 a IL-13R α 1 humano demuestra que el anticuerpo de ensayo puede competir con ese anticuerpo para la unión a IL-13R α 1 humano; un anticuerpo de este tipo puede unirse, de acuerdo con una teoría no limitativa, al mismo epítipo o a un epítipo relacionado (por ejemplo, estructuralmente similar o espacialmente próximo) en el IL-13R α 1 humano que el anticuerpo con el que compite. A continuación, pueden evaluarse los anticuerpos que compiten por la unión con por lo menos uno de 4B5, 8B11 o 15F4 para determinar (a) la unión a hIL-13R α 1 a través del dominio 3 de la región extracelular del receptor, y (b) que tengan por lo menos una de las propiedades funcionales i) a iv) indicadas anteriormente.

Los anticuerpos competitivos específicos son aquellos en los que una mutación por sustitución en un péptido que comprende el dominio 3 de hIL-13R α 1 de los restos Val-Phe-Tyr-Val-Gln (SEC ID NO: 44), que corresponden a las posiciones 248-252 de la SEC ID NO: 1, con los restos de Ile-Leu-Glu-Val-Glu (SEC ID NO: 45) conduce a una pérdida de la unión entre dicho anticuerpo y el péptido hIL-13R α 1 mutante resultante en comparación con la unión entre dicho anticuerpo y el péptido hIL-13R α 1 sin dichas sustituciones.

Otros anticuerpos competitivos son aquellos en los que una mutación por sustitución en un péptido que incluye el dominio 3 de hIL-13R α 1 de cualquiera de: el resto de fenilalanina que corresponde a la posición 249 de la SEC ID NO: 1 con un resto de alanina; el resto de tirosina que corresponde a la posición 250 de la SEC ID NO: 1 con un resto de alanina; o el resto de glutamina que corresponde a la posición 252 de la SEC ID NO: 1 con un resto de alanina; conduce a una pérdida de la unión entre dicho anticuerpo y el péptido hIL-13R α 1 mutante resultante en comparación con la unión entre dicho anticuerpo y el péptido hIL-13R α 1 sin dichas sustituciones.

Los anticuerpos competitivos pueden prepararse mediante cualquier procedimiento de la técnica, seguido de cribado en un ensayo de competición apropiado. La actividad funcional relevante puede determinarse utilizando los ensayos descritos en el presente documento o mediante otros procedimientos fácilmente determinados por los expertos en la materia.

En una forma de realización específica, los anticuerpos competitivos son anticuerpos humanos. En otra forma de realización los anticuerpos competitivos son anticuerpos humanizados, primatizados o son quiméricos.

En otra forma de realización, los anticuerpos competitivos son anticuerpos de longitud completa.

Los anticuerpos competitivos específicos se unen a IL-13R α 1 humano con una K_D de 5×10^{-9} M o inferior, más preferentemente 2×10^{-9} M o inferior, e incluso más preferentemente de 1×10^{-9} M o inferior.

Anticuerpos modificados y obtenidos por ingeniería genética.

Un anticuerpo de la invención puede prepararse utilizando un anticuerpo que tenga una o varias de las secuencias de V_H y/o V_L desveladas en el presente documento como material de partida para obtener por ingeniería genética un anticuerpo modificado, anticuerpo modificado que puede haber modificado las propiedades del anticuerpo de partida. Un anticuerpo puede obtenerse por ingeniería genética modificando uno o varios restos dentro de una o ambas regiones variables (es decir, V_H y/o V_L), por ejemplo dentro de una o varias regiones CDR y/o dentro de una o varias regiones marco conservadas. Además o de manera alternativa, puede obtenerse un anticuerpo por ingeniería genética modificando los restos dentro de la región o las regiones constantes, por ejemplo para modificar la función o las funciones efectoras del anticuerpo.

Un tipo de modificación de la región variable es mutar los restos de aminoácidos dentro de las regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3 de V_H y/o V_L para mejorar de ese modo una o varias propiedades (por ejemplo, la afinidad de unión) del anticuerpo de interés. Pueden realizarse mutagénesis dirigidas o mutagénesis aleatorias para introducir la mutación o las mutaciones y el efecto sobre la unión al anticuerpo, o puede evaluarse otra propiedad funcional de interés, en ensayos *in vivo* o *in vitro* como se describe en el presente documento y se proporciona en los Ejemplos. Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos, pero son preferentemente sustituciones. Además, por lo general no se modifican más de uno, dos, tres, cuatro o cinco restos dentro de una región CDR, preferentemente sólo se modifican uno o dos restos dentro de las regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3 de V_H y/o V_L .

Los anticuerpos de la divulgación incluyen aquellos en los que se han hecho modificaciones a los restos del marco dentro de V_H y/o V_L , por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Por lo general tales modificaciones del marco están hechas para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un procedimiento consiste en "retromutar" uno o varios restos del marco a la secuencia de la línea germinal correspondiente. Más concretamente, un anticuerpo que ha sido sometido a mutación somática puede contener restos de marco que difieren de la secuencia de la línea germinal de la que se deriva el anticuerpo. Tales restos pueden identificarse comparando las secuencias marco del anticuerpo con las secuencias de la línea germinal de las cuales se deriva el anticuerpo. Tales anticuerpos "retromutados" también pretenden ser abarcados por la divulgación.

Otro tipo de modificación del marco implica mutar uno o varios restos dentro de la región marco conservada, o incluso dentro de una o varias regiones CDR, para eliminar los epítomos de los linfocitos T para reducir de ese modo la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. Este procedimiento también se denomina "desinmunización" y se describe con mayor detalle en la solicitud de patente de EE.UU. N° 20030153043 de Carr y col.

Además de o como alternativa a las modificaciones realizadas dentro de las regiones CDR o regiones marco conservadas, los anticuerpos de la invención pueden obtenerse por ingeniería genética para que incluyan modificaciones dentro de la región F_c , por lo general para modificar una o varias propiedades funcionales del anticuerpo, tales como la semivida en suero, la fijación del complemento, la unión del receptor F_c , y/o la citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Además, un anticuerpo de la invención puede modificarse químicamente (por ejemplo, pueden fijarse al anticuerpo uno o varios restos químicos) o modificarse para modificar su glicosilación, nuevamente para modificar una o varias propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas formas de realización se describe con mayor detalle más adelante. La numeración de los restos en la región F_c es la del índice UE de Kabat y col., 1991, *supra*.

En una forma de realización, la región bisagra de C_{H1} se modifica de manera que se modifique el número de restos de cisteína en la región bisagra, por ejemplo, se aumente o se disminuya para, por ejemplo, facilitar el ensamblaje de las cadenas ligera y pesada o para que aumente a o disminuya la estabilidad del anticuerpo. Este procedimiento se describe adicionalmente en la patente de EE.UU. N° 5.677.425 de Bodmer y col.

En otra forma de realización, la región bisagra F_c de un anticuerpo se muta para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Este procedimiento se describe con mayor detalle en la patente de EE.UU. N° 6.165.745 de Ward y col.

En otra forma de realización, el anticuerpo se modifica para aumentar su semivida biológica. Son posibles diversos procedimientos. Por ejemplo, pueden introducirse una o varias de las siguientes mutaciones: Thr252Leu, Thr254Ser, Thr256Phe, como se describe en la patente de EE.UU. N° 6.277.375 de Ward. De manera alternativa, para aumentar la semivida biológica, puede modificarse el anticuerpo dentro de la región C_{H1} o CL para que contenga un epítomo de unión al receptor de salvamento tomado a partir de dos bucles de un dominio C_{H2} de una región F_c de una IgG, como se describe en las patentes EE.UU. N° 5.869.046 y 6.121.022 de Presta y col.

En otras formas de realización más, la región F_c se modifica reemplazando por lo menos un resto de aminoácido con un resto de aminoácido diferente para modificar la función o las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, véanse las patentes de EE.UU. N° 5.624.821 y 5.648.260, ambas de Winter y col.

En otro ejemplo, pueden reemplazarse uno o varios aminoácidos seleccionados de entre los restos de aminoácidos 329, 331 y 322 con un resto de aminoácido diferente de manera que el anticuerpo quede modificado en la unión de C_{1q} y/o se reduzca o suprima la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Este procedimiento se describe con mayor detalle en la patente de EE.UU. N° 6.194.551 de Idusogie y col.

En otro ejemplo, se modifican uno o varios restos de aminoácidos dentro de las posiciones de aminoácidos 231 y

239 para modificar de ese modo la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Este procedimiento se describe adicionalmente en el documento WO 94/29351 de Bodmer y col.

En otro ejemplo más, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo para un receptor Fc γ modificando uno o varios aminoácidos; véase, por ejemplo el documento WO 00/42072 de Presta. Además, se han mapeado los sitios de unión en la IgG1 humana para Fc γ R1, Fc γ R2, Fc γ R3 y Fc γ Rn y se han descrito variantes con unión mejorada (véase Shields y col., J. Biol. Chem. 276:6591-6604, 2001).

Las formas de realización específicas de la presente invención proporcionan una molécula de anticuerpo tal como se define de acuerdo con la presente invención que incluye, como parte de su estructura de inmunoglobulina, la SEC ID NO: 42. La figura 6 ilustra una comparación de la secuencia de IgG2m4 (como se describe en la patente de EE.UU. con N° de Publicación US20070148167 (A1)), que incluye la secuencia de aminoácidos establecida en la SEC ID NO: 42, con la secuencia de aminoácidos de IgG1, IgG2, e IgG4.

En otra forma de realización más, se modifica la glicosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, puede generarse un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). Puede modificarse la glicosilación, por ejemplo para aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tales modificaciones de carbohidratos pueden lograrse, por ejemplo, modificando uno o varios sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, pueden hacerse una o varias sustituciones de aminoácidos que den como resultado la eliminación de uno o varios sitios de glicosilación del marco de la región variable para eliminar de ese modo la glicosilación en ese sitio. Este procedimiento se describe con mayor detalle en las patentes de EE.UU. N° 5.714.350 y 6.350.861 de Co y col.

Además o de manera alternativa, puede generarse un anticuerpo que tenga un tipo de glicosilación modificada, tal como un anticuerpo no fucosilado o un hipofucosilado que tenga cantidades reducidas de restos fucosilo, o un anticuerpo que tenga un aumento de estructuras bisectadas de GlcNac. Se ha demostrado que tales patrones de glicosilación modificados aumentan la capacidad ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones de carbohidratos pueden lograrse, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula hospedadora con maquinaria de glicosilación modificada. Se han descrito en la técnica células con maquinaria de glicosilación modificada y pueden utilizarse como células hospedadoras para expresar anticuerpos recombinantes de la invención para producir de ese modo un anticuerpo con glicosilación modificada.

Otra modificación de los anticuerpos del presente documento contemplada por la invención es la pegilación. Un anticuerpo puede pegilarse, por ejemplo, para aumentar la semivida biológica (por ejemplo, en suero) del anticuerpo, o de una porción de unión al antígeno del mismo. Para pegilar un anticuerpo, por lo general se hace reaccionar el anticuerpo con polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o un derivado de aldehído de PEG, en condiciones en las que uno o varios grupos PEG quedan fijados al anticuerpo o al fragmento de anticuerpo. Los procedimientos de pegilación de proteínas son conocidos en la técnica y pueden aplicarse a los anticuerpos de la invención. Véanse, por ejemplo, el documento EP 0 154 316 de Nishimura y col. y el documento EP 0 401 384 de Ishikawa y col.

Procedimientos de modificación de anticuerpos.

Como se ha analizado anteriormente, pueden utilizarse los anticuerpos anti-IL-13R α 1 que tienen las secuencias de V_H y V_L desveladas en el presente documento para crear nuevos anticuerpos anti-IL-13R α 1 modificando las secuencias de V_H y/o V_L, o la región o las regiones constantes fijadas a las mismas. Por lo tanto, en otro aspecto de la invención, se utilizan las características estructurales de un anticuerpo anti-hIL-13R α 1 de la invención, por ejemplo, 4B5, 8B11 o 15F4, para crear anticuerpos anti-hIL-13R α 1 estructuralmente relacionados que conservan las propiedades funcionales de los anticuerpos de la invención, tales como la unión a IL-13R α 1 humano a través del dominio 3 de la región extracelular del receptor, y también la inhibición de una o varias propiedades funcionales de hIL-13R α 1. Por ejemplo, una o varias regiones CDR de 4B5, 8B11 o 15F4, o mutaciones de las mismas, pueden combinarse recombinantemente con regiones marco conservadas conocidas y/u otras CDR para crear anticuerpos anti-IL-13R α 1 adicionales, obtenidos por ingeniería genética recombinante, de la invención, como se ha analizado anteriormente. Otros tipos de modificaciones incluyen las descritas en la sección anterior. El material de partida para el procedimiento de ingeniería genética es una o varias de las secuencias de V_H y/o V_L proporcionadas en el presente documento, o una o varias regiones CDR de las mismas. Para crear el anticuerpo obtenido por ingeniería genética, no es necesario preparar realmente (es decir, expresar como proteína) un anticuerpo que tenga una o varias de las secuencias de V_H y/o V_L proporcionadas en el presente documento, o una o varias regiones CDR de las mismas. Más bien, se utiliza como material de partida la información contenida en la secuencia o en las secuencias para crear una secuencia o unas secuencias de "segunda generación" derivadas de la secuencia o de las secuencias originales, y a continuación la secuencia o las secuencias de "segunda generación" se preparan y se expresan como una proteína. Pueden utilizarse técnicas convencionales de biología molecular para preparar y expresar la secuencia de anticuerpo modificado.

Las propiedades funcionales de los anticuerpos modificados pueden evaluarse utilizando ensayos convencionales disponibles en la técnica y/o descritos en el presente documento, tales como los expuestos en los Ejemplos. Se seleccionan los anticuerpos anti-IL-13R α 1 que conservan las características deseadas como se expone en el

presente documento.

En determinadas formas de realización de los procedimientos de los anticuerpos obtenidos por ingeniería genética de la invención, pueden introducirse mutaciones al azar o de manera selectiva a lo largo de toda o parte de una secuencia del anticuerpo anti-IL-13R α 1 y los anticuerpos anti-IL-13R α 1 resultantes modificados pueden cribarse para determinar la actividad de unión y/u otras propiedades funcionales como se ha descrito en el presente documento. Se han descrito en la técnica procedimientos mutacionales. Por ejemplo, en el documento WO 02/092780 de Short se describen procedimientos para crear y cribar mutaciones de anticuerpos utilizando mutagénesis de saturación, ensamblaje sintético por ligación, o una combinación de los mismos. De manera alternativa, en el documento WO 03/074679 de Lazar y col., se describen procedimientos para utilizar procedimientos computacionales de cribado para optimizar las propiedades fisicoquímicas de los anticuerpos.

Generación de anticuerpos monoclonales de la invención.

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden producirse mediante una variedad de técnicas, que incluyen la metodología convencional para anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la técnica de hibridación de células somáticas convencional de Kohler y Milstein, *Nature* 256:495, 1975. Aunque por lo general resultan preferentes los procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, pueden emplearse otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la transformación viral u oncogénica de linfocitos B.

El sistema animal preferente por lo general para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento bien establecido. Las técnicas y los protocolos de inmunización para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para la fusión son conocidos en la técnica. Las parejas de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y los procedimientos de fusión también son conocidos.

Los anticuerpos quiméricos, humanizados o primatizados de la presente invención pueden prepararse en base a la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado utilizando la biología molecular convencional y generalmente de acuerdo con la descripción del presente documento. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera puede obtenerse a partir del hibridoma murino de interés y obtenerse por ingeniería genética para que contenga secuencias de inmunoglobulina no murinas (por ejemplo, humanas) utilizando técnicas convencionales de biología molecular. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas puede unirse a regiones constantes humanas utilizando procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 4.816.567 de Cabilly y col.) Para crear un anticuerpo humanizado, pueden insertarse regiones CDR murinas en un marco humano utilizando procedimientos conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.225.539 de Winter, y las patentes de EE.UU. N° 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen y col.). De forma similar, para crear un anticuerpo primatizado, pueden insertarse regiones CDR murinas en un marco de primate utilizando procedimientos conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos WO 93/02108 y WO 99/55369).

De manera alternativa, puede crearse un anticuerpo humanizado mediante un procedimiento de "recubrimiento". Un análisis estadístico de las regiones variables de la cadena pesada y ligera de las inmunoglobulinas humana y murina únicas puso de manifiesto que los patrones precisos de los restos expuestos son diferentes en los anticuerpos humanos y murinos, y la mayoría de las posiciones de superficie individuales tienen una fuerte preferencia por un pequeño número de restos diferentes (véase Padlan y col., *Mol. Immunol.* 28:489-498, 1991 y Pedersen y col., *J. Mol. Biol.* 235:959-973, 1994). Por lo tanto, es posible reducir la inmunogenicidad de un Fv no humano reemplazando los restos expuestos en sus regiones marco conservadas que difieren de aquellos que se encuentran habitualmente en los anticuerpos humanos. Dado que la antigenicidad de las proteínas puede correlacionarse con la accesibilidad a la superficie, la sustitución de los restos de la superficie puede ser suficiente para hacer que la región variable del ratón sea "invisible" para el sistema inmunológico humano (véanse también Mark y col., *Handbook of Experimental Pharmacology* vol. 113: *The pharmacology of monoclonal Antibodies*, Springer-Verlag, págs. 105-134, 1994, y la patente de EE.UU. N° 6.797.492). Este procedimiento de humanización se denomina "recubrimiento", porque sólo se modifica la superficie del anticuerpo; los restos de soporte permanecen intactos.

Además, en el documento WO 2004/006955 se describen procedimientos para humanizar anticuerpos, en base a la selección de secuencias marco de la región variable de genes de anticuerpos humanos comparando los tipos de estructura canónica de CDR para las secuencias de CDR de la región variable de un anticuerpo no humano con los tipos de estructura canónica de CDR para las CDR correspondientes de una biblioteca de secuencias de anticuerpos humanos, por ejemplo, segmentos de genes de anticuerpos de la línea germinal. Las regiones variables de los anticuerpos humanos que tienen tipos de estructura canónica de CDR similares a las CDR no humanas forman un subconjunto de miembros de secuencias de anticuerpos humanos a partir del que pueden seleccionarse las secuencias de estructura humana. Los miembros del subconjunto pueden clasificarse adicionalmente por la similitud de los aminoácidos entre las secuencias de CDR humanas y no humanas. En el procedimiento del documento WO 2004/006955, se seleccionan las secuencias humanas en los primeros puestos para proporcionar las secuencias marco para construir un anticuerpo quimérico que reemplace funcionalmente las secuencias de CDR humanas con sus equivalentes CDR no humanas utilizando los marcos humanos de los miembros del subconjunto seleccionado, proporcionando de ese modo un anticuerpo humanizado de alta afinidad y baja inmunogenicidad sin necesidad de comparar las secuencias marco entre los anticuerpos no humanos y humanos. También se desvelan

los anticuerpos quiméricos generados de acuerdo con el procedimiento.

En una forma de realización específica, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos monoclonales humanos. Tales anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra IL-13R α 1 pueden generarse utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmunológico humano en lugar del sistema del ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen los ratones denominados en el presente documento ratones HuMAb® y ratones KM, respectivamente, y se denominan colectivamente en el presente documento "ratones de Ig humana".

El ratón HuMAb® (Medarex, Inc.) contiene minilocus de genes de inmunoglobulinas humanas que codifican las secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada (μ y γ) y ligera κ humanas sin reordenar, junto con las mutaciones diana que inactivan los locus de la cadena μ y κ (véase, por ejemplo, Lonberg, y col., Nature 368(6474):856-859, 1994). Por consiguiente, los ratones que presentan una expresión reducida de κ o IgM de ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes de la cadena pesada y ligera humanas introducidos experimentan conmutación de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgGk humanos de alta afinidad (Lonberg y col., 1994, *supra*; revisado en Lonberg, Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101, 1994; Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93, 1995, y Harding y Lonberg, Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546, 1995). La preparación y el uso de Ratones HUMAb®, y las modificaciones genómicas llevadas a cabo por tales ratones, se describen adicionalmente en Taylor y col., Nucleic Acids Research 20:6287-6295, 1992; Chen y col., International Immunology 5:647-656, 1993; Tuaille y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-3724, 1993; Choi y col., Nature Genetics 4:117-123, 1993; Chen y col., EMBO J. 12:821-830, 1993; Tuaille y col., J. Immunol. 152:2912-2920, 1994; Taylor y col., International Immunology 6:579-591, 1994; y Fishwild y col., Nature Biotechnology 14:845-851, 1996. Véanse adicionalmente, las patentes de EE.UU. N° 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; todas de Lonberg y Kay; la patente de EE.UU. N° 5.545.807 de Surani y col.; los documentos WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todos de Lonberg y Kay; y el documento WO 01/14424 de Korman y col.

En otra forma de realización, los anticuerpos humanos de la invención pueden generarse utilizando un ratón que porta secuencias de inmunoglobulina humana en los transgenes y transcromosomas, tales como un ratón que porta un transgen de la cadena pesada humana y un transcromosoma de la cadena ligera humana. Tales ratones, denominados en el presente documento "ratones KM", se describen en detalle en el documento WO 02/43478 de Ishida y col.

Aún más, están disponibles en la técnica sistemas animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana y que pueden utilizarse para generar los anticuerpos anti-IL-13R α 1 de la invención. Por ejemplo, puede utilizarse un sistema transgénico alternativo denominado XenoMouser® (Abgenix, Inc.); tales ratones se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N° 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963 de Kucherlapati y col.

Además, están disponibles en la técnica sistemas animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana y que pueden utilizarse para generar los anticuerpos anti-IL-13R α 1 de la invención. Por ejemplo, pueden utilizarse ratones que portan un transcromosoma de la cadena pesada humana y un transcromosoma de la cadena ligera humana, denominados "ratones TC"; tales ratones se describen en Tomizuka y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727, 2000. Además, se han descrito en la técnica vacas que portan transcromosomas de la cadena pesada y ligera humanas (Kuroiwa y col., Nature Biotechnology 20:889-894, 2002) y pueden utilizarse para generar los anticuerpos anti-IL-13R α 1 de la invención.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también pueden prepararse utilizando procedimientos de presentación en fagos para el cribado de genotecas de inmunoglobulinas humanas. Tales procedimientos de presentación en fagos para aislar anticuerpos humanos están establecidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 5.223.409; 5.403.484; y 5.571.698 de Ladner y col.; las patentes de EE.UU. N° 5.427.908 y 5.580.717 de Dower y col.; las patentes de EE.UU. N° 5.969.108 y 6.172.197 de McCafferty y col.; y las patentes de EE.UU. N° 5.885.793 ; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 de Griffiths y col.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también pueden prepararse utilizando ratones SCID en los que se han reconstituido células inmunitarias humanas de manera que pueda generarse una respuesta de anticuerpos humanos tras la inmunización. Tales ratones se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N° 5.476.996 y 5.698.767 de Wilson y col.

Caracterización de la unión del anticuerpo al antígeno.

Los anticuerpos de la invención pueden someterse a ensayo para determinar la unión a IL-13R α 1, y para determinar la unión a través del dominio 3 de la región extracelular del receptor, mediante, por ejemplo ELISA convencional. De manera similar, también puede utilizarse un ensayo de ELISA para cribar los hibridomas que muestran reactividad positiva con IL-13R α 1.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-hIL-13R α 1 seleccionados compiten con los anticuerpos 4B5, 8B11 o 15F4, puede biotinilarse cada anticuerpo utilizando procedimientos convencionales. Pueden realizarse

estudios de competición utilizando anticuerpos monoclonales no marcados y anticuerpos monoclonales biotinilados utilizando placas ELISA recubiertas con IL-13R α 1 como se describe en los Ejemplos. Puede detectarse la unión del AcMo biotinilado con una sonda de estreptavidina-fosfatasa alcalina. También pueden utilizarse experimentos basados en BIACORE™ para determinar la competición entre anticuerpos por la unión a hIL-13R α 1.

- 5 De forma similar, pueden utilizarse ensayos basados en ELISA para determinar si una mutación por sustitución en un péptido que incluye el dominio 3 de hIL-13R α 1 de los restos de Val-Phe-Tyr-Val-Gln (SEC ID NO: 44) que corresponden a las posiciones 248-252 de la SEC ID NO: 1 con los restos de Ile-Leu-Glu-Val-Glu (SEC ID NO: 45) conduce a una pérdida de la unión entre un anticuerpo anti-IL-13R α 1 y el péptido hIL-13R α 1 mutante resultante en comparación con la unión entre dicho anticuerpo y el péptido hIL-13R α 1 sin dichas sustituciones. Puede utilizarse el mismo procedimiento para determinar si la sustitución de otros segmentos de la SEC ID NO: 1 modifican la unión del anticuerpo al anti-IL-13 R α 1.

- 15 También pueden utilizarse ensayos basados en ELISA para determinar si una mutación por sustitución en un péptido que incluye el dominio 3 de hIL-13R α 1 de cualquiera de: el resto de fenilalanina que corresponde a la posición 249 de la SEC ID NO: 1 con un resto de alanina ; el resto de tirosina que corresponde a la posición 250 de la SEC ID NO: 1 con un resto de alanina; o el resto de glutamina que corresponde a la posición 252 de la SEC ID NO: 1 con un resto de alanina; conduce a una pérdida de la unión entre dicho anticuerpo y el péptido hIL-13R α 1 mutante resultante en comparación con la unión entre dicho anticuerpo y el péptido hIL-13R α 1 sin dichas sustituciones.

- 20 Los expertos en la materia determinarán fácilmente los péptidos hIL-13R α 1 adecuados para su uso en tales ensayos, e incluyen fragmentos de hIL-13R α 1 de longitud completa, por ejemplo la región extracelular del receptor o el dominio 3 de la región extracelular del receptor que puede fusionarse a otros péptidos, por ejemplo para su presentación en fagos.

Para determinar el isotipo de los anticuerpos purificados, pueden realizarse ensayos de ELISA de isotipo utilizando reactivos específicos para los anticuerpos de un isotipo en concreto.

- 25 *Inmunconjugados.*

En otro aspecto, la presente divulgación presenta un anticuerpo anti-IL-13R α 1, o un fragmento del mismo, conjugado con un resto terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina. Tales conjugados se denominan en el presente documento "inmunconjugados". Los inmunconjugados y los procedimientos de formación de los mismos son bien conocidos en la técnica.

- 30 Para un análisis adicional de los tipos de citotoxinas, engarces y procedimientos para conjugar agentes terapéuticos con anticuerpos, véanse también Saito y col., Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215, 2003; Trail y col., Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337, 2003; Payne, Cancer Cell 3:207-212, 2003; Allen, Nat. Rev. Cancer 2:750-763, 2002; Pastan y Kreitman, Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091, 2002; Senter y Springer, Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264, 2001.

- 35 *Moléculas biespecíficas.*

- 40 En otro aspecto, la presente divulgación presenta moléculas biespecíficas que contienen un anticuerpo anti-IL-13R α 1 de la invención. Un anticuerpo de la invención puede derivatizarse o ligarse a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, otro anticuerpo o ligando para un receptor) para generar una molécula biespecífica que se une a por lo menos dos moléculas diana o sitios de unión diferentes. El anticuerpo de la invención puede de hecho derivatizarse o unirse a más de otra molécula funcional para generar moléculas multiespecíficas que se unen a más de dos moléculas diana y/o sitios de unión diferentes; tales moléculas multiespecíficas también pretenden ser abarcadas por la expresión "molécula biespecífica" tal como se utiliza en el presente documento.

Moléculas de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la invención.

- 45 Otro aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la invención. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado de células, o en forma parcialmente purificada o prácticamente pura. Un ácido nucleico se "aisla" o se "hace prácticamente puro" cuando se purifica de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otras proteínas o ácidos nucleicos celulares, mediante técnicas convencionales, que incluyen el tratamiento alcalino/SDS, bandeado con CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otros bien conocidos en la técnica. Véase, Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York, 1987. Un ácido nucleico de la invención puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede contener o no secuencias intrónicas. En una forma de realización específica, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

- 55 Los ácidos nucleicos de la invención pueden obtenerse mediante técnicas convencionales de biología molecular. Para los anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos que portan genes de inmunoglobulina humana como se describe adicionalmente en el presente

documento), los ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo generado por el hibridoma pueden obtenerse mediante técnicas convencionales de clonación de ADNc o amplificación mediante PCR. Para los anticuerpos obtenidos a partir de una genoteca de inmunoglobulinas (por ejemplo, utilizando técnicas de presentación en fagos), pueden recuperarse los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo a partir de la biblioteca.

5 Las moléculas de ácidos nucleicos específicas de la invención son aquellas que codifican las secuencias de V_H y/o V_L de los anticuerpos monoclonales 4B5, 8B11 o 15F4. Las secuencias de ADN que codifican las secuencias de V_H de 4B5, 8B11 o 15F4 se muestran en las SEC ID NO: 21, 25 y 29, respectivamente. En la SEC ID NO: 33 se muestra una secuencia de ADN que codifica la secuencia de V_L de 15F4.

10 Otras moléculas de ácidos nucleicos de la divulgación son aquellas que codifican las CDR de las secuencias de V_H y V_L de los anticuerpos monoclonales 4B5, 8B11 o 15F4.

15 También se incluyen en la presente divulgación los ácidos nucleicos con secuencias de nucleótidos que son idénticas en por lo menos aproximadamente el 90% y más preferentemente idénticas en por lo menos aproximadamente el 95% a las secuencias de nucleótidos descritas el presente documento, y cuyas secuencias de nucleótidos codifican los anticuerpos de la presente invención. Los procedimientos de comparación de secuencias para determinar la identidad son conocidos para los expertos en la materia e incluyen aquellos analizados en el presente documento.

La referencia a "idénticas en por lo menos aproximadamente el 90%" incluye idénticas por lo menos en aproximadamente el 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100%.

20 Una vez que se obtienen los fragmentos de ADN que codifican los segmentos V_H y V_L , estos fragmentos de ADN pueden manipularse adicionalmente mediante técnicas convencionales de ADN recombinante, por ejemplo para convertir los genes de la región variable en genes de la cadena del anticuerpo de longitud completa, en genes de fragmentos Fab o en un gen de scFv. La región constante de la cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, y en las formas de realización específicas es una región constante de IgG1 o IgG4 o un derivado de la misma. Para un gen de la cadena pesada de fragmento Fab, el ADN que codifica V_H puede unirse operativamente a otra molécula de ADN que codifica sólo la región constante C_{H1} de la cadena pesada.

30 La divulgación proporciona adicionalmente ácidos nucleicos que se hibridan al complemento o a los complementos de los ácidos nucleicos desvelados (por ejemplo, ácidos nucleicos con una secuencia de nucleótidos como se representa en las Figuras 2, 3, 4 ó 5) en condiciones de hibridación concretas, y que codifican moléculas de anticuerpos que se unen a hIL-13R α 1 a través del dominio 3 de la región extracelular de la cadena del receptor y que inhiben la señalización de IL-13 (es decir, los anticuerpos de la presente invención). Los procedimientos para la hibridación de ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 6.3.1-6.3.6, 1989. Como se define en el presente documento, unas condiciones de hibridación moderadamente rigurosas utilizan una solución de prelavado que contiene 5X cloruro sódico/citrato sódico (SSC), SDS al 0,5% p/v, EDTA 1,0 mM (pH 8,0), tampón de hibridación de aproximadamente formamida al 50% v/v, 6X SSC, y una temperatura de hibridación de 55°C (u otras soluciones de hibridación similares, tales como una que contiene aproximadamente formamida al 50% v/v, con una temperatura de hibridación de 42°C), y condiciones de lavado de 60°C, en 0,5X SSC, SDS al 0,1% p/v. Una condición de hibridación rigurosa es, por ejemplo, 6X SSC a 45°C, seguido de uno o varios lavados en 0,1 x SSC, SDS al 0,2% a 68°C. Además, un experto en la materia puede manipular las condiciones de lavado y/o de hibridación para aumentar o disminuir el rigor de la hibridación de manera que los ácidos nucleicos que comprenden las secuencias de nucleótidos que son idénticas entre sí en por lo menos el 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 ó 99% permanezcan por lo general hibridadas entre sí. Los parámetros básicos que influyen en la elección de las condiciones de hibridación y la guía para la elaboración de condiciones adecuadas se establecen en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., capítulos 9 y 11, 1989 y en Ausubel y col. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., secciones 2.10 y 6.3-6.4, 1995), y pueden ser determinados fácilmente por los expertos en la materia en base a, por ejemplo, la longitud y/o la composición del ADN.

50 Por consiguiente, en otro aspecto, la presente divulgación proporciona un anticuerpo anti-hIL-13R α 1 que incluye un dominio variable de la cadena ligera con una secuencia de aminoácidos que está codificada por una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones moderadamente rigurosas al complemento de una secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 33, y/o un dominio variable de la cadena pesada con una secuencia de aminoácidos que está codificada por una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones moderadamente rigurosas al complemento de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID NO: 21, 25 y 29. En una forma de realización, dicho dominio variable de la cadena ligera incluye una secuencia de aminoácidos que está codificada por una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas al complemento de una secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 33, y/o dicho dominio variable de la cadena pesada con una secuencia de aminoácidos que está codificada por una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas al complemento de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID NO: 21, 25 y 29.

Las formas de realización específicas de la presente divulgación abarcan los ácidos nucleicos que codifican las

moléculas de anticuerpos que poseen las manipulaciones en la región Fc que dan como resultado la unión reducida a los receptores FcγR o C1q en parte del anticuerpo. Una forma de realización específica de la presente divulgación es un ácido nucleico aislado que tiene la secuencia establecida en la SEC ID NO: 43.

Producción de los anticuerpos monoclonales de la invención.

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona vectores que incluyen ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo de la presente invención. Los vectores de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, plásmidos y otras construcciones (por ejemplo, fagos o fagémidos) adecuadas para la expresión del péptido deseado al nivel apropiado para el fin pretendido.

10 En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula o células hospedadoras que albergan los ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo de la presente invención. Por lo general, la célula hospedadora albergará un vector de expresión como se ha descrito en el presente documento.

Los anticuerpos de la invención pueden producirse en una célula hospedadora utilizando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y de transfección de genes como es bien conocido en la técnica (por ejemplo, Morrison Science 229:1202, 1985).

15 Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o los fragmentos de anticuerpo de los mismos, puede obtenerse ADN que codifica las cadenas ligera y pesada parciales o de longitud completa, mediante técnicas convencionales de biología molecular (por ejemplo, amplificación mediante PCR o clonación de ADNc utilizando un hibridoma que exprese el anticuerpo de interés) y puede insertarse el ADN en vectores de expresión de manera que los genes queden unidos operativamente a secuencias de control de la transcripción y de la traducción. En este contexto, la expresión "unido operativamente" pretende significar que un gen de anticuerpo se liga en un vector de manera que las secuencias de control de la transcripción y de la traducción dentro del vector sirvan para su función prevista de regulación de la transcripción y de la traducción del gen de anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen para que sean compatibles con la célula de expresión hospedadora utilizada. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en vectores diferentes o, más generalmente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpos se insertan en el vector de expresión mediante procedimientos convencionales (por ejemplo, la ligación de los sitios de restricción complementarios en el vector y el fragmento de gen de anticuerpo, o la ligación de los extremos romos si no hay presentes sitios de restricción). Las regiones variables de la cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos en el presente documento pueden utilizarse para crear genes de anticuerpos de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo insertándolos en vectores de expresión que ya codifican las regiones constante de la cadena pesada y constante de la cadena ligera del isotipo deseado, de manera que el segmento V_H quede unido operativamente al segmento o segmentos C_H dentro del vector y el segmento V_L quede unido operativamente al segmento C_L dentro del vector. Además o de manera alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilite la secreción de la cadena de anticuerpo a partir de una célula hospedadora. El gen de la cadena de anticuerpo puede clonarse en el vector de manera que el péptido señal quede unido en fase al extremo amino terminal del gen de la cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido de señal de una proteína no-inmunoglobulina).

40 Además de los genes de la cadena del anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la invención portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena del anticuerpo en una célula hospedadora. La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o la traducción de los genes de la cadena del anticuerpo. Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel, Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA, 1990. Los expertos en la materia entenderán que el diseño del vector de expresión, que incluye la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras específicas para la expresión en células hospedadoras de mamíferos incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteínas en las células de mamíferos, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), virus de simio 40 (SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío principal del adenovirus (AdMLP)), y poliovirus. De manera alternativa, pueden utilizarse secuencias reguladoras no virales, tales como el promotor de la ubiquitina o el promotor de la beta-globina.

55 Además de los genes de la cadena del anticuerpo y de las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en las células hospedadoras (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de las células hospedadoras en las que se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas de Axel y col.) Por ejemplo, por lo general el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula hospedadora en la que se ha introducido el vector. Genes marcadores seleccionables específicos incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células

60

hospedadoras dhfr con selección/amplificación con metotrexato) y el gen neo (para la selección de G418).

Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, el vector o los vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera se transfectan en una célula hospedadora mediante técnicas convencionales. Las diversas formas del término "transfección" pretenden abarcar una amplia variedad de técnicas comúnmente utilizadas para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedadora procarionota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con calcio-fosfato, transfección con DEAE-dextrano y similares. Aunque es posible expresar los anticuerpos de la invención en células hospedadoras procarionotas o eucariotas, por lo general resulta preferente la expresión de los anticuerpos en células eucariotas, y en células hospedadoras de mamífero, porque es más probable que tales células eucariotas, y en concreto las células de mamíferos, ensamblen y secreten un anticuerpo inmunológicamente activo y correctamente plegado, que las células procarionotas.

Las células hospedadoras de mamífero específicas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) (que incluyen células DHFR-CHO, descritas en Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, 1980, utilizadas con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo, como se describe en Kaufman y Sharp, Mol. Biol. 159:601-621, 1982), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. En concreto, para su uso con células de mieloma NSO, otro sistema de expresión específico es el sistema de expresión del gen GS desvelado en los documentos WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338.841. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican los genes de anticuerpos se introducen en las células hospedadoras, los anticuerpos son producidos por cultivo de las células hospedadoras durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras o la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se cultivan las células hospedadoras. Los anticuerpos pueden recuperarse de las células y/o del medio de cultivo utilizando procedimientos convencionales de purificación de proteínas.

Por consiguiente, en otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo de la invención por cultivo de células hospedadoras que albergan los ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo de la invención. Dicho procedimiento puede implicar adicionalmente la purificación del anticuerpo.

Identificación de los anticuerpos que se unen a través del dominio 3.

En otro aspecto, la divulgación proporciona procedimientos para identificar anticuerpos capaces de unirse a hIL-13R α 1 a través del dominio 3 de la región extracelular del receptor.

En un aspecto, el procedimiento implica someter a ensayo anticuerpos para determinar la unión a péptidos que incluyen el dominio 1, el dominio 2 o el dominio 3 de la región extracelular de hIL-13R α 1. Pueden seleccionarse anticuerpos que se unen al péptido que incluye el dominio 3 pero que muestran escasa o ninguna unión a los dominios 1 o 2 de la región extracelular del receptor.

En otro aspecto del procedimiento implica someter a ensayo anticuerpos que se unen a la región extracelular del receptor para determinar la unión a los dominios 1 y 2 del receptor. Pueden seleccionarse los anticuerpos que no se unen a los dominios 1 y 2 como los que se unen potencialmente al dominio 3.

La unión, o su ausencia, a péptidos, que incluye los diversos dominios, puede determinarse fácilmente mediante procedimientos convencionales; véase, por ejemplo, el Ejemplo 3.

Los péptidos que incluyen uno o dos dominios de la región extracelular de hIL-13R α 1 y que carecen del otro dominio o dominios de la región extracelular de hIL-13R α 1 (es decir, las formas truncadas de la región extracelular de hIL-13R α 1) resultan útiles en tales procedimientos. Por ejemplo, un péptido que incluye el dominio 3, pero que carecen de los dominios 1 y 2, puede resultar útil en los procedimientos, como puede serlo un péptido que incluye los dominios 1 y 2, pero que carece del dominio 3.

Las formas truncadas de la región extracelular de hIL-13R α 1 pueden fusionarse a otras secuencias para mejorar el rendimiento del procedimiento, por ejemplo para facilitar la purificación, la inmovilización, la detección o la presentación. La presentación de los péptidos, que incluye los dominios pertinentes en el fago también es un procedimiento útil para su uso en estos procedimientos; véase, por ejemplo, el Ejemplo 3.

La región extracelular de hIL-13R α 1 corresponde a los aminoácidos 1 a 317 de la SEC ID NO: 1. De acuerdo con la presente invención, el dominio 1 de la región extracelular de hIL-13R α 1 corresponde a los aminoácidos 1 a 100 de la SEC ID NO: 1; el dominio 2 corresponde a los aminoácidos 101 a 200 de la SEC ID NO: 1; y el dominio 3 corresponde a los aminoácidos 201 a 317 de la SEC ID NO: 1 (SEC ID NO: 37). Los expertos en la materia entenderán que existe un margen de apreciación con respecto a los restos de aminoácidos precisos incluidos en los extremos de los dominios.

Por consiguiente, la divulgación proporciona un péptido que incluye: (a) el dominio 1 de la región extracelular de hIL-13R α 1; (b) el dominio 2 de la región extracelular de hIL-13R α 1; (c) el dominio 3 de la región extracelular de hIL-13R α 1; o (d) los dominios 2 y 3 de la región extracelular de hIL-13R α 1; en el que en cada caso dicho péptido no contiene otros dominios de la región extracelular de hIL-13R α 1.

En una forma de realización específica, la divulgación proporciona un péptido que incluye: (a) los aminoácidos 1 a 100 de la SEC ID NO: 1; (b) los aminoácidos 101 a 200 de la SEC ID NO: 1; (c) los aminoácidos 201 a 317 de la SEC ID NO: 1; o (d) los aminoácidos 1 a 200 de la SEC ID NO: 1; en el que en cada caso el péptido no contiene otros dominios de la región extracelular de hIL-13R α 1.

- 5 En otro aspecto, la divulgación proporciona ácidos nucleicos que codifican tales formas truncadas de la región extracelular de hIL-13R α 1. Por consiguiente, en otro aspecto, la invención proporciona ácidos nucleicos que codifican un péptido que incluye: (a) el dominio 1 de la región extracelular de hIL-13R α 1; (b) el dominio 2 de la región extracelular de hIL-13R α 1; (c) el dominio 3 de la región extracelular de hIL-13R α 1; o (d) los dominios 2 y 3 de la región extracelular de hIL-13R α 1; en el que en cada caso dicho péptido no contiene otros dominios de la región extracelular de hIL-13R α 1.

En una forma de realización concreta, la divulgación proporciona ácidos nucleicos que codifican un péptido que incluye: (a) los aminoácidos 1 a 100 de la SEC ID NO: 1; (b) los aminoácidos 101 a 200 de la SEC ID NO: 1; (c) los aminoácidos 201 a 317 de la SEC ID NO: 1; o (d) los aminoácidos 1 a 200 de la SEC ID NO: 1; en el que en cada caso el péptido no contiene otros dominios de la región extracelular de hIL-13R α 1.

- 15 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona vectores que incluyen dicho ácido nucleico que codifica formas truncadas de la región extracelular de hIL-13R α 1. Los vectores de acuerdo con la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, plásmidos y otras construcciones (por ejemplo, fago o fagémido) adecuadas para la expresión del péptido deseado al nivel apropiado para la finalidad prevista; véase, por ejemplo, Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: 3ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Para la mayoría de los fines de clonación, pueden utilizarse vectores de ADN. Los vectores típicos incluyen plásmidos, virus modificados, bacteriófagos, cósmidos, cromosomas artificiales de levadura, y otras formas de ADN episomal o integrado. Está dentro de la competencia del experto en la materia determinar un vector apropiado para una transferencia de genes concreta, la generación de un péptido recombinante, o cualquier otro uso. En formas de realización específicas, además de un gen recombinante, el vector puede contener también un origen de replicación para la replicación autónoma en una célula hospedadora, secuencias reguladoras apropiadas, tales como un promotor, una secuencia de terminación, una secuencia de poliadenilación, una secuencia potenciadora, un marcador seleccionable, un número limitado de sitios enzimáticos de restricción útiles, otras secuencias según resulte apropiado y el potencial para alto número de copias. Ejemplos de vectores de expresión para la producción de péptidos son bien conocidos en la técnica. Si se desea, puede integrarse un ácido nucleico que codifica un péptido de interés en el cromosoma hospedador utilizando técnicas bien conocidas en la técnica. El ácido nucleico puede expresarse también en plásmidos mantenidos episomalmente o incorporados en un cromosoma artificial. Puede emplearse cualquier técnica disponible para el experto en la materia para introducir el ácido nucleico en la célula hospedadora. Los procedimientos de subclonación de moléculas de ácidos nucleicos de interés en vectores de expresión, la transformación o la transfección de células hospedadoras con tales vectores y los procedimientos para generar proteína prácticamente pura que comprende las etapas de introducir el vector de expresión respectivo en una célula hospedadora, y cultivar la célula hospedadora en condiciones apropiadas, son bien conocidos. El péptido así producido puede recogerse de las células hospedadoras de las maneras convencionales. Las técnicas adecuadas para la introducción de ácido nucleico en las células de interés dependerán del tipo de célula que se utilice. Las técnicas generales incluyen, pero no se limitan a, la transfección con fosfato cálcico, DEAE-dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción utilizando virus apropiados para la línea celular de interés (por ejemplo, retrovirus, vaccinia, baculovirus, o bacteriófagos).

- En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una célula o células aisladas que albergan ácidos nucleicos, que codifican las formas truncadas del receptor desvelado como se ha descrito. Puede utilizarse una variedad de líneas celulares diferentes para la producción recombinante de tales péptidos, que incluyen pero no se limitan a las obtenidas a partir de organismos procariontes (por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus* y *Streptomyces*) y a partir de eucariotes (por ejemplo, levadura, insectos, y mamíferos). Las células vegetales, incluyendo las plantas transgénicas, y las células animales, incluyendo los animales transgénicos (distintos de los seres humanos), que comprenden el ácido nucleico desvelado en el presente documento también se contemplan como parte de la presente divulgación.

Composiciones y composiciones farmacéuticas.

- 50 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene una o una combinación de anticuerpos monoclonales de la presente invención, formulados junto con por lo menos un componente adicional. Tales composiciones pueden incluir uno o una combinación de (por ejemplo, dos o más) anticuerpos, o inmunoconjugados o moléculas biespecíficas de la invención diferentes. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención puede incluir una combinación de anticuerpos (o inmunoconjugados o moléculas biespecíficas) que se unen a epítopos diferentes en el antígeno diana o que tienen actividades complementarias.

- Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención, y para su uso de acuerdo con la presente invención, pueden incluir, además del principio activo, vehículos, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. La naturaleza precisa del vehículo o de otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser oral o por inyección, por ejemplo, intravenosa.

- Los vehículos, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen cualquiera de y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes utilizados para ajustar la tonicidad, tampones, agentes quelantes, y agentes retardantes de la absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para las sustancias farmacéuticas activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. En las composiciones también pueden incorporarse principios activos complementarios.
- Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando sean solubles en agua) y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles. Deben ser estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento y deben preservarse contra la acción contaminante de los microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dilución que comprenda, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. Puede mantenerse la fluidez adecuada, por ejemplo, utilizando tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede conseguirse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, tirmerosal y similares. En muchos casos, resultará preferente incluir agentes para ajustar la tonicidad, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Las composiciones también pueden incluir tampones y agentes quelantes.
- Las soluciones estériles inyectables se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad necesaria en el disolvente apropiado con el principio activo y opcionalmente otros principios activos según resulte necesario, seguido de esterilización por filtración u otros medios de esterilización apropiados. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación adecuados incluyen el secado al vacío y la técnica de liofilización que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado.
- La cantidad de compuesto activo en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtenga una dosis adecuada.
- Las pautas posológicas se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o puede reducirse o aumentarse la dosis proporcionalmente según venga indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Resulta especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de dosificación. Forma de dosificación unitaria tal como se utiliza en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico necesario. Las especificaciones para las formas de dosificación unitaria de la invención vienen impuestas por y dependen directamente de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico concreto a conseguir.
- Para la administración del anticuerpo, la dosis oscila entre aproximadamente 0,01 y 100 mg/kg, y más habitualmente entre 0,05 y 25 mg/kg del peso corporal del hospedador. Por ejemplo las dosis pueden ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o estar en el intervalo comprendido entre 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento ejemplar puede implicar la administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, o una vez al mes.
- En algunos procedimientos, se administran de manera simultánea dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión, en cuyo caso la dosis de cada anticuerpo administrado se encuentra dentro de los intervalos indicados.
- De manera alternativa, el anticuerpo puede administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se necesita una administración menos frecuente. Las dosis y la frecuencia varían dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente. Las dosis y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En las aplicaciones profilácticas, se administra una dosis relativamente baja a intervalos relativamente poco frecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En las aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosis relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduce o finaliza, y preferentemente hasta que el paciente muestra una mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Posteriormente, puede administrarse al paciente un régimen profiláctico.
- Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse con el fin de obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, una composición y un modo de administración concreto, sin que resulte tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluye la actividad de las composiciones concretas de la presente invención empleadas, la vía

de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto concreto que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones concretas empleadas, la edad, el sexo, el peso, el estado, la salud general y la historia médica previa del paciente a tratar, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

5 Una composición de la presente invención puede administrarse a través de una o varias vías de administración utilizando uno o varios de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Como entenderá el experto en la materia, la vía y/o el modo de administración variarán en función de los resultados deseados. Las vías de administración específicas para los anticuerpos de la presente invención incluyen las vías intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea u otras vías de administración parenterales, por ejemplo por
10 infusión.

De manera alternativa, un anticuerpo de la invención puede administrarse por una vía de administración no parenteral, tal como una vía tópica, epidérmica o a través de las mucosas, por ejemplo, por vía intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

15 Los compuestos activos pueden prepararse con vehículos que protegerán el compuesto contra una liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos, y sistemas de administración microencapsulados. Pueden utilizarse polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos procedimientos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.
20

Las composiciones terapéuticas pueden administrarse con los dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una forma de realización específica, una composición terapéutica de la invención puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tales como los dispositivos desvelados en las patentes de EE.UU. N°5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; ó 4.596.556.

25 *Usos y procedimientos de la invención.*

Los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse en los procedimientos para inhibir la señalización mediada por IL-13R α 1 poniendo en contacto una célula que expresa IL-13R α 1 con un anticuerpo de la presente invención en condiciones que permitan que dicho anticuerpo se una a IL-13R α 1. Las formas de realización específicas de la presente invención incluyen tales procedimientos en los que la célula es una célula humana.

30 Los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse en procedimientos de diagnóstico o tratamiento en sujetos humanos o animales.

Por ejemplo, estas moléculas pueden administrarse a un sujeto para tratar o prevenir una variedad de trastornos y enfermedades relacionadas con la IL-13. El término "sujeto", tal como se utiliza en el presente documento, pretende incluir a los seres humanos y, cuando el anticuerpo presenta reactividad cruzada apropiada, a los animales no humanos. Los animales no humanos pueden incluir a los primates no humanos. Los procedimientos son especialmente adecuados para el tratamiento de pacientes humanos que tienen un trastorno o una enfermedad relacionada con la IL-13. Cuando se administran anticuerpos contra IL-13R α 1 junto con otro agente, los dos pueden administrarse en cualquier orden o de manera simultánea.
35

Por consiguiente, en un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la IL-13 en un sujeto que necesita tratamiento administrando al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo de la presente invención, o una composición, que incluya dicho anticuerpo. Se habla de una enfermedad o un trastorno "relacionado con la IL-13" si los signos o síntomas de una enfermedad o un trastorno de este tipo están mediados por la expresión, la actividad o la mutación de la IL-13, que incluye casos en los que la expresión o la actividad de la IL-13 se encuentra elevada o reducida en comparación con un sujeto normal o sano. En el presente documento se desvelan ejemplos de enfermedades o trastornos relacionados con la IL-13.
40
45

Los términos "tratar" y "tratamiento", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren al tratamiento terapéutico y pueden incluir medidas profilácticas o preventivas. Por ejemplo, el tratamiento puede dar como resultado una reducción de la gravedad y/o de la frecuencia de los síntomas de una enfermedad o un trastorno asociado a la IL-13, la eliminación de los síntomas y/o la causa subyacente de una enfermedad o un trastorno asociado a la IL-13, o la prevención de la aparición de síntomas y/o su causa subyacente. Por lo tanto, el tratamiento no puede dar como resultado una "cura", sino más bien una mejoría de los síntomas. El tratamiento incluye la inhibición de la señalización mediada por IL-13R α 1 en un sujeto que presenta una enfermedad o un trastorno relacionado con la IL-13 administrando al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo de la presente invención, o una composición que incluya un anticuerpo de este tipo.
50

55 La expresión "cantidad eficaz", tal como se utiliza en el presente documento, significa una cantidad suficiente de un agente que proporciona el efecto o resultado terapéutico o fisiológico deseado, o inhibe la actividad de IL-13R α 1. A veces pueden manifestarse reacciones adversas, por ejemplo, efectos secundarios, junto con el efecto terapéutico

deseado; por tanto, un facultativo sopesa los beneficios potenciales frente a los riesgos potenciales para determinar lo que es una "cantidad eficaz" apropiada. La cantidad exacta de agente necesaria puede variar de un sujeto a otro, dependiendo de factores tales como la especie, la edad y el estado general del sujeto, el modo de administración y similares. Por lo tanto, puede que no sea posible especificar una "cantidad eficaz" exacta. Sin embargo, una

5 cantidad eficaz apropiada en cualquier caso individual puede ser fácilmente determinada por la persona capacitada en la técnica en base a factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto, y la composición o la vía de administración concreta seleccionada.

También se contemplan procedimientos para utilizar un anticuerpo de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos y enfermedades relacionadas con la IL-13.

10 En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos para detectar la presencia de IL-13R α 1 (por ejemplo, IL-13R α 1 humano) en una muestra, o medir la cantidad de IL-13R α 1, poniendo en contacto la muestra, y una muestra de control, con un anticuerpo de la invención en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo e IL-13R α 1. A continuación, se detecta la formación de un complejo en el que una diferencia en la formación del complejo entre la muestra en comparación con la muestra de control es indicativa de la presencia

15 de IL-13R α 1 en la muestra.

Dentro de la divulgación también se encuentra un kit que incluye una composición (por ejemplo, un anticuerpo, un inmunoconjugado y una molécula biespecífica) de la invención e instrucciones para su uso. El kit puede contener adicionalmente por lo menos un reactivo adicional, o uno o varios anticuerpos adicionales de la invención (por ejemplo, un anticuerpo que tiene una actividad complementaria que se une a un epítipo en el antígeno diana distinta del primer anticuerpo). Los kits incluyen por lo general una etiqueta que indica el uso previsto del contenido del kit. El término "etiqueta" incluye cualquier material escrito o grabado suministrado en o con el kit, o que acompaña al kit de otro modo.

20

Los ejemplos de trastornos y enfermedades relacionadas con la IL-13 en las que los anticuerpos de la invención pueden utilizarse incluyen, pero no se limitan a, el asma, la EPOC, la dermatitis atópica, la rinitis alérgica, la eosinofilia esofágica, el linfoma de Hodgkin, la enfermedad intestinal inflamatoria, la psoriasis, la artritis psoriásica o la fibrosis. En una forma de realización específica, el trastorno o la enfermedad relacionada con la IL-13 es el asma. En el presente documento se proporciona información adicional acerca de los trastornos y las enfermedades relacionadas con la IL-13.

25

El asma es una enfermedad pulmonar crónica, causada por la inflamación de las vías respiratorias inferiores y se caracteriza por problemas respiratorios recurrentes. Las vías respiratorias de los pacientes son sensibles y se hinchan o inflaman hasta cierto punto todo el tiempo, incluso cuando no hay síntomas. La inflamación da como resultado el estrechamiento de las vías respiratorias y reduce el flujo de aire dentro y fuera de los pulmones, dificultando la respiración y conduciendo a sibilancias, opresión en el pecho y tos. El asma se desencadena por hipersensibilidad frente a alérgenos (por ejemplo, ácaros del polvo, polen, moho), irritantes (por ejemplo, humo, vapores, olores fuertes), infecciones respiratorias, el ejercicio y el clima seco. Los desencadenantes irritan las vías respiratorias y el revestimiento de las vías respiratorias se hincha para estar aún más inflamadas, a continuación el moco obstruye las vías respiratorias y los músculos alrededor de las vías respiratorias se tensan hasta que la respiración se vuelve difícil y estresante, y aparecen los síntomas del asma.

30

Existen pruebas sólidas a partir de modelos animales y de pacientes de que la inflamación asmática y otras patologías son activadas por respuestas Th2 desreguladas a los aeroalérgenos y a otros estímulos (Busse y col., Am. J. Resp. Crit. Care Med. 1995 152(1):388-393). En concreto, se cree que la IL-13 es la citocina efectora más importante que conduce a una variedad de respuestas celulares en el pulmón, que incluyen la hiperreactividad de las vías respiratorias, la eosinofilia, la metaplasia de células caliciformes y la hipersecreción de moco.

40

El gen que codifica la IL-13 se encuentra en el cromosoma 5q31. Esta región también contiene genes que codifican la IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 y GM-CSF, y se ha relacionado con el asma. Las variantes genéticas de la IL-13 que están asociadas con el asma y la atopia se han encontrado en el promotor y en las regiones codificadoras (Vercelli, Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 2(5):389-393, 2002). Los datos de estudio funcionales están disponibles para la variante codificadora, Gln130 IL-13 (denominada en el presente documento Q130 IL-13). El polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) +2044 G a A encontrado en el cuarto exón, da como resultado una sustitución de una arginina con una glutamina en la posición 130 (Q130 IL-13). Se ha descubierto que esta variante se asocia con el asma, el aumento de los niveles de IgE y la dermatitis atópica en las poblaciones de Japón y Europa. Se cree que Q130 IL-13 tiene una estabilidad mejorada en comparación con la IL-13 natural. También tiene una afinidad ligeramente inferior por el receptor señuelo IL-13R α 2 y en consonancia con estas observaciones, se encontraron medianas de los niveles de IL-13 en suero más altas en los pacientes homocigóticos para la variante de Q130 IL-13 en comparación con los pacientes no homocigóticos. Estos resultados indican que Q130 IL-13 podría influir en las concentraciones locales y sistémicas de IL-13 (Kazuhiko y col., J. Allergy Clin. Immunol. 109(6):980-987, 2002).

45

Se han medido niveles elevados de IL-13 en pacientes asmáticos atópicos y no atópicos. En un estudio, se midieron niveles medios de IL-13 en suero de 50 μ g/ml en pacientes asmáticos en comparación con 8 μ g/ml en pacientes control normales (Lee y col., J. Asthma 38(8):665-671, 2001). También se han medido niveles de IL-13 aumentados

55

en plasma, líquido de lavado broncoalveolar, muestras de biopsia pulmonar y esputo (J Allergy Clin. Immunol 114(5):1106-1109, 2004; Kroegel y col., Eur Respir. J. 9(5):899-904, 1996; Huang y col., J. Immunol. 155(5):2688-2694, 1995; Humbert y col., J. Allergy Clin. Immunol. 99(5):657-665, 1997).

5 Una serie de estudios ha definido un papel efector fundamental de la IL-13 para conducir a una patología en modelos de ratón, agudo y crónico, de asma alérgica. Se han utilizado el receptor de IL-13 de alta afinidad (IL-13R α 2) o anticuerpos policlonales anti-IL-13 para neutralizar la bioactividad de la IL-13 de ratón en estos modelos. El bloqueo de IL-13 en el momento de la exposición al alérgeno inhibía completamente la hiperreactividad de las vías respiratorias inducida por OVA, la eosinofilia y la metaplasia de células caliciformes. En cambio, la administración del anticuerpo contra IL-4 después de la sensibilización y durante la fase de exposición al alérgeno sólo reducía parcialmente el fenotipo asmático. Por lo tanto, aunque la IL-4 y la IL-13 exógenas son capaces de inducir un fenotipo similar al asma, la actividad efectora para la IL-13 parece ser superior a la de la IL-4. Estos datos sugieren un papel primordial para la IL-4 en la inducción de inmunidad (especialmente para el desarrollo y reclutamiento de linfocitos Th2 hacia las vías respiratorias, y la producción de IgE), mientras que se cree que la IL-13 está involucrada principalmente en diversos resultados efectores, que incluyen la hiperreactividad de las vías respiratorias, la sobreproducción de moco y la inflamación celular (Wills-Karp y col., Science 282:2258-2261, 1998; Grunig y col., Science 282:2261-2263, 1998; Taube y col., J. Immunol. 169:6482-6489, 2002; Blease y col., J. Immunol 166(8):5219-5224, 2001).

20 En experimentos complementarios, los niveles de IL-13 en pulmón se han visto elevados por la sobre-expresión en un ratón transgénico o por instilación de la proteína IL-13 en la tráquea de ratones naturales. En ambos escenarios, se indujeron características similares al asma; hiperreactividad de las vías respiratorias no específica a la estimulación colinérgica, eosinofilia pulmonar, hiperplasia de las células epiteliales, metaplasia de las células mucosas, fibrosis subepitelial, obstrucción de las vías respiratorias y cristales similares a los de Charcot-Leyden. Además, se descubrió que la IL-13 era un potente estimulador de las metaloproteinasas de la matriz y de las proteasas catépsina del pulmón, lo que daba lugar a cambios enfisematosos y metaplasia mucosa. Por lo tanto, la IL-13 puede ser una molécula efectora importante en el asma y en los fenotipos de la EPOC (Zhu y col., J. Clin. Invest. 103(6):779-788, 1999; Zheng y col., J. Clin. Invest. 106(9):1081-1093, 2000).

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

30 La EPOC es un término genérico que abarca diversos síndromes clínicos que incluyen el enfisema y la bronquitis crónica. Los síntomas son similares al asma y la EPOC puede tratarse con los mismos fármacos. La EPOC se caracteriza por una obstrucción crónica, progresiva y en gran medida irreversible, del flujo de aire. Se desconoce la contribución del individuo a la evolución de la enfermedad, pero se cree que fumar cigarrillos da lugar al 90% de los casos. Los síntomas incluyen tos, bronquitis crónica, dificultad para respirar e infecciones respiratorias. En última instancia la enfermedad dará lugar a una discapacidad severa y a la muerte. La bronquitis crónica se diagnostica en pacientes con antecedentes de tos o producción de esputo casi todos los días durante al menos 3 meses durante 2 años consecutivos sin ninguna otra explicación. El enfisema del pulmón se caracteriza por una dilatación permanente y anormal de los espacios aéreos y la destrucción de las paredes alveolares.

40 Se ha sugerido que la IL-13 desempeña un papel en el desarrollo de la EPOC. Los fumadores humanos que desarrollan EPOC tienen muchos tipos de células inflamatorias (neutrófilos, macrófagos, eosinófilos) en el parénquima pulmonar. La IL-13 es una citocina Th2 proinflamatoria, por lo tanto, para elaborar un modelo de la progresión del enfisema, Zheng y col., 1999, *supra*, dirigieron la sobre-expresión de IL-13 al epitelio de las vías respiratorias en ratones transgénicos para IL-13. Estos animales desarrollaron enfisema e inflamación del parénquima pulmonar y de las vías respiratorias. También desarrollaron la metaplasia mucosa que recuerda la bronquitis crónica.

45 Se ha informado que también el polimorfismo del promotor de la IL-13 (-1055 C a T) que se asocia con el asma alérgica tiene una mayor frecuencia en pacientes con EPOC en comparación con los controles sanos. Esto implica que el polimorfismo del promotor de la IL-13 tiene un papel funcional para un mayor riesgo de desarrollar EPOC (Kraan y col., Genes and Immunity 3:436-439, 2002). Además, se observó un mayor número de células positivas para IL-13 e IL-4 en los fumadores con bronquitis crónica en comparación con los fumadores asintomáticos (Miotto y col., Eur. Resp. J. 22:602-608, 2003). Sin embargo, en un estudio reciente para evaluar el nivel de expresión de IL-13 en los pulmones de pacientes con enfisema grave, no se encontró una asociación entre los niveles de la IL-13 y la enfermedad (Boutten y col., Thorax 59:850-854, 2004).

55 La IL-13 también se ha visto implicada en trastornos atópicos tales como la rinitis atópica y la dermatitis atópica. La rinitis alérgica es la enfermedad atópica más común en los Estados Unidos y se estima que afecta hasta a un 25% de los adultos y a más del 40% de los niños. Existe una estrecha relación entre la rinitis alérgica y el asma. Ambas afecciones comparten una inmunopatología y una fisiopatología comunes; tienen procesos inmunológicos similares en los que los eosinófilos y los linfocitos Th2 del tejido nasal y bronquial desempeñan un papel. Se cree que la producción excesiva de citocinas Th2, especialmente IL-4 e IL-5, es fundamental en la patogénesis de la enfermedad alérgica. La IL-13 comparte varias características y funciones efectoras con la IL-4 y esto, junto con la superposición funcional del uso del receptor de la IL-4 y de la IL-13, los componentes de la señalización intracelular,

y la organización genética, proporciona pruebas convincentes (aunque indirectas) del papel de la IL-13 en la promoción o el mantenimiento de la hipersensibilidad inmediata en el ser humano *in vivo*. Esto ha sido corroborado por Li y col. (Li y col., J Immunol 161:7007, 1998) quienes demostraron que los sujetos atópicos con rinitis alérgica estacional presentaban respuestas de la IL-13 significativamente más fuertes en respuesta a la activación dependiente de antígeno pero no policlonal.

La dermatitis atópica es una enfermedad de la piel común, crónica, recurrente, inflamatoria muy pruriginosa. La piel lesionada de pacientes con dermatitis atópica se caracteriza histológicamente por un infiltrado inflamatorio de linfocitos T, que durante las fases agudas se asocia con un predominio de la expresión de IL-4, IL-5 e IL-13 (Simon y col., J Allergy Clin Immunol 114:887, 2004; Hamid y col., J Allergy Clin Immunol 98:225, 1996). Además, Tazawa y col., Arch Derm Res 296:459, 2004, han demostrado que el ARNm de IL-13 (pero no de IL-4) está regulado positivamente de manera significativa en las lesiones cutáneas subaguda y crónica de pacientes con dermatitis atópica. La frecuencia de linfocitos T CD4+ y CD8+ circulantes que expresan IL-13 también está aumentada significativamente en estos pacientes (Aleksza y col., British J Dermatol 147: 1135, 2002). Se cree que este aumento de la actividad de IL-13 da como resultado niveles elevados de IgE en suero, contribuyendo de ese modo a la patogénesis de la dermatitis atópica. Además, el aumento de la producción de la IL-13 por los linfocitos T CD4+ neonatales es un marcador útil para identificar los recién nacidos con alto riesgo de desarrollar posteriormente enfermedades alérgicas, especialmente dermatitis atópica (Oshima y col., Pediatr Res 51:195, 2002). Simon y col., 2004 *supra*, proporcionaron pruebas adicionales de la importancia de la IL-13 en la etiología de la dermatitis atópica; el tratamiento tópico con pomada de tacrolimus (un fármaco inmunosupresor que inhibe las vías de señalización intracelular para la producción de citocinas) dio como resultado una mejoría clínica e histológica significativa de las lesiones de la piel atópica acompañada de unas reducciones significativas de la expresión local de citocinas Th2, incluyendo IL-13. Además, se ha demostrado que IL-13R α 1 se sobreexpresa en los queratinocitos suprabasales en la piel de pacientes con dermatitis atópica, e IL-13 era capaz de regular positivamente el ARNm de IL-13R α 1 *in vitro* (Wongpiyabovorn y col., J Dermatol Science 33:31, 2003).

Estos datos indican en conjunto que las intervenciones dirigidas a IL-13 pueden proporcionar un procedimiento eficaz para el tratamiento de la enfermedad alérgica humana.

La acumulación de eosinófilos en el esófago es un problema médico común en pacientes con diversas enfermedades, que incluyen la enfermedad por reflujo gastroesofágico, la esofagitis eosinofílica, la gastroenteritis eosinofílica, y las infecciones parasitarias. La eosinofilia esofágica se asocia con respuestas alérgicas, y la exposición repetida de ratones a aeroalergenos estableció una conexión entre la inflamación alérgica de las vías respiratorias y la eosinofilia esofágica. Se cree que los linfocitos Th2 inducen la inflamación asociada a la eosinofilia a través de la secreción de una serie de citocinas que incluyen la IL-4 y la IL-13, que activan las vías efectoras e inflamatorias tanto directa como indirectamente. La IL-13 parece ser especialmente importante, ya que es producida en grandes cantidades por los linfocitos Th2 y regula múltiples funciones de la enfermedad alérgica (por ejemplo, la producción de IgE, la sobreproducción de moco, la supervivencia y el reclutamiento de eosinófilos, y la hiperreactividad de las vías respiratorias. Los eosinófilos pueden generar IL-13 funcionalmente activa después de la exposición a GM-CSF y/o IL-5 *in vitro*, *ex vivo*, y en condiciones *in vivo* en las respuestas inflamatorias eosinofílicas (Schmid-Grendelmeier, J Immunology, 169:1021-1027, 2002). La IL-13 administrada al pulmón de ratones naturales, deficientes para IL-5, eotaxina-1 o STAT-6 por administración intratraqueal, estableció que la inflamación pulmonar, desencadenada por la IL-13, está asociada con el desarrollo de la eosinofilia esofágica (Mishra y col., Gastroenterol; 125:1419, 2003). En conjunto, estos datos proporcionan pruebas del papel de la IL-13 en la eosinofilia esofágica.

Otra área de interés importante está dirigir la IL-13 o los receptores de IL-13 para inhibir el crecimiento de determinados tipos de tumores. Se cree que las defensas del hospedador mediadas por linfocitos T de tipo 1 intervienen en el rechazo de tumores *in vivo* de manera óptima, y la desviación a una respuesta de tipo Th2 puede contribuir a bloquear el rechazo del tumor y/o a promover la recurrencia del tumor (Kobayashi y col., J. Immunol 160.: 5869, 1998). Varios estudios en animales utilizando líneas de células tumorales trasplantables apoyan esta idea, demostrando que STAT6, IL-4 e IL-13 (producidas en parte por las células NKT) eran capaces de inhibir el rechazo del tumor (Terabe y col., Nat. Immunol. 1:515, 2000; Kacha y col., J. Immunol. 165:6024-28, 2000; Ostrand-Rosenberg y col., J. Immunol. 165:6015, 2000). Se creía que la potente actividad antitumoral en ausencia de STAT6 era debida a la mejora de la producción de IFN γ específico del tumor y la actividad de CTL. Además, se ha demostrado que la pérdida de células NKT reduce la producción de IL-13 con un aumento concomitante de la recurrencia del tumor, lo que indica que la IL-13, producida en parte por las células NKT es importante para la inmunovigilancia (Terabe y col., 2000 *supra*). Como tal, estos hallazgos sugieren que los inhibidores de la IL-13 pueden ser eficaces como agentes inmunoterapéuticos contra el cáncer al interferir con el papel regulador negativo que la IL-13 desempeña en la regulación negativa de las respuestas inmunitarias contra las células tumorales.

Además de estimular las defensas antitumorales asociadas a los Th de tipo 1, los inhibidores de la IL-13 también pueden ser capaces de bloquear el crecimiento de las células tumorales de forma más directa. Por ejemplo, en la leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (LLC-B) y en la enfermedad de Hodgkin, la IL-13 o bien bloquea la apoptosis o promueve la proliferación de células tumorales (Chaouchi y col., Blood 87:1022, 1996; Kapp y col., J. Exp Med. 189:1939, 1999). La LLC-B es una enfermedad clínicamente heterogénea que se origina en los linfocitos B que implica un defecto en la apoptosis de las células leucémicas. Se cree que la IL-13 no actúa como factor de crecimiento directo sino que protege a las células tumorales de la apoptosis espontánea *in vitro* (Chaouchi y col.,

1996 *supra*; Lai y col., J. Immunol 162:78, 1999) y puede contribuir a la LLC-B al evitar la muerte de las células neoplásicas.

La enfermedad de Hodgkin es un tipo de linfoma que afecta principalmente a adultos jóvenes y que supone aproximadamente 7.500 casos al año en los Estados Unidos. El cáncer se caracteriza por la presencia de células Hodgkin/Reed-Sternberg (H/RS) multinucleadas grandes. En una gran mayoría de los casos, la población de células malignas surge a partir de linfocitos B. Varias líneas celulares derivadas de la enfermedad de Hodgkin, así como el tejido de ganglios linfáticos obtenidos de pacientes con linfoma de Hodgkin, sobreexpresan IL-13 y/o receptores de IL-13 (Kapp y col., 1999 *supra*; Billard y col., Eur Cytokine Netw 8:19, 1997; Skinnider y col., Blood 97:250, 2001; Oshima y col., Cell Immunol 211:37, 2001). Se ha demostrado que la neutralización de los antagonistas de la IL-13 o de AcMo anti-IL-13 inhibe la proliferación de célula H/RS de una manera dependiente de dosis (Kapp y col., 1999 *supra*; Oshima y col., 2001 *supra*). De manera similar, la administración del receptor señuelo IL-13R α 2 soluble a ratones NOD/SCID con una línea celular derivada de la enfermedad de Hodgkin implantada retrasaba la aparición y el crecimiento del tumor, y mejoraba la supervivencia, lo que demuestra que la neutralización de la IL-13 puede suprimir el crecimiento del linfoma de Hodgkin *in vitro* e *in vivo* (Trieu y col., Cancer Research 64:3271, 2004). En conjunto, estos estudios indican que la IL-13 estimula la proliferación de células H/RS de forma autocrina (Kapp, y col., 1999 *supra*; Oshima y col., Histopathology 38:368, 2001).

Por lo tanto, la neutralización de la IL-13 representa un tratamiento atractivo y eficaz para la enfermedad de Hodgkin y otros cánceres asociados a los linfocitos B al inhibir el crecimiento de células tumorales al tiempo que potencian las defensas antitumorales.

Es posible que la IL-13 desempeñe un papel en la patogénesis de la enfermedad intestinal inflamatoria (EII). La enfermedad intestinal inflamatoria incluye una serie de enfermedades clínicamente clasificadas como colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn y colitis indeterminada. Su principal manifestación es la inflamación intestinal crónica debida a una respuesta inmunitaria exagerada con un desequilibrio de la activación de los linfocitos Th1 y Th2 en la mucosa intestinal. Esto ha sido demostrado en modelos animales de la enfermedad de Crohn (Bamias y col., Gastroenterol 128:657, 2005) y de la colitis ulcerosa (Heller y col., Immunity 17:629, 2002). La neutralización de IL-13 por administración de IL-13R α 2-Fc evitaba la colitis en un modelo Th2 murino de colitis ulcerosa humana (Heller y col., 2002 *supra*). Además, la producción de IL-13 rápidamente suplanta la de IL-4 en este modelo, y la producción de IL-13 puede ser inducida por estimulación de las células NKT, lo que sugiere que el daño tisular puede ser resultado de la actividad tóxica de la IL-13 en las células del epitelio. Hay algunos datos en humanos que apoyan estos hallazgos: la frecuencia de muestras de biopsia rectal positivas para IL-13 de pacientes con colitis ulcerosa era significativamente mayor que la de los sujetos de control, inflamatoria y no inflamatoria, y se observó una tasa de expresión de IL-4 e IL-13 más alta en la colitis ulcerosa aguda que en la no aguda (Inoue y col., Am J Gastroenterol 94:2441, 1999). Además, Akido y col., caracterizaron la actividad inmunitaria en la túnica muscular a partir de segmentos intestinales de los pacientes con enfermedad de Crohn y descubrieron que la IL-4 y la IL-13 intervenían en la hipercontractilidad de las células del músculo liso intestinal a través de una vía de STAT6. Los autores concluyeron que esta vía puede contribuir a la hipercontractilidad de los músculos intestinales en la enfermedad de Crohn (Akiho y col., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 288:619, 2005). Por lo tanto, un antagonista de la IL-13 puede proporcionar un procedimiento para detener o retardar la progresión de la EII.

La psoriasis es una enfermedad crónica de la piel caracterizada por la hiperproliferación de los queratinocitos y un infiltrado celular inmunológico, que incluye linfocitos T activados, que produce diversas citocinas que pueden influir en el fenotipo de los queratinocitos epidérmicos. CDw60 es una molécula que contiene carbohidratos que es regulada positivamente en la superficie de los queratinocitos basales y *suprabasales* psoriásicos de la piel psoriásica. Se ha demostrado que la IL-4 y la IL-13 secretadas de linfocitos T derivados de lesiones psoriásicas regulan positivamente con fuerza la expresión de CDw60 en los queratinocitos (Skov y col., Am J Pathol 15:675, 1997), mientras que el interferón gamma bloqueaba la inducción de la CDw60 mediada por IL-4/IL-13 en queratinocitos cultivados (Huang y col., J Invest Dermatol 116:305, 2001). Por lo tanto, se cree que la expresión de CDw60 en los queratinocitos epidérmicos psoriásicos es inducida por lo menos en parte por la IL-13 secretada por los linfocitos T activados dentro de la lesión. Además, IL-13R α 1 e IL-4R α son expresados de manera diferente en las biopsias de piel de pacientes con y sin psoriasis (Cancino-Díaz y col., J Invest Dermatol 119:1114, 2002; Wongpiyabovorn y col., 2003 *supra*), y los experimentos *in vitro* demostraron que la IL-13 (pero no la IL-4) podría regular positivamente la expresión de IL-13R α 1 (Wongpiyabovorn y col., 2003 *supra*). Dado que la IL-13 tiene efecto sobre una variedad de tipos de células, estos estudios sugieren que el receptor de la IL-13 puede desempeñar un papel en el proceso inflamatorio temprano de la psoriasis.

La artritis psoriásica se caracteriza por una sinovitis que es mediada por citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias. El papel de la IL-13 en diversas formas de artritis ha sido objeto de un creciente interés. Spadaro y col., Ann Rheum Dis 61:174, 2002 han observado niveles significativamente más altos de IL-13 en el líquido sinovial de pacientes con artritis psoriásica y artritis reumatoide que en pacientes con osteoartritis. Además, los niveles de IL-13 en el líquido sinovial fueron significativamente más altos que en el suero en pacientes con artritis psoriásica, y la relación de IL-13 en el líquido sinovial/suero fue notablemente mayor en el grupo con artritis psoriásica que en el grupo con artritis reumatoide, lo que sugiere un posible papel de la IL-13 producida localmente en el tejido sinovial de pacientes con artritis psoriásica.

La enfermedad del injerto contra el hospedador aguda es una causa importante de morbilidad y mortalidad después de un trasplante de células madre y se relaciona directamente con el grado de incompatibilidad del antígeno leucocitario humano (HLA) entre donante y receptor. Jordan y col. identificaron por primera vez la IL-13 como una citocina Th2 típica que se produce abundantemente durante las MLR no emparentadas, no coincidentes (reacción mixta de linfocitos; un ensayo *in vitro* para afinar la selección de donante después de la tipificación HLA inicial) (Jordan y col., *J Immunol Methods* 260:1, 2002). El mismo grupo demostró posteriormente que la producción de IL-13 por los linfocitos T del donante es un factor predictivo de la enfermedad del injerto contra el hospedador aguda (aGVHD) que sigue al trasplante de células madre de un donante no emparentado (Jordan y col., *Blood* 2004; 103:717). Todos los pacientes con aGVHD grave de grado III después del trasplante de células madre tenían donantes que producían respuestas de la IL-13 muy altas antes del trasplante, lo que demuestra una conexión significativa entre los niveles de IL-13 y aGVHD y el aumento de la posibilidad de que la IL-13 pueda ser directamente responsable de parte de la patología asociada a la aGVHD. Por consiguiente, una terapia basada en el bloqueo específico de la IL-13 puede resultar útil para el tratamiento de la aGVHD después del trasplante de células madre.

La nefropatía diabética es una de las principales causas de enfermedad renal terminal en el mundo occidental. Aunque la incidencia de la nefropatía debida a la diabetes de tipo 1 está disminuyendo, la diabetes mellitus de tipo 2 es hoy en día la causa única más común de insuficiencia renal en los EE.UU., Japón y Europa. Además, este grupo de pacientes tiene un pronóstico muy pobre en cuanto a la diálisis de mantenimiento debido a una mortalidad extremadamente alta causada por eventos cardiovasculares. Ahora está cada vez más claro que los cambios hemodinámicos, metabólicos y estructurales están entrelazados, y se han identificado diversas enzimas, factores de transcripción y factores de crecimiento que desempeñan un papel en la patogénesis de esta enfermedad. En concreto, el TGF- β es importante en el desarrollo de la hipertrofia renal y la acumulación de los componentes de la matriz extracelular, y se considera la citocina fundamental en la mediación de la formación de colágeno en el riñón (Cooper, *Diabetologia* 44:1957, 2001; Wolf, *Eur J Clin Invest* 34 (12):785, 2004). En la nefropatía diabética experimental y humana la bioactividad de TGF-1 está aumentada y la administración de anticuerpos TGF- β 1 a un ratón diabético condujo a la mejora de la función renal y a la reducción de la acumulación de matriz extracelular. Recientemente se demostró que la IL-13, en un modelo de ratón transgénico de fibrosis pulmonar, produce sus efectos, por lo menos en parte, regulando la producción y la activación de la deposición de TGF- β 1 y colágeno (Lee y col., *J. Exp. Med.* 194:809, 2001; Zhu y col., 1999 *supra*), estableciendo de ese modo una conexión funcional directa entre la IL-13 y TGF- β . Por consiguiente, puede preverse un papel similar para la IL-13 en la regulación de la actividad de TGF- β 1 en el riñón diabético y las intervenciones dirigidas a IL-13 podrían tener potencialmente un papel en la gestión de la nefropatía diabética.

La fibrosis pulmonar es una afección de cicatrización inadecuada y perjudicial de los pulmones, que conduce a la discapacidad y con frecuencia a la muerte. El término abarca una variedad de afecciones diferentes con distintas etiologías, patologías y respuestas al tratamiento. En algunos casos la causa de la fibrosis está identificada. Las causas incluyen: material profibrótico inhalado tal como amianto o silicio, o polvo de metales duros; material orgánico inhalado para el que el paciente tiene una respuesta inmunológica idiosincrásica que conduce a la fibrosis (por ejemplo, el pulmón de granjero), fármacos, como nitrofurantoína, amiodarona y metotrexato; y una asociación con una enfermedad inflamatoria sistémica, tal como la esclerosis sistémica o la artritis reumatoide.

Sin embargo, en muchos casos la causa o la afección subyacente no está identificada. A muchos de estos pacientes se les diagnostica fibrosis pulmonar idiopática (FPI). Esta es una afección relativamente rara (prevalencia 20/100.000). El diagnóstico se basa en la ausencia de una causa identificada junto con determinadas características radiológicas e histológicas, especialmente la ausencia de hallazgos en la TC o en una biopsia de pulmón. La enfermedad se observa habitualmente en pacientes de edad avanzada (> 50) y, a menudo sigue un curso inexorable de deterioro pulmonar progresivo que conduce a la muerte, con la mediana de supervivencia citada como 2 a 5 años. Además, los pacientes experimentan una desagradable falta de aire que avanza durante meses o años. Esta restringe inicialmente la actividad física, pero en la fase terminal, que puede durar varios meses, el paciente se encuentra sin aliento incluso en reposo y depende además del oxígeno.

En la actualidad no existe ningún tratamiento satisfactorio para esta enfermedad. Por lo general, el tratamiento actual adopta la forma de corticosteroides e inmunosupresores tales como azatioprina. Sin embargo, los corticosteroides pueden ser ineficaces en muchos de los pacientes y sus efectos secundarios pueden empeorar la situación. Existen muchos tratamientos potenciales bajo investigación, que incluyen el interferón gamma, que ha mostrado tendencia a mejorar la supervivencia en un gran estudio reciente, y la perfenidona.

Existen pruebas de que la IL-13 y las citocinas asociadas con el fenotipo Th2 están implicadas en el proceso de fibrosis en la reparación de tejidos (Wynn, *Nat. Rev. Immunol.* 4:583-594, 2004; Jakubzick y col., *Am. J. Pathol.* 164(6):1989-2001, 2004; Jakubzick y col., *Immunol. Res.* 30(3):339-349, 2004; Jakubzick y col., *J. Clin. Pathol.* 57:477-486, 2004). La IL-13 y la IL-4 han sido implicadas en una variedad de afecciones fibróticas. La fibrosis hepática inducida por *Schistosoma* parece ser dependiente de IL-13 y existen pruebas limitadas de que la IL-13 esté implicada en la patogénesis de la esclerodermia (Hasegawa y col., *J. Rheumatol.* 24:328-332, 1997; Riccieri y col., *Clin. Rheumatol.* 22:102-106, 2003).

En cuanto a la fibrosis pulmonar, los estudios *in vitro* han demostrado que la IL-13 promueve un fenotipo fibrogénico.

Los estudios en animales han mostrado niveles elevados de expresión de IL-13 en modelos de fibrosis inducida artificialmente, y que la fibrosis puede reducirse por eliminación de la IL-13.

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

Existen pruebas de que la IL-13 actúa sobre los fibroblastos, tanto para promover la producción de colágeno como para inhibir su degradación, favoreciendo así un fenotipo fibrótico. Los fibroblastos de la piel poseen receptores de IL-13 y la exposición de fibroblastos de piel cultivados a IL-13 conduce a la regulación positiva de la generación de colágeno (Oriente y col., J. Pharmacol. Exp. Ther. 292:988-994, 2000). La IL-4 también tiene un efecto similar, pero más transitorio. Una línea celular de fibroblastos de pulmón humano (ICIG7) expresa el receptor de la IL-4 de tipo II (Jinnin y col., J. Biol. Chem 279:41783-41791, 2004). La exposición de estas células a IL-13 promueve la secreción de una variedad de mediadores profibróticos y de la inflamación: GM-CSF, G-CSF, integrina beta1 de VCAM (Doucet y col., Int. Immunol. 10(10):1421-1433, 1998).

La IL-13 inhibe la producción de proteínas metaloproteinasas de la matriz 1 y 3 inducidas por IL-1 por los fibroblastos de la piel que tienden a reducir la degradación de la matriz EC (Oriente y col., 2000, *supra*). La IL-13 actúa de forma sinérgica con el TGF- β en fibroblastos humanos obtenidos por biopsia de las vías respiratorias asmáticas para promover la expresión del inhibidor tisular de la metaloproteinasa 1 (TIMP-1). La degradación de la matriz extracelular es efectuada por las metaloproteinasas de la matriz, que son inhibidas por el TIMP-1. Esta acción de la IL-13 tiende así a reducir la degradación de la matriz (Zhou y col., Am. J. Physiol. Cell Physiol. 288:C435-C442, 2005).

La sobreexpresión de IL-13 en ratones transgénicos conduce a la fibrosis subepitelial, la hipertrofia de las células epiteliales, la hiperplasia de células calciformes, la deposición de cristales (quitinasa ácida de mamíferos), la hiperreactividad de las vías respiratorias, la fibrosis intersticial, la hipertrofia de células de tipo 2 y la acumulación de surfactante (Zhu y col., 1999 *supra*).

Las diferentes cepas de ratones tienen diferentes susceptibilidades a la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. Los ratones C57B1/6J, que son susceptibles, presentan una rápida regulación positiva de la IL-13, IL-13R α e IL-4 (así como TGF β , TNFR α y receptores de la IL-1) en respuesta a la bleomicina. Los ratones BALB/c, que no son susceptibles, no muestran regulación positiva de la IL-13.

Belperio y col., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 27:419-427, 2002, estudiaron la expresión y el papel de la IL-13, la IL-4 y la quimiocina CC C10 en un modelo de ratón de fibrosis inducida por bleomicina. Los niveles de IL-13 y de IL-4 en tejido pulmonar aumentaron en respuesta a la bleomicina. La neutralización previa de la IL-13 utilizando anticuerpos policlonales anti-IL-13 redujo de manera significativa la fibrosis pulmonar en respuesta a la bleomicina según la evaluación de los niveles de hidroxiprolina en pulmón. A pesar del aumento de la expresión de IL-4 en el mismo modelo, la neutralización de la IL-4 no tuvo ningún efecto sobre la fibrosis pulmonar.

En otro modelo de fibrosis pulmonar aguda inducida por FITC en el ratón BALB/c, la ausencia de IL-13 (en los knock out), pero no de IL-4, confería protección contra la fibrosis pulmonar. No existe protección añadida de knock out de IL-4 en los knock out para IL-13 (Kolodnick y col., J. Immunol. 172:4068-4076, 2004). El efecto protector de la ausencia de IL-13 no se debe a una diferencia en el reclutamiento de células al interior del pulmón en todos los knock out y los números de células totales BALB/c reclutados son similares, por lo que el componente inflamatorio inicial parece ser el no afectado. El reclutamiento de eosinófilos es menor en los knock out para IL-4 y para IL-13 en comparación con los ratones BALB/c, pero puesto que los IL-4^{-/-} no estaban protegidos contra la fibrosis esto no puede explicar la diferencia de la fibrosis. Tal vez sorprendentemente, no hubo diferencias en los niveles de citocinas entre IL-13^{+/+} y ^{-/-}, incluyendo para IL-10, MCP-1, interferón gamma, TGF- β 1. Además, se aisló el mismo número de fibroblastos a partir de pulmones de animales diferentes después de la FITC, pero en los ratones IL-13^{-/-} la producción de colágeno se redujo. Esto indica que la pérdida de IL-13 no está simplemente evitando la respuesta inflamatoria, sino que más bien está teniendo un papel antifibrótico más específico. Se ha sugerido que la IL-13 podría ejercer su efecto fibrótico a través de TGF- β 1 (Lee y col., 2001 *supra*). Sin embargo, en este modelo con FITC, la expresión de TGF- β 1 no se redujo en ratones knock out para IL-13.

Puede esperarse que la interleucina-4 ejerza un efecto similar al de la IL-13 ya que ambas actúan a través del mismo receptor. IL-4 está regulada positivamente de manera significativa en los pulmones de ratones con fibrosis pulmonar inducida por bleomicina (Gharaee-Kermani y col., Cytokine 2001 15:138-147). Sin embargo, al comparar la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones C57BL6/J que sobreexpresan IL-4, en los knock out para IL-4 y en los naturales, Izbicki y col., Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol 283(5):L1110-L1116, 2002, no se encontraron pruebas de que la IL-4 estuviera implicada en la fibrosis pulmonar. La fibrosis no se encontraba reducida en los knock out para IL-4, y los ratones que sobreexpresaban IL-4 presentaban niveles aumentados de fibrosis.

Los niveles de citocinas en BAL de IL-13 están significativamente elevados en pacientes con una variedad de formas de fibrosis pulmonar, aunque con una considerable variabilidad. La expresión de la IL-13 está aumentada positivamente de manera significativa en los macrófagos alveolares obtenidos de pacientes con fibrosis pulmonar.

La evidencia clínica más sólida proviene de la investigación en la Universidad de Michigan. Jakubzick y sus colegas han estudiado la expresión génica de IL-13 y de IL-4 y sus receptores en biopsias pulmonares quirúrgicas de pacientes con fibrosis pulmonar. La expresión génica de IL-13 es marcadamente superior en las muestras de pulmón afectadas por FPI que en los pulmones de pacientes normales o con otras afecciones pulmonares fibróticas. Los fibroblastos cultivados de pacientes con FPI/NIU muestran una expresión aumentada del receptor de la IL-13 y de la IL-4, en comparación con el tejido y los fibroblastos obtenidos de biopsias de pacientes con pulmones normales o con otras formas de fibrosis pulmonar. En concreto, los focos fibroblásticos, que son presumiblemente el epicentro de actividad de la enfermedad, se tiñen con especial intensidad para estos receptores (Jakubzick y col., J. Immunol 171:2684-2693, 2003; Jakubzick y col., Am. J. Pathol. 162:1475-1486, 2003; Jakubzick y col., 2004 *supra*; Jakubzick y col., 2004 *supra*; Jakubzick y col., 2004 *supra*).

Existen pruebas *in vitro* fiables de que las citocinas Th2 en general, y la IL-13 en concreto, promueven un fenotipo profibrótico. Se ha demostrado en por lo menos dos modelos animales que puede reducirse la fibrosis químicamente inducida por eliminación de la IL-13 (ya sea en knock out para el gen o mediante anticuerpos anti-IL-13). Algunas pruebas indican que la IL-13 es más importante en la estimulación de la fibrosis pulmonar que la IL-4. La evidencia clínica para el papel de la IL-13 en la fibrosis pulmonar sugiere que la IL-13 y sus receptores no se encuentran regulados negativamente en los pulmones de pacientes con FPI.

Un cuerpo de datos creciente sugiere un papel importante para las terapias basadas en antagonistas de la IL-13 para el tratamiento de una variedad de afecciones fibróticas, que incluyen la fibrosis hepática inducida por esquistosomiasis, y diversas formas de fibrosis pulmonar (por ejemplo, la FPI, la esclerodermia).

Los experimentos en los que se inhibieron la IL-4 y la IL-13 identificaron de forma independiente la IL-13 como la citocina efectora dominante de la fibrosis en varios modelos (Chiaramonte y col., J. Clin. Invest. 104:777-785, 1999; Blease y col., 2001 *supra*; Kumar y col., Clin. Exp. Allergy 32:1104, 2002). En la esquistosomiasis, aunque la respuesta inflamatoria inducida por el huevo no se vio afectada por el bloqueo de la IL-13, la deposición de colágeno disminuyó en más del 85% en animales con infección crónica (Chiaramonte y col., 1999 *supra*; Chiaramonte y col., Hepatology 34:273, 2001) a pesar de la producción continua y no disminuida de IL-4.

Terapia génica.

Los anticuerpos anti-hIL-13R α 1 de la divulgación también pueden administrarse a un sujeto en un procedimiento de terapia génica. En un procedimiento de terapia génica, las células de un sujeto se transforman con ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la invención. Los sujetos que albergan los ácidos nucleicos producirán a continuación las moléculas de anticuerpos endógenamente. Previamente, Alvarez, y col., Clinical Cancer Research 6:3081-3087, 2000, introdujeron anticuerpos anti-ErbB2 monocatenarios en los sujetos utilizando un procedimiento de terapia génica. Los procedimientos desvelados por Alvarez, y col., pueden adaptarse fácilmente para la introducción en un sujeto de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo anti-hIL-13R α 1 de la invención.

Aunque pueden introducirse en un sujeto ácidos nucleicos que codifican cualquier molécula de anticuerpo o polipéptido de la invención, en las formas de realización concretas, la molécula de anticuerpo es un anticuerpo monocatenario humano.

Los ácidos nucleicos pueden introducirse en las células de un sujeto por cualquier medio conocido en la técnica. En las formas de realización concretas, los ácidos nucleicos se introducen como parte de un vector viral. Algunos ejemplos de virus específicos a partir de los cuales pueden derivarse los vectores son los lentivirus, virus del herpes, adenovirus, virus adenoasociados, virus vaccinia, baculovirus, alfavirus, virus de la gripe, y otros virus recombinantes con tropismo celular deseable.

Diversas empresas producen comercialmente vectores virales, que incluyen, pero no se limitan en modo alguno a, AVIGEN, Inc. (Alameda, CA; vectores AAV), Cell Genesys (Foster City, CA; vectores retrovirales, adenovirales, lentivirales y vectores AAV), CLONTECH (vectores retrovirales y baculovirales), Genovo, Inc. (Sharon Hill, PA; vectores AAV y adenovirales), GENVEC (vectores adenovirales), IntroGene (Leiden, Países Bajos; vectores adenovirales), Molecular Medicine (vectores retrovirus, adenovirales, AAV, y vectores virales del herpes), Norgen (vectores adenovirales), Oxford BioMedica (Oxford, Reino Unido; vectores lentivirales), y Transgene (Estrasburgo, Francia; vectores adenovirales, vaccinia, retrovirales y lentivirales).

Los procedimientos para construir y utilizar vectores virales son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Miller y col., BioTechniques 7:980-990, 1992). En las formas de realización específicas, los vectores virales son defectuosos para la replicación, es decir, son incapaces de replicarse de manera autónoma, y por lo tanto no son infecciosos en la célula diana. Preferentemente, el virus de replicación defectuosa puede ser un virus mínimo, es decir, que conserva solamente las secuencias de su genoma que son necesarias para la encapsidación del genoma para producir partículas virales. También pueden utilizarse virus defectuosos, que carecen totalmente o casi totalmente de genes virales. El uso de vectores virales defectuosos hace posible su transferencia a las células en una zona específica localizada, sin preocuparse de que el vector pueda infectar otras células. Por lo tanto, puede marcarse específicamente un tejido concreto.

Ejemplos de vectores que comprenden secuencias de ADN de virus atenuados o defectuosos incluyen, pero no se

limitan a, un vector del virus del herpes defectuoso (Kanno y col., *Cancer Gen. Ther.* 6:147-154, 1999; Kaplitt y col., *J. Neurosci. Meth.* 71:125-132, 1997 y Kaplitt y col., *J. Neuro Onc.* 19:137-147, 1994).

5 Los adenovirus son virus de ADN eucariótico que pueden ser modificados para suministrar de manera eficaz un ácido nucleico de la invención a una variedad de tipos de células. Los vectores de adenovirus atenuados, tales como el vector descrito por Strafford-Perricaudet y col., *J. Clin. Invest.* 90:626-630, 1992, resultan deseables en algunos casos. Se han descrito diversos vectores adenovirales mínimos y adenovirus de replicación defectuosa (WO94/26914, WO94/28938, WO94/28152, WO94/12649, WO95/02697 y WO96/22378). Los adenovirus recombinantes de replicación defectuosa de acuerdo con la invención pueden prepararse mediante cualquier técnica conocida para un experto en la materia (Levrero y col., *Gene* 101:195, 1991; EP 185573; Graham, *EMBO J.* 3:2917, 1984; Graham y col., *J. Gen. Virol.* 36:59, 1977).

15 Los virus adenoasociados (AAV) son virus de ADN de tamaño relativamente pequeño que pueden integrarse, de manera estable y específica del sitio, en el genoma de las células que infectan. Son capaces de infectar un amplio espectro de células sin inducir ningún efecto sobre el crecimiento, la morfología o la diferenciación celular, y no parecen estar implicados en patologías humanas. Se ha descrito el uso de vectores derivados de los AAV para transferir genes *in vitro* e *in vivo* (véase Daly, y col., *Gene Ther.* 8:1343-1346, 2001, Larson y col., *Adv. Exp. Med. Bio.* 489:45-57, 2001, los documentos WO 91/18088 y WO 93/09239; las patentes de EE.UU. N° 4.797.368 y 5.139.941 y el documento EP 488528B1).

20 En otra forma de realización, el gen puede introducirse en un vector retroviral, por ejemplo, como se describe en las patentes de EE.UU. N° 5.399.346, 4.650.764, 4.980.289 y 5.124.263; Mann y col., *Cell* 33:153, 1983; Markowitz y col., *J. Virol.*, 62:1120, 1988; los documentos EP 453242 y EP 178220. Los retrovirus son virus de integración que infectan células en división.

25 Puede utilizarse vectores lentivirales como agentes para el suministro directo y la expresión sostenida de ácidos nucleicos que codifican una molécula de anticuerpo de la invención en varios tipos de tejidos, que incluyen cerebro, retina, músculo, hígado y sangre. Los vectores pueden transducir de manera eficaz células en división y que no están en división en estos tejidos, y mantener la expresión a largo plazo de la molécula de anticuerpo. Para una revisión, véanse Zufferey y col., *J. Virol.* 72:9873-80, 1998 y Kafri y col., *Curr. Opin. Mol. Ther.* 3:316-326, 2001. Las líneas celulares de empaquetamiento lentivirales están disponibles y son conocidas generalmente en la técnica. Facilitan la producción de altos títulos de vectores lentivirales para la terapia génica. Un ejemplo es una línea celular de empaquetamiento de lentivirus del pseudotipo VSV-G inducible por tetraciclina que puede generar partículas virales con títulos superiores a 10^6 UI/ml durante por lo menos 3 a 4 días; véase Kafri y col., *J. Virol.* 73:576-584, 1999. El vector producido por la línea celular inducible puede concentrarse según resulte necesario para una transducción eficaz de células que no están en división *in vitro* e *in vivo*.

35 El virus Sindbis de miembro del género alfavirus y ha sido estudiado ampliamente desde su descubrimiento en diversas partes del mundo a partir de 1953. La transducción de genes en base a alfavirus, especialmente el virus Sindbis, ha sido bien estudiado *in vitro* (*Microbiol. Rev.*, 58:491-562, 1994; Bredenbeek y col., *J. Virol.*, 67:6439-6446, 1993; Ijima y col., *Int. J. Cancer* 80:110-118, 1999 y Sawai y col., *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 248:315-323, 1998). Muchas de las propiedades de los vectores alfavirales los convierten en una alternativa deseable a otros sistemas de vectores derivados de virus en desarrollo, que incluyen la obtención rápida por ingeniería genética de construcciones de expresión, la producción de altos títulos de reservas de partículas infecciosas, la infección de células que no se están dividiendo, y los altos niveles de expresión (Strauss y col., 1994 *supra*). Se ha descrito el uso de virus Sindbis para la terapia génica. (Wahlfors y col., *Gene Ther.* 7:472-480, 2000 y Lundstrom, *J. Recep. Sig. Transduct. Res.* 19(1-4):673-686, 1999).

45 En otra forma de realización, puede introducirse en las células un vector por lipofección o con otros agentes que facilitan la transfección (péptidos, polímeros, etc.). Pueden utilizarse lípidos catiónicos sintéticos para preparar liposomas para la transfección *in vivo* e *in vitro* de un gen que codifica un marcador (Feigner y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417, 1987 y Wang y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7851-7855, 1987). En los documentos WO 95/18863 y WO 96/17823, y en la patente de EE.UU. N°5.459.127 se describen composiciones y compuestos de lípidos útiles para la transferencia de ácidos nucleicos.

50 También es posible introducir el vector *in vivo* como un plásmido de ADN desnudo. Los vectores de ADN desnudo para la terapia génica pueden introducirse en las células hospedadoras deseadas mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, precipitación con fosfato cálcico, el uso de una pistola de genes, o el uso de un transportador de vectores de ADN (véase, por ejemplo, Wilson y col., *J. Biol. Chem.* 267:963-967, 1992; Williams y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2726-2730, 1991). También pueden utilizarse procedimientos de suministro de ADN mediado por receptores (Wu y col., *J. Biol. Chem.* 263:14621-14624, 1988). Las patentes de EE.UU. N° 5.580.859 y 5.589.466 desvelan el suministro de secuencias de ADN exógeno, libres de agentes que facilitan la transfección, en un mamífero. Recientemente se ha descrito una técnica de transferencia de ADN *in vivo* de alta eficiencia a voltaje relativamente bajo, denominada electrotransferencia (Vilquin y col., *Gene Ther.* 8:1097, 2001; Payen y col., *Exp. Hematol.* 29:295-300, 2001; Mir, *Bioelectrochemistry* 53:1-10, 2001; documentos WO 99/01157, WO 99/01158 y WO 99/01175).

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para tales procedimientos de terapia génica y que incluyen los ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo anti-hIL-13R α 1 de la invención se encuentran dentro de la divulgación.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitativos.

5 **Ejemplo 1: Producción y purificación de una proteína recombinante basada en la región extracelular de IL-13R α 1 humano**

Se transfectó, en células CHO, un vector de expresión pEFBOS-S-FLAG \oplus que incorporaba un ADNc que codifica la mayor parte de la región extracelular (ECR) de IL-13R α 1 humano (es decir, los aminoácidos número 3 a 317 de la SEC ID NO: 1) con una fusión FLAG \oplus -marcador y una secuencia señal de IL-3, para una expresión estable
10 utilizando procedimientos convencionales. Se purificó la proteína de fusión marcada con FLAG \oplus en el extremo N-terminal que incluía la mayor parte de la región extracelular de IL-13R α 1 humano (denominada "hIL-13R α 1.ECR") (SEC ID NO: 28) a partir de medios de cultivo acondicionados por el clon de células CHO. La proteína purificada se concentró y se desaló posteriormente en solución salina tamponada con fosfato (PBS), TweenTM 20 al 0,02% v/v, seguido de esterilización mediante filtración. La recuperación típica fue de 0,4 mg de proteína por litro de medio
15 acondicionado. La proteína se almacenó a -80°C hasta que fuera necesario.

Ejemplo 2: Generación de líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales humanos anti-IL-13R α 1 humano

Inmunización de ratones transgénicos. Se inmunizaron ratones transgénicos machos y hembras de las cepas HCo7, HCo12 y HCo7xHCo12 (ratones HUMABTM, Medarex, EE.UU.) con hIL-13R α 1.ECR del Ejemplo 1. Para la primera
20 inmunización, se emulsionaron 20-50 μ g de hIL-13R α 1.ECR en adyuvante completo de Freund (CFA) y se administró por vía intraperitoneal (i.p.). Para un mínimo de dos y un máximo de tres inmunizaciones i.p. posteriores, se emulsionaron 20-50 μ g de hIL-13R α 1.ECR en adyuvante incompleto de Freund (IFA). Después de la segunda o tercera inmunización con hIL-13R α 1.ECR en IFA, se tomaron muestras de suero (plexo retro-orbital) y se sometieron a ensayo para la determinación de anticuerpos humanos contra hIL-13R α 1.ECR mediante ELISA (véase más adelante). Para la generación de hibridomas se seleccionaron ratones de alta respuesta (títulos séricos generalmente > 1:3.200). En algunos casos, los animales no utilizados para la generación de hibridomas en este momento recibieron inmunizaciones i.p. adicionales con 20-50 μ g de hIL-13R α 1.ECR en PBS. El suero de estos animales fue sometido a ensayo nuevamente para la determinación de anticuerpos humanos contra hIL-13R α 1.ECR mediante ELISA y los ratones de alta respuesta se utilizaron para la generación de hibridomas. Se reforzó a los
25 ratones seleccionados para la generación de hibridomas por vía intravenosa con 20-50 μ g de hIL-13R α 1.ECR 3 a 4 días antes de la fusión de células de bazo.

ELISA específico de antígeno. Se evaluó el líquido sobrenadante de los cultivos de hibridomas (SNF) o el suero de ratón para la determinación de los AcMo capaces de unirse al hIL-13R α 1.ECR unido a la placa utilizando un formato de ELISA convencional que incluía el recubrimiento de placas MAXISORPTM de 96 pocillos de fondo plano (NUNC, Invitro Technologies, #439454) con 50 μ l de una solución que contenía 2,5 μ g/ml de hIL-13R α 1.ECR diluido en PBS, durante toda la noche a 4°C. Después de lavarse dos veces con PBS, se bloquearon las placas con leche descremada al 2% p/v en PBS (tampón de bloqueo, 200 μ l/pocillo) durante 1 hora a 37°C y posteriormente se lavaron dos veces con PBS que contenía TweenTM 20 al 0,1% v/v (tampón de lavado). Se añadieron cincuenta μ l de SNF de hibridoma de ensayo o suero de ratón por pocillo y se incuban las placas a temperatura ambiente durante 1
35 hora. Se lavaron las placas tres veces. Los AcMo humanos unidos se detectaron utilizando un reactivo secundario anti-IgG humana conjugada con HRP diluido 1:1.000 en PBS que contenía leche en polvo desnatada al 1% p/v y TweenTM 20 al 0,1% v/v (50 μ l/pocillo, 1 hora a temperatura ambiente). Se lavaron las placas tres veces, se desarrollaron con sustrato TMB, y se leyeron a OD 450 nm.

Generación de hibridomas. Se sacrificaron los ratones de alta respuesta seleccionados y se recogieron el bazo y los ganglios linfáticos pertinentes. La fusión de células de los ganglios linfáticos y del bazo con la pareja de fusión SP2/O y la posterior selección de hibridomas con HAT (hipoxantina/aminopterina/timidina) (GIBCO, #21060-017) se realizó de acuerdo con los procedimientos convencionales (Antibodies: A Laboratory Manual: Harlow y Lane. Cold Spring Harbor Laboratory Press). En resumen, se preparó medio para el cultivo de células después de haberse completado la fusión. El medio fue medio libre de suero para el cultivo de hibridomas (HSFM) (GIBCO-BRL, #12045-084) con SFV de IgG ultra baja (SFB) al 5% (GIBCO-BRL, #16250-078), GLUTAMAXTM-1 2 mM (GIBCO-BRL, #35050-061), 50 U/50 μ g/ml de penicilina/estreptomicina (GIBCO-BRL, #15070-063) y HAT 1x. Todos los medios se calentaron a 37°C. Se recogieron las células SP2/O y se realizó un recuento de células viables. Las células útiles estaban sanas, se dividían activamente y estaban en fase logarítmica. A este respecto, la viabilidad fue > 95%. Se cultivaron las células SP2/O en HSFM/SFV de IgG ultra baja al 5% antes de la fusión, y se fraccionaron
45 1:2 ó 1:3 el día antes de la fusión.

El día de la fusión, se sacrificaron los animales y se extrajeron inmediatamente los bazos (y, de ser necesario, los ganglios linfáticos) y se colocaron en medio estéril (modificación Dulbecco del medio de Eagles (GIBCO-BRL, #11995-073) o DME) en hielo.

Se preparó una única suspensión de células a partir del bazo, y se lavó dos veces (1.800 rpm durante 7 minutos) en DME, siendo el segundo lavado en caliente. Posteriormente, las células SP2/O se lavaron tres veces (1.500 rpm, 7 minutos) con DME caliente para eliminar todos los restos de suero.

5 Las células SP2/O (10^8) para un bazo de ratón se utilizaron en 2 fusiones separadas. Las células SP2/O y las células de bazo se agruparon en el mismo tubo y se centrifugaron a 2.100 rpm (400 g) durante 5 minutos. Se eliminó todo el DME, dejando sólo un sedimento celular combinado.

10 Se colocaron las células en un bloque de calentamiento a 37°C y se añadió, gota a gota, 1 ml de PEG caliente al sedimento celular durante 1 minuto mientras se agitaba el precipitado suavemente con la pipeta. El sedimento se agitó suavemente durante otro minuto y se añadió, gota a gota, 1 ml de DME caliente durante 1 minuto con agitación. Se añadió otro ml más de DME durante 1 minuto seguido de 20 ml de DME durante 5 minutos, con agitación. Se centrifugaron las células durante 5 minutos a 1.500 rpm y se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron suavemente en medio de cultivo y se sembraron a razón de 0,2 ml por pocillo en medio HAT. Las placas se alimentaron eliminando aproximadamente 0,1 ml de cada pocillo y sustituyéndolos con medio HAT fresco cada 3 ó 4 días.

15 Se examinó el crecimiento de los hibridomas a los 7-10 días, con cribado a los 10-14 días después de la fusión. Para realizar el cribado para determinar la producción de anticuerpo, se eliminaron 100 µl de sobrenadante de cada pocillo para el ensayo. Los positivos se transfirieron a pocillos de 1 ml ó 2 ml y, a continuación, se expandieron gradualmente a placas de 6 pocillos. Los hibridomas no eran clonales en esta etapa. Después de 14 días en medio HAT, los hibridomas se cultivaron en HT (GIBCO-BRL, #11067-030) (HSFM, SFV de IgG ultra baja al 5%, 10 ng/ml de rIL-6 (R&D Systems, #206-IL-050) y HT) durante aproximadamente 2 semanas, en esa ocasión sin HT.

20 *Cultivo de hibridomas.* Los hibridomas que dieron positivo en los cribados de ELISA de confirmación primarios y de seguimiento se clonaron por dilución límite. Los pocillos de dilución límite que contenían colonias individuales se cribaron mediante ELISA y se seleccionó un pocillo positivo para la expansión y las rondas adicionales de clonación por dilución límite hasta que el 100% de los pocillos dieron positivo.

25 Para la producción de líquido sobrenadante (SNF) para la purificación de anticuerpos se expandieron los hibridomas en matraces T de 175 cm² (FALCON, #3028) o botellas de cultivo rotatorias (900 cm²) (Corning, #430849). Los medios utilizados para la generación de los hibridomas SNF fue HSFM complementado con SFV de IgG ultra baja al 5%, glutamina 2 mM y 50 U/50 µg/ml de penicilina/estreptomicina. Se dejaron crecer los hibridomas hasta la confluencia y se recogieron los medios por centrifugación aproximadamente 5-10 días más tarde, cuando > 90% de las células estaban muertas. Todos los medios acondicionados se filtraron utilizando un aparato de filtración STERICUP™ (MILLIPORE, #SCGPU11RE) (0,45 µm) antes de la purificación del AcMo.

30 *Producción de los AcMo purificados.* Los anticuerpos monoclonales se purificaron a partir de SNF utilizando una estrategia convencional basada en la cromatografía de afinidad con proteína A.

35 **Ejemplo 3: Identificación de los anticuerpos monoclonales anti-IL-13Rα1 humano que se unen al dominio 3 de IL-13Rα1 humano.**

Se prevé que la región extracelular de IL-13Rα1 se componga de 3 dominios globulares de fibronectina de tipo III, cada uno de aproximadamente 100 aminoácidos de longitud (Arima y col., *supra*). El dominio de fibronectina de tipo III amino-terminal (denominado en el presente documento dominio 1 o D1) es seguido de otros dos dominios de fibronectina de tipo III (denominados en el presente documento dominio 2 y dominio 3, o D2 y D3 respectivamente) que comprenden un módulo de homología del receptor de citocina (Wells y de Vos, 1996 *supra*). Para predecir los límites de secuencia de cada uno de estos dominios de fibronectina de tipo III, se alinearon las secuencias maduras de las regiones extracelulares de hIL-13Rα1 y hIL-4Rα. La región extracelular de aproximadamente 200 restos de hIL-4Rα se compone de un módulo de homología del receptor de citocina, correspondiente a D2 y D3 de IL-13Rα1, pero no contiene ningún dominio cadena arriba correspondiente a D1. Por consiguiente, se tomó el primer resto de hIL-4Rα maduro para definir el límite entre D1 y D2 en la secuencia de hIL-13Rα1 alineada. A continuación, se utilizó el límite entre los dos dominios de fibronectina de tipo III en IL-4Rα, como se deduce a partir de la estructura cristalina (Hage et. Al, 1999 *supra*), para definir el límite entre D2 y D3 en la secuencia de IL-13Rα1 alineada. Por consiguiente, D1 de ECR de hIL-13Rα1 corresponde a los aminoácidos 1 a 100 de la SEC ID NO: 1, D2 a los aminoácidos 101 a 200, y D3 a los aminoácidos 201 a 317.

50 Se construyeron las construcciones codificando (i) toda la región extracelular de IL-13Rα1 (es decir, D1-D3), (ii) D2-D3, (iii) D1, (iv) D2 y (v) D3; en cada caso el fragmento pertinente de la región extracelular se fusionó a través del extremo C-terminal a un fragmento de la proteína del gen 3 (aminoácidos 249-406) generalmente de acuerdo con el procedimiento descrito por Lowman y col., Biochem, 30:10832-8, 1991. A continuación, estos fragmentos diferentes de la región extracelular de hIL-13Rα1 se presentaron en la superficie del bacteriófago M13 y se sometieron a ensayo para determinar su capacidad de unión a los AcMo.

55 Las preparaciones de fagos que presentaban cada una de estas 5 construcciones se sometieron a ensayo mediante ELISA para determinar la unión a los AcMo inmovilizados en placas de 96 pocillos. En resumen, los AcMo se adsorbieron pasivamente sobre placas MAXISORP™ de 96 pocillos (NUNC) después de la incubación durante toda

la noche de 100 µl/pocillo de 10 µg/ml de AcMo anti-IL-13Rα1 en PBS. Se descartaron las soluciones de recubrimiento, se bloquearon las placas por incubación con una solución de leche descremada en polvo durante 1 hora a temperatura ambiente (5% p/v en PBS; tampón de bloqueo), y a continuación se lavaron con PBS que contenía Tween™ 20 al 0,1% v/v (tampón de lavado). Los sobrenadantes de *E. coli*, que contenían fagos que presentaban fragmentos de IL-13Rα1, se diluyeron con tampón de bloqueo (0,25 volúmenes), y se añadieron a pocillos recubiertos con AcMo (100 µl). Después de la incubación a temperatura ambiente durante 2 horas, se lavaron las placas 3 veces, y el fago unido se marcó con anticuerpo policlonal IgG anti M13 conjugado con HRP (AMERSHAM Biosciences), y se detectó añadiendo sustrato TMB (KPL Inc.). El desarrollo de color del TMB se interrumpió añadiendo ácido sulfúrico acuoso 2 M, y se midió la absorbancia a 450 nm.

Resultados. A partir de la agrupación de anticuerpos que proporcionaban resultados positivos en el ELISA, se seleccionaron los AcMo que presentaban una fuerte unión a las preparaciones de fagos que contenían D3 (es decir, (i), (ii) y (v) anteriormente indicados). El anticuerpo murino 1D9 que se presenta en el documento WO 03/080675 y depositado en la ECACC bajo el número de referencia de depósito: 03032101 sólo se unía a preparaciones de fagos que contenían D2 al igual que algunos otros anticuerpos de la agrupación obtenida a partir de la utilización de los ratones transgénicos, que incluye un anticuerpo identificado como 8B4. Los AcMo seleccionados que presentaban una fuerte unión a D3 incluían los anticuerpos identificados como 4B5, 4E2, 7D12, 8B11 y 15F4. Los hibridomas que expresan anticuerpos se denominan con los mismos nombres que los anticuerpos, o cuando se ha hecho un depósito con la ATCC mediante la designación de depósito pertinente. En la Tabla 3 se enumeran los hibridomas depositados.

TABLA 3

AcMo	Designación de Depósito de la ATCC para el hibridoma
4B5	PTA-6931
8B11	PTA-6936
15F4	PTA-6935

Ejemplo 4: Análisis de la afinidad de los anticuerpos monoclonales anti-IL-13Rα1 humano por IL-13Rα1 humano

Estudios basados en BIACORE™. Se inmovilizó IL-13Rα1.ECR humano (40 µg/ml en acetato sódico 20 mM, pH 4,2) del Ejemplo 1 sobre una microplaca detectora (CM5, Biosensor, Suecia) utilizando la química NHS/EDC convencional de acuerdo con las instrucciones del fabricante a un valor de inmovilización establecido de, por ejemplo, 1.000 RU. Se utilizó etanolamina (1,0 M), pH 8,0 para inactivar los ésteres activos residuales tras la inmovilización de hIL-13Rα1.ECR.

Se realizó por duplicado el análisis de la unión de los AcMo de ensayo (intervalo de concentración de 1,4 nM a 150 nM, diluciones dobles) al hIL-13Rα1.ECR inmovilizado. Los sensogramas generados se ajustaron a un modelo de unión al ligando bivalente para obtener de manera simultánea las tasas de asociación (k_a) y de disociación (K_d) y se utilizaron para determinar la afinidad de unión (K_D , software Biaevaluation, BIACORE™, Suecia).

Resultados. En la Tabla 4 se presentan los ejemplos de las afinidades de unión de los AcMo humanos anti-IL-13Rα1.

TABLA 4

AcMo	Afinidad (K_D)
4B5	~485pM (n = 2)
8B11	~288pM (n = 2)
15F4	~2,17nM (n = 2)

Ejemplo 5: Análisis de la unión de los anticuerpos monoclonales anti-IL-13Rα1 humano a IL-13Rα1 de Macaco cynomolgus y ratón

Se clonó un ADNc que codificaba el IL-13Rα1 de macaco cynomolgus (cyIL-13Rα1) mediante PCR utilizando ARNm extraído de bazo y médula ósea de cynomolgus. La secuencia madura estaba altamente conservada entre el IL-13Rα1 humano y de cynomolgus con una identidad de aminoácidos de aproximadamente el 97% (véase el N° de acceso del GENBANK AAP78901).

Para la producción de la proteína IL-13R α 1.ECR de cynomolgus purificada, se clonó un ADNc que codificaba IL-13R α 1.ECR de cynomolgus (aminoácidos 9 a 325 con N° de acceso del GENBANK AAP78901 o aminoácidos 1 a 317 de la SEC ID NO: 2) en el vector pEFBOS-S-FLAG® para la expresión como una proteína de fusión marcada con FLAG® en el extremo N-terminal básicamente como se ha descrito anteriormente para la hIL-13R α 1.ECR.

- 5 También se expresó IL-13R α 1.ECR de ratón (aminoácidos 27 a 344 con N° de acceso del GENBANK O09030 o los aminoácidos 1 a 318 de la SEC ID NO: 3) y se purificó como una proteína de fusión marcada con FLAG® en el extremo N-terminal (mIL-13R α 1.ECR) básicamente como se ha descrito anteriormente.

10 Se evaluó la reactividad cruzada potencial de los AcMo generados contra hIL-13R α 1.ECR con IL-13R α 1.ECR de ratón y de cynomolgus mediante un procedimiento basado en BIACORE™. Las IL-13R α 1.ECR humana, de ratón, y de cynomolgus purificadas se inmovilizaron individualmente a tres canales de una microplaca detectora (CM5, BIACORE™, Suecia) utilizando la química de inmovilización convencional. Se evaluaron los anticuerpos monoclonales (intervalo de concentración de 312,5 nM a 125 pM) para determinar la unión a los receptores de manera simultánea a un caudal de 15 μ l/minuto. El análisis de la afinidad de los AcMo se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 4 anteriormente indicado.

15 **Resultados.** De manera algo sorprendente, dado el grado de identidad de secuencias entre el receptor humano y el de cynomolgus, una serie de AcMo presentaron una unión diferencial significativa (Tabla 5). Por ejemplo, el AcMo 8B11 mostró escasa unión, de haberla, al receptor de cynomolgus. Por el contrario, otros AcMo tales como el AcMo de ratón, 1D9, se unía por igual a los receptores humanos y de cynomolgus, mientras que el AcMo 8B4 parecía mostrar cierta preferencia por el receptor de cynomolgus. Los AcMo 4B5, 8B11 y 15F4 mostraron una unión
20 insignificante a los receptores de ratón.

TABLA 5

AcMo	Afinidad (K _D) nM	
	IL13R α .ECR de cynomolgus	IL13R α .ECR humano
8B11	850	~0,288
8B4	0,59	4,6
1D9	0,247	0,207

Ejemplo 6: Análisis de la capacidad de los anticuerpos monoclonales anti-IL-13R α 1 humano para inhibir las respuestas celulares mediadas por IL-13 e IL-4

25 **Ensayo de eotaxina de fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF).** Se ha demostrado que las células NHDF producen eotaxina en respuesta a IL-13 y los AcMo dirigidos contra el IL-13R α 1 pueden inhibir esta respuesta.

30 Se cultivaron células NHDF (Cambrex, #CC-2509) en medio FGM (Cambrex, #CC3132), complementado con los aditivos recomendados de acuerdo a las instrucciones del fabricante (medio completo). Se transfirieron las células 1:3 ó 1:5 una vez por semana y se monitorizaron para determinar la capacidad de respuesta a la IL-13 antes de su uso. Para evaluar la actividad antagonista de los AcMo específicos para hIL-13R α 1, se resuspendieron las células a una concentración de 2x10⁶/ml en medio completo que contenía 20 ng/ml de PMA (SIGMA, #P8139) y 20 μ g/ml de polimixina (SIGMA, #P4932) y se sembraron en placas de fondo plano de 96 pocillos (COSTAR, #3595) a una concentración de 1x10⁵ células/pocillo. Se añadieron a las células títulos de anticuerpos y se incubaron durante 30 minutos, a 37°C con CO₂ al 5% en aire humidificado. A continuación se añadió IL-13 recombinante (humana o de primate no humano) a las placas a una concentración final de 30 ng/ml y se incubaron durante toda la noche a 37°C con CO₂ al 5% en aire humidificado. Para los ensayos inducidos por IL-4, se añadió a las placas IL-4 recombinante (PHARMINGEN) a una concentración final de 0,5 ng/ml en lugar de la IL-13. A continuación, se eliminaron los sobrenadantes y se sometieron a ensayo para determinar el contenido eotaxina mediante ELISA.

40 **Protocolo de ELISA para eotaxina.** Se recubrieron placas IMMULON®-4 (DYNATECH, #3855) con 4 μ g/ml de anticuerpo anti-eotaxina humana de ratón (R&D Systems, MAB320) en PBS (INVITROGEN, #14190-144), durante toda la noche a 4°C. Se bloquearon las placas (200 μ l/pocillo, TBS complementado con BSA al 1% y Tween 20™ al 0,05%) durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron tres veces (tampón de lavado, TBS más Tween 20™ al 0,05%). Se añadió SNF de ensayo de células NHDF (50 μ l/pocillo), se incubaron las placas durante 2 horas a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron tres veces. Se añadió anticuerpo anti-eotaxina humana biotinilado (R&D Systems, BAF320) a 200 ng/ml en tampón de bloqueo, 60 μ l/pocillo, y se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas tres veces y se añadió estreptavidina-europio (#1244-360, Wallac), 100 ng/ml en tampón de europio (100 μ l/pocillo). Se incubaron las placas durante 20 minutos a temperatura ambiente y se lavaron tres veces. Se añadió solución de contraste (#12244-105, Wallac), 150 μ l/pocillo, y se incubaron las placas 1 hora a temperatura ambiente. El análisis se llevó a cabo a través de fluorescencia retardada

utilizando un lector de placas VICTOR (PERKIN ELMER). Se utilizó eotaxina humana recombinante (R&D Systems, #320-EO) para establecer una curva de calibración. Los resultados de este análisis indicaban que el valor EC_{50} del anticuerpo monoclonal 8B11 era de 21 $\mu\text{g/ml}$ contra la IL-13 y de 2,9 $\mu\text{g/ml}$ contra la IL-4.

5 *Ensayo de fosforilación de STAT6 Inducida por IL-13/IL-4 de NHDF.* La fosforilación de STAT6 (pSTAT6) es un elemento esencial de la transducción de señales de IL-13/IL-4 y se produce a los pocos minutos de la dimerización del receptor. Los AcMo específicos de IL-13 α 1 pueden bloquear la fosforilación de STAT6 en respuesta a IL-13 y/o IL-4.

10 De esta manera, se sembraron 2×10^6 células NHDF en 50 μl de medio RPMI (#22400-071, INVITROGEN) en placas de PCR de polipropileno con fondo en V de 96 pocillos (#1442-9596, USA scientific), y se añadieron AcMo anti-IL-13R a la concentración necesaria en 25 μl . Se incubaron las placas durante 30 minutos a 4°C. Se añadió hIL-13 (100 ng/ml) o hIL-4 (PHARMINGEN) (0,5 ng/ml) recombinante en 25 μl y se calentaron las placas a 37°C en una máquina de PCR durante 20 minutos. Después de 20 minutos, se añadió un volumen igual de tampón de lisis 2X (HEPES 100 mM, NaCl 200 mM, Triton™ al 2% v/v X100, NaF 100 mM, DTT 10 mM, inhibidores de la proteasa) y se midió la pSTAT6 mediante ELISA.

15 *Protocolo de ELISA para STAT6.* Se recubrieron placas IMMULON®-4 (#3855, DYNATECH) con STAT6 fosforilado anti-humano (621995, BD Transduction Labs) a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ en PBS (#14290-144, INVITROGEN) (50 $\mu\text{l/pocillo}$) durante toda la noche a 4°C. Se bloquearon las placas (200 $\mu\text{l/pocillo}$, TBS complementado con BSA al 1% y Tween 20™ al 0,05%) durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron tres veces (tampón de lavado, TBS más Tween™ 20 al 0,05% v/v). Se añadieron los lisados de ensayo a una concentración de 50 $\mu\text{l/pocillo}$, se incubaron las placas durante 2 horas a temperatura ambiente y se lavaron tres veces. Se añadió biotina-anti-STAT6 (621141BD Transduction Labs, conjugado con biotina en una relación molar 20:1) a 2 $\mu\text{g/ml}$ en tampón de bloqueo (60 $\mu\text{l/pocillo}$) y se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas tres veces, se añadió estreptavidina-europio (#1244-360, Wallac) a una concentración de 100 ng/ml en tampón de europio (100 $\mu\text{l/pocillo}$), y se incubaron las placas durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las placas tres veces, se añadió solución de contraste (#12244-105, Wallac) (150 $\mu\text{l/pocillo}$), y se incubaron las placas 1 hora a temperatura ambiente. El análisis se llevó a cabo a través de fluorescencia retardada utilizando un lector de placas VICTOR (PERKIN ELMER).

Los resultados de este análisis indicaban que el valor de la CE_{50} del anticuerpo monoclonal 8B11 era de 7,9 $\mu\text{g/ml}$ contra la IL-13 y de 5,3 $\mu\text{g/ml}$ contra la IL-4.

30 **Ejemplo 7: Unión competitiva de los AcMo a hIL-13 α 1**

Estrategia basada en ELISA. Para el análisis de competición basado en ELISA, la unión del AcMo de ensayo biotilado (concentración de subsaturación, biotilado utilizando los procedimientos convencionales) al hIL-13 α 1.ECR unido a la placa, en presencia de un segundo AcMo no marcado de titulación, se evaluó como sigue. Se recubrieron placas MAXISORP™ de 96 pocillos de fondo plano (NUNC) con 50 μl de una solución que contenía 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de hIL-13 α 1.ECR diluido en PBS, durante toda la noche a 4°C. Después de lavarse dos veces en PBS, se bloquearon las placas con leche desnatada al 2% p/v en PBS (tampón de bloqueo, 200 $\mu\text{l/pocillo}$) durante 1 hora a 37°C, a continuación se lavaron dos veces más en PBS, Tween™ 20 al 0,1% v/v (tampón de lavado). Se añadieron, por pocillo, cincuenta μl , que contenían AcMo de ensayo biotilado a una concentración de subsaturación predeterminada y AcMo competidor no marcado de titulación, y se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavaron las placas tres veces. Los AcMo biotilados unidos se detectaron utilizando un reactivo secundario de estreptavidina conjugada con HRP diluido 1:1.000 en PBS, leche desnatada al 1% p/v, Tween™ 20 al 0,1% v/v (50 μl), 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas tres veces, se desarrollaron con sustrato TMB, y se leyó la OD a 450 nm.

45 *Resultados.* La unión de 4E2 biotilado se sometió a competición mediante 4E2 no marcado así como mediante 4B5, 8B11 y 15F4, pero no mediante 8B4. Los AcMo 8B4, y el AcMo de ratón 1D9, compitieron entre sí.

Ejemplo 8: Mapeo de epítomos

Mapeo fino de epítomos: análisis de unión del AcMo a proteínas IL-13 α 1 humano/de ratón químicas presentadas en fagos. Se utilizó mutagénesis para la selección de homólogo (Cunningham BC y col., Science, 10:243(4896):1330-6 (1989)) para definir adicionalmente los epítomos en hIL-13 α 1 para la unión a los diferentes AcMo. Como se ha indicado anteriormente, se sabía que los AcMo no se unen a IL-13 α 1 murino. Los segmentos individuales de las secuencias (5 a 9 restos de aminoácidos de longitud) derivados de D3 de la región extracelular de IL-13 α 1 murino (Figura 1) se sustituyeron sistemáticamente por toda la secuencia de la región extracelular de IL-13 α 1 humano para producir un conjunto de 11 receptores químicos; es decir, cada receptor químico incluía la secuencia de la región extracelular del receptor humano con un segmento de 5 a 9 restos de aminoácidos sustituidos por el segmento correspondiente de la secuencia de la región extracelular de ratón; por ejemplo, HM1 es la región extracelular de IL-13 α 1 humano con el segmento subrayado del IL-13 α 1 murino identificado como HM1 en la Figura 1 que sustituye el segmento correspondiente de la región extracelular del IL-13 α 1 humano. A continuación, se analizó cada AcMo contra el panel de proteínas receptoras químicas para determinar qué

receptores mutantes presentaban unión reducida.

Preparación del panel de proteínas IL-13R α 1 humano/de ratón y ensayo de ELISA. El panel de 11 proteínas IL-13R α 1 quiméricas se presentó en el bacteriófago M13 como fusiones a la proteína de cubierta del gen 3 y se sometieron a ensayo para determinar la unión a los AcMo anti-IL-13R α 1 humano. También se sometieron a ensayo las proteínas receptoras quiméricas para determinar la unión al AcMo de referencia 8B4, que se une a D2 de la región extracelular de IL-13R α 1, y cuya unión no se vio por tanto afectada por las mutaciones.

Las preparaciones de fagos que presentaban proteínas IL-13R α 1 quiméricas se sometieron a ensayo mediante ELISA para determinar la unión a los AcMo inmovilizados. En resumen, los AcMo se adsorbieron pasivamente sobre placas MAXISORP™ de 96 pocillos (NUNC) después de la incubación durante toda la noche de 100 μ l/pocillo de 2,5 μ g/ml de AcMo diluido en tampón PBS. Se descartaron las soluciones de recubrimiento, se bloquearon las placas por incubación con tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente, a continuación se lavaron una vez con tampón de lavado. A continuación, las muestras de fagos sometidas a dilución seriada con leche descremada en polvo al 1% p/v en PBS (tampón de dilución) se transfirieron a placas recubiertas con AcMo (100 μ l/pocillo). Después de la incubación a temperatura ambiente durante 2 horas, se lavaron las placas 3 veces, y el fago unido se marcó con anticuerpo policlonal IgG anti M13 conjugado con HRP, y se detectó añadiendo sustrato TMB. El desarrollo de color de TMB se interrumpió añadiendo ácido sulfúrico acuoso 2 M, y se midió la absorbancia a 450 nm.

Análisis de datos. Para cada uno de HM1 a HM11, la dilución de la reserva de fago que dio como resultado una señal de ELISA media máxima para la unión a un AcMo de ensayo dado (CE_{50}) se dividió por CE_{50-REF} ; dando como resultado la dilución de la reserva de fago una unión media máxima al AcMo de referencia 8B4. Para cada AcMo sometido a ensayo, los valores EC_{50}/EC_{50-REF} no difirieron en más de 10 veces en las construcciones de receptores quiméricos, salvo donde las mutaciones parecían disminuir significativamente la unión del receptor al AcMo. Una disminución significativa era por lo general más de una reducción de 10 veces en la unión entre un anticuerpo y un receptor quimérico concreto, en comparación con la unión entre el anticuerpo y otros receptores quiméricos donde las mutaciones tenían poco o ningún efecto y la unión del anticuerpo fue básicamente equivalente a la observada para el receptor natural.

Resultados. En la Tabla 6 se enumeran las proteínas quiméricas que mostraban una disminución significativa en la afinidad de unión al AcMo. La mayoría de las proteínas receptoras quiméricas mantienen alta afinidad de unión a los AcMo sometidos a ensayo. Se observó una unión reducida para los AcMo a los receptores quiméricos HM5 y HM6. Las tendencias generales puestas de manifiesto por estos datos indican que uno o varios de los restos de IL-13R α 1 humano Val248, Phe249, Tyr250, Gln252, Ala254, Glu257, Pro259 son importantes para la unión por parte de algunos anticuerpos contra el dominio 3. No se observó reducción en la unión para el AcMo de referencia 8B4 o el AcMo murino 1D9.

TABLA 6

AcMo	IL-13R α 1 quimérico
4B5	HM5, HM6
4E2	HM5, HM6
7D12	HM5, HM6
8B11	HM5, HM6
15F4	HM5, HM6

Mapeo fino de epítomos: análisis de la unión del AcMo a mutantes puntuales presentados en fagos de IL-13R α 1 humano. Para definir los restos de IL-13R α 1 específicos que contribuyen a la unión al AcMo, se hicieron sustituciones de aminoácidos individuales a la secuencia de la región extracelular de IL-13R α 1 humano. Las mutaciones puntuales se hicieron en las regiones donde la secuencia del receptor humano difería de la de HM5 y HM6. Por consiguiente, se prepararon los siguientes 7 mutantes puntuales de la región extracelular de hIL-13R α 1 mediante mutagénesis dirigida: i) Val248Ala, ii) Phe249Ala, iii) Tyr250Ala, iv) Gln252Ala; v) Ala254Asp; vi) Glu257Ala; vii) Pro259Ala. Los péptidos IL-13R α 1 mutantes se presentaron en fagos y se sometieron a ensayo mediante ELISA para determinar la unión a los AcMo de ensayo inmovilizados en placas de 96 pocillos, de acuerdo con el mismo procedimiento descrito anteriormente para las proteínas quiméricas de humano-ratón. También se evaluó el AcMo de referencia 8B4. Los datos de la unión obtenidos mediante ELISA se analizaron de la misma manera que para las proteínas quiméricas de humano-ratón.

Resultados. En la Tabla 7 se muestran las mutaciones puntuales que mostraron una disminución significativa en la unión a AcMo.

TABLA 7

AcMo	IL-13R α 1 mutante
4B5	Phe249Ala; Tyr250Ala; Gln252Ala
4E2	Phe249Ala; Tyr250Ala; Gln252Ala
7D12	Tyr250Ala; Gln252Ala; Ala254Asp
8B11	Phe249Ala; Tyr250Ala; Gln252Ala
15F4	Phe249Ala; Tyr250Ala; Gln252Ala; Ala254Asp

Ejemplo 9: Clonación y secuenciación de las regiones variables del anticuerpo humano

5 Se preparó ARN mensajero a partir de células de hibridoma que producían el AcMo y se sometió a transcripción inversa utilizando un cebador oligo-dT para producir ADNc. Se utilizaron cebadores de PCR parcialmente degenerados en base a la secuencia de aminoácidos amino-terminal y el isotipo de anticuerpo para amplificar los dominios variables de la cadena pesada y ligera maduras e incorporar los sitios de las enzimas de restricción para la clonación. Los productos de la PCR y los clones posteriores se secuenciaron para poner de manifiesto la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de 4B5, 8B11 y 15F4. Cuando la secuencia N-terminal correspondía a la secuencia del cebador pero difería de la línea germinal, la secuencia se corrigió a la línea germinal. Para el AcMo 10 4B5, se identificó un pseudogen para la cadena ligera y se necesitó una secuenciación adicional.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 4B5 se muestran en la Figura 2 y en las SEC ID NO: 21 y 4, respectivamente.

15 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 8B11 se muestran en la Figura 3 y en las SEC ID NO: 25 y 8, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 15F4 se muestran en la Figura 4 y en las SEC ID NO: 29 y 12, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 15F4 se muestran en la Figura 5 y en las SEC ID NO: 33 y 16, respectivamente.

20 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada 4B5 con las secuencias conocidas de la cadena pesada de la inmunoglobulina de la línea germinal humana demostró que esta cadena pesada del anticuerpo utiliza un segmento V_H 3-30.3 de la línea germinal humana V_H.

La comparación de la secuencia de la inmunoglobulina de cadena pesada 8B11 con las secuencias conocidas de la cadena pesada de la inmunoglobulina de la línea germinal humana demostró que esta cadena pesada del anticuerpo utiliza un segmento V_H de la línea germinal humana V_H 3-30.3.

25 La comparación de la secuencia de la inmunoglobulina de cadena pesada 15F4 con las secuencias conocidas de la cadena pesada de la inmunoglobulina de la línea germinal humana demostró que esta cadena pesada del anticuerpo utiliza un segmento V_H de la línea germinal humana V_H 3-33.

30 La comparación de la secuencia de la inmunoglobulina de cadena ligera 15F4 con las secuencias conocidas de la cadena ligera de la inmunoglobulina de la línea germinal humana demostró que esta cadena ligera del anticuerpo utiliza un segmento V_L de la línea germinal humana V_L VKIII A27.

LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> Merck & Co., Inc.
CSL Limited
Nash, Andrew
Baca, Manuel
Fabri, Louis
Zaller, Dennis
40 Strohl, William R.
An, Zhiqiang

<120> ANTICUERPOS ANTI-IL-13R alfa 1 Y USOS DE LOS MISMOS

45 <130> MRK0005WO

ES 2 388 567 T3

<150> US 60/852.780
 <151> 19-10-2006

5 <160> 46

<170> PatentIn versión 3.3

10 <210> 1
 <211> 401
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 1

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

Glu Asn Leu Cys Thr Val Ile Trp Thr Trp Asn Pro Pro Glu Gly Ala
 20 25 30

Ser Ser Asn Cys Ser Leu Trp Tyr Phe Ser His Phe Gly Asp Lys Gln
 35 40 45

Asp Lys Lys Ile Ala Pro Glu Thr Arg Arg Ser Ile Glu Val Pro Leu
 50 55 60

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

Ser Glu Lys Pro Ser Ile Leu Val Glu Lys Cys Ile Ser Pro Pro Glu
 85 90 95

Gly Asp Pro Glu Ser Ala Val Thr Glu Leu Gln Cys Ile Trp His Asn
 100 105 110

Leu Ser Tyr Met Lys Cys Ser Trp Leu Pro Gly Arg Asn Thr Ser Pro
 115 120 125

Asp Thr Asn Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp His Arg Ser Leu Glu Lys Ile

ES 2 388 567 T3

130						135										140
His	Gln	Cys	Glu	Asn	Ile	Phe	Arg	Glu	Gly	Gln	Tyr	Phe	Gly	Cys	Ser	
145					150					155					160	
Phe	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	Lys	Asp	Ser	Ser	Phe	Glu	Gln	His	Ser	Val	
				165					170					175		
Gln	Ile	Met	Val	Lys	Asp	Asn	Ala	Gly	Lys	Ile	Lys	Pro	Ser	Phe	Asn	
			180					185					190			
Ile	Val	Pro	Leu	Thr	Ser	Arg	Val	Lys	Pro	Asp	Pro	Pro	His	Ile	Lys	
		195					200						205			
Asn	Leu	Ser	Phe	His	Asn	Asp	Asp	Leu	Tyr	Val	Gln	Trp	Glu	Asn	Pro	
210						215					220					
Gln	Asn	Phe	Ile	Ser	Arg	Cys	Leu	Phe	Tyr	Glu	Val	Glu	Val	Asn	Asn	
225					230					235					240	
Ser	Gln	Thr	Glu	Thr	His	Asn	Val	Phe	Tyr	Val	Gln	Glu	Ala	Lys	Cys	
				245					250					255		
Glu	Asn	Pro	Glu	Phe	Glu	Arg	Asn	Val	Glu	Asn	Thr	Ser	Cys	Phe	Met	
			260					265					270			
Val	Pro	Gly	Val	Leu	Pro	Asp	Thr	Leu	Asn	Thr	Val	Arg	Ile	Arg	Val	
		275					280					285				
Lys	Thr	Asn	Lys	Leu	Cys	Tyr	Glu	Asp	Asp	Lys	Leu	Trp	Ser	Asn	Trp	
290						295					300					
Ser	Gln	Glu	Met	Ser	Ile	Gly	Lys	Lys	Arg	Asn	Ser	Thr	Leu	Tyr	Ile	
305					310					315					320	
Thr	Met	Leu	Leu	Ile	Val	Pro	Val	Ile	Val	Ala	Gly	Ala	Ile	Ile	Val	
				325					330					335		
Leu	Leu	Leu	Tyr	Leu	Lys	Arg	Leu	Lys	Ile	Ile	Ile	Phe	Pro	Pro	Ile	
			340					345					350			
Pro	Asp	Pro	Gly	Lys	Ile	Phe	Lys	Glu	Met	Phe	Gly	Asp	Gln	Asn	Asp	
		355					360					365				
Asp	Thr	Leu	His	Trp	Lys	Lys	Tyr	Asp	Ile	Tyr	Glu	Lys	Gln	Thr	Lys	
370						375					380					

ES 2 388 567 T3

Glu Glu Thr Asp Ser Val Val Leu Ile Glu Asn Leu Lys Lys Ala Ser
 385 390 395 400

Gln

<210> 2
 <211> 401
 <212> PRT
 <213> Macaca fascicularis

5

<400> 2

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

Glu Asn Leu Cys Thr Val Ile Trp Thr Trp Asn Pro Pro Glu Gly Ala
 20 25 30

Ser Pro Asn Cys Ser Leu Trp Tyr Phe Ser His Phe Gly Asp Lys Gln
 35 40 45

Asp Lys Lys Leu Ala Pro Glu Thr Arg Arg Ser Lys Glu Val Pro Leu
 50 55 60

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

Ser Glu Lys Pro Ser Ile Leu Val Glu Lys Cys Ile Ser Pro Pro Glu
 85 90 95

Gly Asp Pro Glu Ser Ala Val Thr Glu Leu Gln Cys Ile Trp His Asn
 100 105 110

Leu Ser Tyr Met Gln Cys Ser Trp Leu Pro Gly Arg Asn Thr Ser Pro
 115 120 125

Asp Thr Asn Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp His Arg Ser Leu Glu Lys Ile
 130 135 140

Arg Gln Cys Glu Glu Ile Tyr Lys Glu Gly Gln Tyr Phe Gly Cys Ser
 145 150 155 160

Phe Asp Leu Thr Lys Val Lys Asp Ser Ser Phe Glu Gln His Ser Val
 165 170 175

Gln Ile Met Val Lys Asp Tyr Ala Gly Lys Ile Lys Pro Ser Phe Asn
 180 185 190

10

ES 2 388 567 T3

Ile Val Pro Leu Thr Ser Arg Val Lys Pro Asp Pro Pro His Ile Lys
 195 200 205

Asn Leu Ser Phe His Asn Gly Asp Leu His Val Gln Trp Glu Asn Pro
 210 215 220

Gln Asn Phe Ile Ser Arg Cys Leu Phe Tyr Glu Val Glu Val Asn Asn
 225 230 235 240

Ser Gln Thr Glu Thr His Asn Val Phe Ser Val Gln Glu Ala Lys Cys
 245 250 255

Gln Asn Pro Glu Phe Glu Arg Asn Val Glu Asn Thr Ser Cys Phe Met
 260 265 270

Val Pro Gly Val Leu Pro Asp Thr Leu Asn Thr Val Arg Ile Arg Val
 275 280 285

Lys Thr Asn Lys Leu Cys Tyr Glu Asp Asp Lys Leu Trp Ser Asn Trp
 290 295 300

Ser Gln Glu Met Ser Ile Gly Lys Lys Arg Asn Ser Thr Leu Tyr Ile
 305 310 315 320

Thr Met Leu Leu Ile Val Pro Val Ile Val Ala Gly Ala Ile Ile Val
 325 330 335

Leu Leu Leu Tyr Leu Lys Arg Leu Lys Ile Ile Ile Phe Pro Pro Ile
 340 345 350

Pro Asp Pro Gly Lys Ile Phe Lys Glu Met Phe Gly Asp Gln Asn Asp
 355 360 365

Asp Thr Leu His Trp Lys Lys Tyr Asp Ile Tyr Glu Lys Gln Thr Lys
 370 375 380

Glu Glu Thr Asp Ser Val Val Leu Ile Glu Asn Leu Lys Lys Ala Ser
 385 390 395 400

Gln

- <210> 3
- <211> 398
- <212> PRT
- <213> Mus musculus
- <400> 3

ES 2 388 567 T3

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

ES 2 388 567 T3

Asp Arg His Asn Ile Leu Glu Val Glu Glu Asp Lys Cys Gln Asn Ser
 245 250 255

Glu Ser Asp Arg Asn Met Glu Gly Thr Ser Cys Phe Gln Leu Pro Gly
 260 265 270

Val Leu Ala Asp Ala Val Tyr Thr Val Arg Val Arg Val Lys Thr Asn
 275 280 285

Lys Leu Cys Phe Asp Asp Asn Lys Leu Trp Ser Asp Trp Ser Glu Ala
 290 295 300

Gln Ser Ile Gly Lys Glu Gln Asn Ser Thr Phe Tyr Thr Thr Met Leu
 305 310 315 320

Leu Thr Ile Pro Val Phe Val Ala Val Ala Val Ile Ile Leu Leu Phe
 325 330 335

Tyr Leu Lys Arg Leu Lys Ile Ile Ile Phe Pro Pro Ile Pro Asp Pro
 340 345 350

Gly Lys Ile Phe Lys Glu Met Phe Gly Asp Gln Asn Asp Asp Thr Leu
 355 360 365

His Trp Lys Lys Tyr Asp Ile Tyr Glu Lys Gln Ser Lys Glu Glu Thr
 370 375 380

Asp Ser Val Val Leu Ile Glu Asn Leu Lys Lys Ala Ala Pro
 385 390 395

<210> 4
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> VH de 4B5 sintético

10

<400> 4

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

ES 2 388 567 T3

Thr Ile Ile Ser Asp Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Leu
 50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly His Tyr Tyr Tyr Asn Gly Met Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR1 de VH de 4B5 sintético
 10 <400> 5

Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr Ala Met His
 1 5 10

15 <210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> CDR2 de VH de 4B5 sintético
 <400> 6

Ile Ile Ser Asp Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Leu Lys
 1 5 10 15

25 Gly
 <210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR3 de VH de 4B5 sintético
 35 <400> 7

Glu Gly Gly His Tyr Tyr Tyr Asn Gly Met Asp Val
 1 5 10

ES 2 388 567 T3

5 <210> 8
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> VH de 8B11 sintético

10 <400> 8

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

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

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Thr Ile Ile Ser Asp Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Ala Ser Val
 50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Lys Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Asn Gly Met Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

15 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> CDR1 de VH de 8B11 sintético

<400> 9

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met His
 1 5 10

25 <210> 10
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> CDR2 de VH de 8B11 sintético

ES 2 388 567 T3

<400> 10

Ile Ile Ser Asp Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Ala Ser Val Gln
1 5 10 15

Gly

5

<210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> CDR3 de VH de 8B11 sintético

15

<400> 11

Glu Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Asn Gly Met Asp Val
1 5 10

20

<210> 12
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> VH de 15F4 sintético

<400> 12

ES 2 388 567 T3

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

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

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg Asp Ser Asn Asn Trp Tyr Val Gly Val Phe Asp Ile Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> CDR1 de VH de 15F4 sintético
 <400> 13

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His
 1 5 10

15 <210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> CDR2 de VH de 15F4 sintético
 <400> 14

ES 2 388 567 T3

Val Ile Trp Asp Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Glu Val Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

5 <210> 15
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR3 de VH de 15F4 sintético
 10 <400> 15

Asp Ser Asn Asn Trp Tyr Val Gly Val Phe Asp Ile
 1 5 10

15 <210> 16
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> VL de 15F4 sintético
 <400> 16

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Thr
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

25 Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

30 <210> 17
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 388 567 T3

<220>
<223> CDR1 de VL de 15F4 sintético

5 <400> 17

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Thr Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 18
<211> 7
10 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> CDR2 de VL de 15F4 sintético

<400> 18

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

20 <210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> CDR3 de VL de 15F4 sintético

<400> 19

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Phe Thr
1 5

30 <210> 20
<211> 324
<212> PRT
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hIL-13Ralfa 1.ECR marcado con FLAG en el extremo N-terminal sintético

40 <400> 20

ES 2 388 567 T3

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Glu Ser Arg Thr Glu Thr Gln Pro Pro Val
 1 5 10 15
 Thr Asn Leu Ser Val Ser Val Glu Asn Leu Cys Thr Val Ile Trp Thr
 20 25 30
 Trp Asn Pro Pro Glu Gly Ala Ser Ser Asn Cys Ser Leu Trp Tyr Phe
 35 40 45
 Ser His Phe Gly Asp Lys Gln Asp Lys Lys Ile Ala Pro Glu Thr Arg
 50 55 60
 Arg Ser Ile Glu Val Pro Leu Asn Glu Arg Ile Cys Leu Gln Val Gly
 65 70 75 80
 Ser Gln Cys Ser Thr Asn Glu Ser Glu Lys Pro Ser Ile Leu Val Glu
 85 90 95
 Lys Cys Ile Ser Pro Pro Glu Gly Asp Pro Glu Ser Ala Val Thr Glu
 100 105 110
 Leu Gln Cys Ile Trp His Asn Leu Ser Tyr Met Lys Cys Ser Trp Leu
 115 120 125
 Pro Gly Arg Asn Thr Ser Pro Asp Thr Asn Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp
 130 135 140
 His Arg Ser Leu Glu Lys Ile His Gln Cys Glu Asn Ile Phe Arg Glu
 145 150 155 160

ES 2 388 567 T3

Gly Gln Tyr Phe Gly Cys Ser Phe Asp Leu Thr Lys Val Lys Asp Ser
 165 170 175

Ser Phe Glu Gln His Ser Val Gln Ile Met Val Lys Asp Asn Ala Gly
 180 185 190

Lys Ile Lys Pro Ser Phe Asn Ile Val Pro Leu Thr Ser Arg Val Lys
 195 200 205

Pro Asp Pro Pro His Ile Lys Asn Leu Ser Phe His Asn Asp Asp Leu
 210 215 220

Tyr Val Gln Trp Glu Asn Pro Gln Asn Phe Ile Ser Arg Cys Leu Phe
 225 230 235 240

Tyr Glu Val Glu Val Asn Asn Ser Gln Thr Glu Thr His Asn Val Phe
 245 250 255

Tyr Val Gln Glu Ala Lys Cys Glu Asn Pro Glu Phe Glu Arg Asn Val
 260 265 270

Glu Asn Thr Ser Cys Phe Met Val Pro Gly Val Leu Pro Asp Thr Leu
 275 280 285

Asn Thr Val Arg Ile Arg Val Lys Thr Asn Lys Leu Cys Tyr Glu Asp
 290 295 300

Asp Lys Leu Trp Ser Asn Trp Ser Gln Glu Met Ser Ile Gly Lys Lys
 305 310 315 320

Arg Asn Ser Thr

<210> 21
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> VH de 4B5 sintético

<400> 21

caggttcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtgggtccagc ctggggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt catcttcagt agctatgcta tgcactgggt cgcaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg gttgacaatt atatcagatg atggaagcga taaatactac 180
 gcagactect tgaagggcgc attcaccatc tccagagaca attccaagaa gacgctgtat 240

5

10

ES 2 388 567 T3

ctgcaaatga acagcctgag agttgaggac acggctctat attactgtgc gagagagggg 300
 ggacactact attataacgg tatggacggt ggggcccaagg gaccacggtc accgtctcct 360
 cag 363
 <210> 22
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR1 de VH de 4B5 sintético
 <400> 22
 ggattcatct tcagtagcta tgctatgcac 30
 <210> 23
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR2 de VH de 4B5 sintético
 <400> 23
 attatatcag atgatggaag cgataaatac tacgcagact ccttgaaggg c 51
 <210> 24
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR3 de VH de 4B5 sintético
 <400> 24
 gaggggggac actactatta taacggtatg gacggt 36
 <210> 25
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> VH de 8B11 sintético
 <400> 25
 caaatacagc tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatgcta tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtgacaatt atatcagatg atggaagcaa taaatactac 180
 gcagcctccg tgcagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa gacgctctat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagagggg 300
 ggatactact attataacgg tatggacggtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctec 360
 tca 363

ES 2 388 567 T3

<210> 26
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223>CDR1 de VH de BB11 sintético
 <400> 26
 10 ggattcacct tcagtagcta tgctatgcac 30
 <210> 27
 <211> 51
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR2 de VH de BB11 sintético
 20 <400> 27
 attatatcag atgatggaag caataaatac tacgcagcct ccgtgcaggg c 51
 <210> 28
 <211> 36
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR3 de VH de 8B11 sintético
 30 <400> 28
 gaggggggat actactatta taacggtatg gacgtc 36
 <210> 29
 <211> 363
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> VH de 15F4 sintético
 <400> 29
 cagggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagc agttatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatgggatg atggaagtaa taaatactat 180
 gaagtctccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 cttcaaatga acagcctgag agttgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatagc 300
 aacaactggt acgtcgggtg ttttgatata tggggccaag ggacaatggt caccgtctct 360
 tca 363
 45
 <210> 30
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> CDR1 de VH de 15F4 sintético

ES 2 388 567 T3

<400> 30
 ggattcacct tcagcagtta tggcatgcac 30

5 <210> 31
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> CDR2 de VH de 15F4 sintético

<400> 31
 gttatatggg atgatggaag taataaatac tatgaagtct ccgtaaggg c 51

15 <210> 32
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> CDR3 de VH de 15F4 sintético

<400> 32
 gatagcaaca actggtacgt cgggttttt gatatc 36

25 <210> 33
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> VL de 15F4 sintético

35 <400> 33

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcacctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccatt cactttcggc 300

cctgggacca aagtggatat caaa 324

40 <210> 34
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR1 de VL de 15F4 sintético

45 <400> 34
 agggccagtc agagtgttag cagcacctac ttagcc 36

50 <210> 35
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>

ES 2 388 567 T3

<223> CDR2 de VL de 15F4 sintético

<400> 35
ggtgcatcca gcaggccac t 21

5

<210> 36
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> CDR3 de VL de 15F4 sintético

<400> 36
cagcagtatg gtagctcacc attcact 27

15

<210> 37
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 37

Lys Pro Asp Pro Pro His Ile Lys Asn Leu Ser Phe His Asn Asp Asp
1 5 10 15

Leu Tyr Val Gln Trp Glu Asn Pro Gln Asn Phe Ile Ser Arg Cys Leu
20 25 30

Phe Tyr Glu Val Glu Val Asn Asn Ser Gln Thr Glu Thr His Asn Val
35 40 45

Phe Tyr Val Gln Glu Ala Lys Cys Glu Asn Pro Glu Phe Glu Arg Asn
50 55 60

Val Glu Asn Thr Ser Cys Phe Met Val Pro Gly Val Leu Pro Asp Thr
65 70 75 80

Leu Asn Thr Val Arg Ile Arg Val Lys Thr Asn Lys Leu Cys Tyr Glu
85 90 95

Asp Asp Lys Leu Trp Ser Asn Trp Ser Gln Glu Met Ser Ile Gly Lys
100 105 110

Lys Arg Asn Ser Thr
115

25

<210> 38
<211> 336
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> Dominio Fc de IgG1 sintético

<400> 38

ES 2 388 567 T3

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 1 5 10 15

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 20 25 30

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 35 40 45

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 50 55 60

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 85 90 95

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 100 105 110

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 130 135 140

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 145 150 155 160

ES 2 388 567 T3

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 165 170 175

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 180 185 190

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 195 200 205

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 210 215 220

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 225 230 235 240

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 245 250 255

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 260 265 270

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 275 280 285

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 290 295 300

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 305 310 315 320

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330 335

<210> 39
 <211> 332
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Dominio Fc de IgG2 sintético

10

<400> 39

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 1 5 10 15

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 20 25 30

ES 2 388 567 T3

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
35 40 45

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
50 55 60

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Thr Ser Ser
65 70 75 80

Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
85 90 95

Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys
100 105 110

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
115 120 125

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
130 135 140

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
145 150 155 160

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
165 170 175

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
180 185 190

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
195 200 205

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
210 215 220

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
225 230 235 240

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
245 250 255

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
260 265 270

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
275 280 285

ES 2 388 567 T3

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 290 295 300

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 305 310 315 320

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 40
 <211> 333
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Dominio Fc de IgG4 sintético

<400> 40

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 1 5 10 15

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 20 25 30

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 35 40 45

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 50 55 60

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 85 90 95

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 115 120 125

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 130 135 140

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 145 150 155 160

ES 2 388 567 T3

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 165 170 175

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 180 185 190

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 195 200 205

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 210 215 220

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 225 230 235 240

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 245 250 255

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 260 265 270

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 275 280 285

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 290 295 300

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 305 310 315 320

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325 330

<210> 41
 <211> 332
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Dominio Fc de IgG2M4 sintético

10

<400> 41

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 1 5 10 15

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 20 25 30

ES 2 388 567 T3

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 35 40 45
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 50 55 60
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Thr Ser Ser
 65 70 75 80
 Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 85 90 95
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys
 100 105 110
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 115 120 125
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 130 135 140
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 145 150 155 160
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 165 170 175
 Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 180 185 190
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 195 200 205
 Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
 210 215 220
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 225 230 235 240
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 245 250 255
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 260 265 270

ES 2 388 567 T3

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 275 280 285

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 290 295 300

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 305 310 315 320

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 42

<211> 326

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética que contiene dominio Fc de IgG2M4

<400> 42

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Thr Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140

5

10

ES 2 388 567 T3

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 43
<211> 978
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética que contiene dominio Fc de IgG2M4

<400> 43

5

10

ES 2 388 567 T3

gcctccacca agggcccata cgtcttcccc ctggcgcctt gctccaggag cacctccgag 60
 agcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg 120
 tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtcctt acagtctctca 180

 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgacctcca gcaactttgg cacgcagacc 240
 tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgg 300
 aaatgctgcg tggagtgcc accatgcccc gcacctccag tggccggacc atcagtcttc 360
 ctgttcccc caaaacccaa ggacactctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc 420
 gtgggtggtg acgtgagcca ggaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggatggc 480
 gtggagggtc ataatgcca gacaaagccg cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt 540
 gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 600
 aaggctctca acaaaggcct cccgtcctcc atcgagaaaa ccatctcca aaccaaggg 660
 cagccccgag agccacaggt gtacacctg cccccatccc gggaggagat gaccaagaac 720
 caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatgc cgtggagtgg 780
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccatgct ggactccgac 840
 ggctccttct tcctctacag caagctaacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaat 900
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc 960
 tcctgtctc ctggtaaa 978

5 <210> 44
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 44

 Val Phe Tyr Val Gln
 1 5

15 <210> 45
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 45

 Ile Leu Glu Val Glu
 1 5

25 <210> 46
 <211> 314
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 46

ES 2 388 567 T3

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

ES 2 388 567 T3

Asp Arg His Asn Ile Leu Glu Val Glu Glu Asp Lys Cys Gln Asn Ser
245 250 255

Glu Ser Asp Arg Asn Met Glu Gly Thr Ser Cys Phe Gln Leu Pro Gly
260 265 270

Val Leu Ala Asp Ala Val Tyr Thr Val Arg Val Arg Val Lys Thr Asn
275 280 285

Lys Leu Cys Phe Asp Asp Asn Lys Leu Trp Ser Asp Trp Ser Glu Ala
290 295 300

Gln Ser Ile Gly Lys Glu Gln Asn Ser Thr
305 310

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que:
 - (i) se une al receptor alfa 1 de la interleucina-13 humana a través de uno o varios de los restos de aminoácidos 248-252 de dicho receptor,
 - 5 (ii) inhibe la señalización de la interleucina-13, y
 - (iii) no presenta reacción cruzada con el receptor alfa 1 de la interleucina-13 de mono cynomolgus.
2. El anticuerpo aislado según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 8 y SEC ID NO: 12.
- 10 3. El anticuerpo aislado según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es producido por una línea celular de hibridoma seleccionada de entre los números de depósito de la ATCC PTA6931, PTA6936 y PTA6935.
4. El anticuerpo aislado según la reivindicación 2, que comprende adicionalmente una región constante de la cadena pesada como se establece en la SEC ID NO: 42.
5. El anticuerpo aislado según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humano.
- 15 6. El anticuerpo aislado según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado, desimmunizado, primatizado o quimérico.
7. El anticuerpo aislado según la reivindicación 1, en el que la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 como se establece en:
 - (i) las SEC ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente;
 - 20 (ii) las SEC ID NO: 9, 10 y 11, respectivamente; o
 - (iii) las SEC ID NO: 13, 14 y 15, respectivamente.
8. El anticuerpo según la reivindicación 7, en el que las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada tienen las secuencias de aminoácidos como se establece en las SEC ID NO: 13, 14 y 15, respectivamente, y en el que dicho anticuerpo comprende adicionalmente una región variable de la cadena ligera que tiene las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 como se establece en las SEC ID NO: 17, 18 y 19, respectivamente.
- 25 9. El anticuerpo según la reivindicación 1, en el que la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en la SEC ID NO: 12 y en la SEC ID NO: 16, respectivamente, o una secuencia idéntica a las mismas en por lo menos un 90%.
10. El anticuerpo aislado según la reivindicación 9, que comprende adicionalmente una región constante de la cadena pesada como se establece en la SEC ID NO: 42.
- 30 11. El anticuerpo aislado según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo compite por la unión al receptor alfa 1 de la interleucina-13 humana con un anticuerpo producido por una línea celular de hibridoma seleccionada de entre los números de depósito de la ATCC PTA6931, PTA6936 y PTA6935.
12. Una composición que comprende el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 13. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
14. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 13.
15. Una célula hospedadora que comprende el vector según la reivindicación 14.
- 40 16. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o la composición según la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento del asma, la EPOC, la dermatitis atópica, la rinitis alérgica, la eosinofilia esofágica, el linfoma de Hodgkin, la enfermedad intestinal inflamatoria, la psoriasis, la artritis psoriásica o la fibrosis.

TEvQPVTNLSVSVENLCTiIWTWSPPEGASpNctLrYFSHFdDqQDKKI
 51 APETHrkeE1PLdekICLQVGSQCSaNESEKPSpLVkKCIspPEGDPEsa
 101 VTELkCIWHNLSYMKCSWLpGRNTSPDThYTLYYWysLEKsrQCENIyR
 151 EGQhiaCSFkLTKVepSEhqnVQIMVKDNAGKIrPSCKIVsLTSyVKPD
 201 PPHIKhLl1kNgallVQWkNPQNFrSRCLtYEVEVNNtQTdrHNIleVeE
 HM1 HM2 HM3 HM4 HM5
 251 dkCqNsEsdRNmEgTSCFq1PGVLaDavyTVRvRVKTNKLCfdDnKLWsd
 HM6 HM7 HM8 HM9 HM10
 301 WSeaqSIGKeQnst (sec ID NO: 46)
 HM11

FIG. 1

CAGGTCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCTGAGACTCTCCTGT
 Q V Q L V E S G G V Q P G R S L R L S C
 GCAGCCTCTGGATTTCAGTAGCTATGCTATGCACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG
 A A S G F I F S S Y A M H W V R Q A P G K G
 CDR1
 CTGGAGTGGTTGACAAATTATATCAGATGATGGAAGCGATAAATACTACGCAGACTCCTTGAAGGGC
 L E W L T I I S D D G S D K Y Y A D S L K G
 CDR2
 CGATTCACCATCTCCAGAGACAAATCCAAAGAAGACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGTT
 R F T I S R D N S K K T L Y L Q M N S L R V
 GAGCACGGCTCTATATTACTGTGCGAGAGAGGGGGACACTACTATTATAACGGTATGGACGTT
 E D T A L Y Y C A R E G G H Y Y N G M D V
 CDR3
 GGGCCAAGGACCGGTCACCGTCTCCTCAG (SEC ID NO: 21)
 W G Q G T T V S S (SEC ID NO: 4)

FIG. 2

CAAATACAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGT
 Q I Q L V E S G G V V Q P G R S L R L S C
 GCAGCCTCTGGATTACCTTACCTAGCTATGCTATGCACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG
 A A S G F T F S S Y A M H W V R Q A P G K G

CDR1

CTGGAGTGGGTGACAAATTATATCAGATGGAAGCAATAAATACTACGCAGCCTCCGTGCAGGGC
 L E W V T I I S D D G S N K Y Y A A S V Q G

CDR2

CGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAGACGCTCTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCT
 R F T I S R D N S K K T L Y L Q M N S L R A
 GAGGACACGGCTGTATTACTGTGCGAGAGAGGGGATACTACTATTATAACGGTATGGACGTC
 E D T A V Y Y C A R E G G Y Y Y N G M D V

CDR3

TGGGGCCAAGGACACGGTCACCGTCTCCTCA (SEC ID NO: 25)
 W G Q G T T V T V S S (SEC ID NO: 8)

FIG. 3

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGT
 Q V Q L V E S G G V Q P G R S L R L S C
 GCAGCGTCTGGATTACCCCTCAGCAGTTATGGCATGCACTGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG
 A A S G F T F S S Y G M H W V R Q A P G K G

CDR1

CTGGAGTGGTGGCAGTTATATGGGATGATGGAAGTAATAAATACTATGAAGTCTCCGTGAAGGGC
 L E W V A V I W D D G S N K Y Y E V S V K G

CDR2

CGATTCAACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGTT
 R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R V
 GAGGACACGGCTGTGTACTGTGCCGAGAGATAGCAACAACCTGGTACGTCGGTGTTTTGATATC
 E D T A V Y Y C A R D S N N W Y V G V F D I

CDR3

TGGGGCCAAGGACAATGGTCACCGTCTTCA (SEC ID NO: 29)
 W G Q G T M V T V S S (SEC ID NO: 12)

FIG. 4

GAAATTGTTGACGCAGTCTCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGAAAGAGCCACCCCTCTCC
 E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S
TGCAGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCACCTACTTAGCCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCT
C R A S Q S V S S T Y L A W Y Q Q K P G Q A

CDR1

CCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGT
 P R L L I Y G A S S R A T G I P D R F S G S

CDR2

GGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCCATCAGCAGACTGGAGCCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTAC
 G S G T D F T L T I S R L E P E D F A V Y Y
TGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCCATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAA (SEC ID NO: 33)
C Q Q Y G S S P F T F G P G T K V D I K (SEC ID NO: 16)

CDR3

FIG. 5

| --- CH1 COMIENZA AQUÍ

IgG1	LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKSTSGGTAA	LGCLVKDYFP	EPVTVSWNSG
IgG2	LVTVSSASTK	GPSVFPLAPC	SRSTSESTAA	LGCLVKDYFP	EPVTVSWNSG
IgG4	LVTVSSASTK	GPSVFPLAPC	SRSTSESTAA	LGCLVKDYFP	EPVTVSWNSG
IgG2M4	LVTVSSASTK	GPSVFPLAPC	SRSTSESTAA	LGCLVKDYFP	EPVTVSWNSG

(ENGARCE VH - C1)

C200

IgG1	ALTSGVHTFP	AVLQSSGLYS	LSSVVTVPSS	SLGTQTYICN	VNHKPSNTKV
IgG2	ALTSGVHTFP	AVLQSSGLYS	LSSVVTVTSS	NFGTQTYTCN	VDHKPSNTKV
IgG4	ALTSGVHTFP	AVLQSSGLYS	LSSVVTVPSS	SLGTQTYTCN	VDHKPSNTKV
IgG2M4	ALTSGVHTFP	AVLQSSGLYS	LSSVVTVTSS	NFGTQTYTCN	VDHKPSNTKV

- REGIÓN DE BISAGRA - - | | --- CH2 -> P238

IgG1	DKKAEPKSCD	KTHTCP PCA	PELLGGPSVF	LFPPKPKDTL	MISRTPEVTC
IgG2	DKTVERKCC-	--VECP PCA	PP-VAGPSVF	LFPPKPKDTL	MISRTPEVTC
IgG4	DKRVESKYGP	---PCP PCA	PEFLGGPSVF	LFPPKPKDTL	MISRTPEVTC
IgG2M4	DKTVERKCC-	--VECP PCA	PP-VAGPSVF	LFPPKPKDTL	MISRTPEVTC

(BISAGRA INFERIOR)

M252 C261
UNIÓN FcRn

	D265 D270		N297*		T307
IgG1	VVVDVSHEDP	EVKFNWYVDG	VEVHNAKTKP	REEQFNSTYR	VVSVLTVLHQ
IgG2	VVVDVSHEDP	EVQFNWYVDG	VEVHNAKTKP	REEQFNSTFR	VVSVLTVVHQ
IgG4	VVVDVSOEDP	EVQFNWYVDG	VEVHNAKTKP	REEQFNSTYR	VVSVLTVLHQ
IgG2M4	VVVDVSOEDP	EVQFNWYVDG	VEVHNAKTKP	REEQFNSTFR	VVSVLTVLHQ

BUCLE B/C

BUCLE C' E

UNIÓN FcRn

C321 P329 | --- CH3 ->

IgG1	DWLNGKEYKC	KVSNKALPAPI	EKTISKAKG	QPREPQVYTL	PPSRDELTKN
IgG2	DWLNGKEYKC	KVSNKGLPAPI	EKTISKTKG	QPREPQVYTL	PPSREEMTKN
IgG4	DWLNGKEYKC	KVSNKGLPSSI	EKTISKAKG	QPREPQVYTL	PPSQEEMTKN
IgG2M4	DWLNGKEYKC	KVSNKGLPSSI	EKTISKTKG	QPREPQVYTL	PPSREEMTKN

BUCLE F/G

IgG1	QVSLTCLVKG	FYPSDIAVEW	ESNGQPENNY	KTTTPVLDS	GSFFLYSKLT
IgG2	QVSLTCLVKG	FYPSDIAVEW	ESNGQPENNY	KTTTPMLDS	GSFFLYSKLT
IgG4	QVSLTCLVKG	FYPSDIAVEW	ESNGQPENNY	KTTTPVLDS	GSFFLYSRLT
IgG2M4	QVSLTCLVKG	FYPSDIAVEW	ESNGQPENNY	KTTTPMLDS	GSFFLYSKLT

H433

IgG1	VDKSRWQQGN	VFSCSVMHEA	LHNHYTQKSL	SLSPGK*	(SEQ ID NO: 38)
IgG2	VDKSRWQQGN	VFSCSVMHEA	LHNHYTQKSL	SLSPGK*	(SEQ ID NO: 39)
IgG4	VDKSRWQEGN	VFSCSVMHEA	LHNHYTQKSL	SLSLGK*	(SEQ ID NO: 40)
IgG2M4	VDKSRWQQGN	VFSCSVMHEA	LHNHYTQKSL	SLSPGK*	(SEQ ID NO: 41)

UNIÓN FcRn

FIG. 6