

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 344**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04815598 .0**
96 Fecha de presentación: **23.12.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1711528**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.10.2006**

54 Título: **Tratamiento de cáncer con anticuerpos monoclonales anti-IL13 novedosos**

30 Prioridad:
23.12.2003 US 532130 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.11.2012

73 Titular/es:
GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US

72 Inventor/es:
FUNG, SEK, CHUNG y
MOYLE, MATTHEW

74 Agente/Representante:
ARIAS SANZ, Juan

ES 2 390 344 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de cáncer con anticuerpos monoclonales anti-IL13 novedosos

Antecedentes

5 IL13 es una citocina de Th2 pleiotrópica producida predominantemente por células T cooperadoras de tipo 2 CD4⁺, así como por células NKT, basófilos y mastocitos (Hershey, GKK, J Allergy Clin Immunol. (2003) 111: 677-90). Además de sus papeles etiológicos en asma, fibrosis, enfermedad obstructiva pulmonar crónica y colitis ulcerosa Wynn, TA, Annu Rev Immunol. (2003) 21: 425-56; Wynn TA., Nat Rev Immunol. (2004) 4: 583-94; Heller F *et al.*, Immunity (2002) 17: 629-38), IL13 también se conoce por desempeñar papeles importantes en el crecimiento tumoral (Kapp U *et al.*, J Exp Med. (1999) 189: 1939-4; Trieu Y *et al.*, Cancer Res. 2004; 64: 3271-5) y en la modulación de la inmunidad tumoral (Terabe M *et al.*, Cancer Immunol Immunother. 2004; 53: 79-85; Terabe M *et al.*, Nat Immunol. 2000; 1: 515-20). Por tanto, IL13 y sus receptores son dianas terapéuticas potenciales para el cáncer.

15 El linfoma de Hodgkin (HL) es un trastorno maligno de los ganglios linfáticos caracterizado por la producción anómala de múltiples citocinas a partir de la población celular maligna de HL, las células de Reed-Stemberg (RS) (véase Kapp *et al.* y Trieu *et al.*, citado anteriormente). Se mostró que IL13 promueve la proliferación de HL mediante un mecanismo autocrino. Se mostró que los anticuerpos monoclonales (Acm) neutralizantes anti-IL13 inhiben la proliferación de células de HL *in vitro* (Trieu *et al.* citado anteriormente; Skinnider *et al.*, Leukemia and Lymphoma (2002) 43:1203-1210)).

20 Las pruebas acumuladas indican que los receptores de IL13 están altamente expresados en una variedad de líneas celulares tumorales malignas humanas (por ejemplo, glioblastoma, tumores de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células renales, carcinoma de Kaposi asociado con SIDA, carcinoma de próstata, carcinoma pancreático y carcinomas epiteliales tales como adenocarcinoma de estómago, colon y piel) (véanse por ejemplo, Debinski W *et al.* J Biol Chem. (1995) 270: 16775-80; Purl RK *et al.* Blood (1998) 87: 4333-9; Maini A *et al.* J Urol. (1997) 158: 948-53; Debinski W *et al.* Clin Cancer Res. (1995) 1: 1253-8; Kommann M *et al.* Anticancer Res. (1999) 19: 125-31; Husain SR *et al.* Blood (2000) 95: 3506-13; Kawakami K *et al.* Cancer Res. (2001) 61: 6194-6200). Se mostró que una proteína de fusión recombinante que comprende IL13 acoplada a una forma mutada de exotoxina de *Pseudomonas* destruye específicamente estas células tumorales *in vitro*. Por tanto, estos datos sugieren que el receptor de IL13 es una diana atractiva para dirigir la destrucción tumoral selectiva.

30 Se conoce ahora que los mediadores principales de la inmunidad anti-tumoral son células Th1 CD4⁺ y linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (CTL). Puesto que la desviación inmunitaria hacia Th2 suprime el desarrollo de Th1, se ha sugerido que la inducción de una respuesta de Th2 en pacientes con cáncer es uno de los mecanismos principales que suprime la inmunovigilancia tumoral. Terabe *et al.* mostraron que un inhibidor de IL13 (sIL13R α 2-Fc) inhibía la recidiva tumoral en un modelo de ratón. Se encontraron también observaciones similares con ratones deficientes en STAT6 o IL4R, pero no con ratones deficientes en IL4. Conjuntamente, estos resultados indican que IL13 desempeña un papel importante en la supresión de la inmunidad anti-tumoral *in vivo*. Por tanto, la inhibición de IL13 podría promover la inmunidad anti-tumoral en pacientes con cáncer.

40 Se ha demostrado que la terapia basada en anticuerpos es muy eficaz en el tratamiento de diversos cánceres. Por ejemplo, se han usado con éxito HERCEPTIN® y RITUXAN® para tratar cáncer de mama y linfoma no Hodgkin, respectivamente. La presente invención proporciona métodos alternativos de tratamiento de cáncer que superan las limitaciones de métodos terapéuticos convencionales así como también ofrecen ventajas adicionales que se harán evidentes a partir de la descripción detallada a continuación.

Sumario de la invención

45 La presente solicitud se refiere al tratamiento de cánceres y/o tumores que expresan IL13, con anticuerpos monoclonales anti-IL13 antagonistas novedosos. En un primer aspecto, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de cáncer, que comprende un anticuerpo anti IL-13 humana antagonista o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-13 humana, en la que dicho anticuerpo compete con un anticuerpo producido por el hibridoma 228B/C-1 (PTA-5657) para unirse a IL-13. Además, se proporciona una composición para su uso en el diagnóstico de un cáncer o tumor en una muestra biológica, en la que el cáncer y/o tumor sobreexpresa IL-13, que comprende un anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-13 humana, en la que dicho anticuerpo compete con un anticuerpo producido por el hibridoma 228B/C-1 (PTA-5657) para unirse a IL-13. Los anticuerpos útiles en la presente invención comprenden anticuerpos anti-IL13 antagonistas novedosos que se unen específicamente y con alta afinidad a IL-13 humana tanto glicosilada como no-glicosilada; en la que dicho anticuerpo compete con un anticuerpo producido por el hibridoma 228B/C-1 (PTA-5657) para unirse a IL-13; no se unen a IL13 de ratón, y neutralizan la actividad de IL13 humana a una razón molar aproximada de 1:2 (Acm:IL13). También se incluyen en la presente invención anticuerpos que comprenden las regiones de unión a antígeno derivadas de las regiones variables de cadena pesada y/o ligera de dichos anticuerpos. Los anticuerpos de la invención pueden ser monoclonales, y un anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico o un

anticuerpo humanizado.

Ejemplos de estos anticuerpos son 228B/C-1, 228A-4, 227-26 y 227-43. Los hibridomas que producen estos anticuerpos se depositaron el 20 de noviembre de 2003, con la American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, con los números de registro PTA-5657, PTA-5656, PTA-5654 y PTA-5655, respectivamente. Estos anticuerpos pueden seleccionarse como diana una célula tumoral que expresa IL-13 *in vivo*. Estos anticuerpos se describen en una solicitud de patente en tramitación junto con la presente (documento WO 2005/062967, presentado el 23 de diciembre de 2004).

Los anticuerpos útiles en la presente invención también incluyen anticuerpos que tienen una secuencia VL al menos homóloga en un 95% a la expuesta en SEQ ID NO: 3, y una secuencia VH al menos homóloga en un 95% a la expuesta en SEQ ID NO: 4; anticuerpos que tienen una secuencia VL al menos homóloga en un 95% a la expuesta en SEQ ID NO: 5, y una secuencia VH al menos homóloga en un 95% a la expuesta en SEQ ID NO: 6; y anticuerpos que tienen una secuencia VL al menos homóloga en un 95% a la expuesta en SEQ ID NO: 7, y una secuencia VH al menos homóloga en un 95% a la expuesta en SEQ ID NO: 8. La presente invención también incluye una molécula de anticuerpo recombinante, o un fragmento de unión a IL-13 del mismo, que comprende al menos una cadena pesada de anticuerpo, o un fragmento de unión a IL-13 del mismo, que comprende CDR no humanas en las posiciones 31-35 (CDR1), 50-65 (CDR2) y 95-102 (CDR3) (numeración de Kabat) procedentes de un anticuerpo anti-IL13 de ratón, en la que las posiciones 27-30 tienen los aminoácidos Gly 26, Phe 27, Ser 28, Leu 29, Asn 30, (SEQ ID NO: 18); y al menos una cadena ligera de anticuerpo, o un fragmento de unión a IL-13 del mismo, que comprende CDR no humanas en las posiciones 24-34 (CDR1), 50-56 (CDR2) y 89-97 (CDR3) procedentes de un anticuerpo anti-IL13 de ratón, y regiones de entramado procedentes de un anticuerpo monoclonal humano.

Los anticuerpos útiles en la presente invención también incluyen fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno humano de los anticuerpos de la presente invención incluyendo, pero sin limitarse a, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, Fv unidos por puentes disulfuro (sdFv). La invención también incluye anticuerpos de dominio único que comprenden un dominio o bien VL o bien VH. Un ejemplo es un scFv que tiene la secuencia tal como se expone en SEQ ID NO 152.

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

Adicionalmente, los anticuerpos incluidos comprenden moléculas de anticuerpo recombinante en los que la cadena ligera variable se elige de una cualquiera de SEQ ID NOS: 3, 5, 7, 93, 95, 97, 142, 144 y 150, y una cadena pesada variable que se elige de una cualquiera de SEQ ID NOS: 4, 6, 8, 94, 96, 98, 143, 145, 146, 147, 148 y 149. Un anticuerpo particular comprende la cadena ligera variable que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 142, y una cadena pesada variable que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 143.

Se mapeó el epítipo de unión del Acm 228B/C-1 a un sitio único en IL13 responsable de la interacción con IL4R α , que constituye parte del complejo IL13R multimérico. Este sitio de unión en IL13 está distante del sitio responsable de la interacción de IL13R, y por tanto, 228B/C-1 puede unirse a IL13 unida en células tumorales que sobreexpresan IL13R. Se proporcionan también anticuerpos que compiten para unirse al mismo epítipo reconocido por cualquiera de los anticuerpos monoclonales mencionados anteriormente. La presente invención también incluye anticuerpos que se unen al mismo epítipo que 228B/C-1. Los péptidos de epítipo incluyen un péptido que comprende o que consiste esencialmente en ESUNVSG (SEQ ID NO: 18) o YCAALESLINVS (SEQ ID NO: 19).

En otra realización, se proporciona un anticuerpo monoclonal anti-IL13 aislado que inhibe el crecimiento de células cancerosas que expresan IL-13 *in vivo*, o es citotóxico *in vivo*, para tales células y tumores que contienen tales células. La invención proporciona anticuerpos anti-IL13 que se conjugan con un agente citotóxico o con un agente inhibidor del crecimiento. El agente citotóxico puede ser una toxina, fármaco de moléculas pequeñas citotóxico, isótopo radiactivo de alta energía, fármaco fotoactivable, proteína o fármaco pro-apoptóticos, enzima citolítica o nucleolítica.

Los anticuerpos útiles en la presente invención pueden comprender una región constante de IgG1 humana, que

puede mediar la destrucción de células tumorales mediante citólisis mediada por complemento (CMC) y citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). Un anticuerpo de este tipo también puede suprimir el crecimiento de tumores que es dependiente de IL13.

5 Los anticuerpos anti-IL13 de las realizaciones anteriores incluyen anticuerpos intactos (longitud completa) así como fragmentos de anticuerpo. En una realización, el anticuerpo anti-IL13 de cualquiera de las realizaciones anteriores es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano, fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno humanos de los anticuerpos de la presente invención incluyendo, pero sin limitarse a, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, Fv unidos por puentes disulfuro (sdFv). La invención también incluye anticuerpos de dominio único que comprenden un dominio o bien VL o bien VH. Un ejemplo es un scFv que tiene la secuencia de SEQ ID NO 152.

La invención también abarca el uso de una composición que comprende uno cualquiera de los anticuerpos anti-IL13 de las realizaciones anteriores, y un portador, en los métodos de la presente invención. El portador es un portador farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones pueden proporcionarse en un artículo de fabricación o un kit para el tratamiento de cáncer.

15 Aún un aspecto separado de la invención es un método de destrucción de una célula cancerosa que expresa IL13, que comprende poner en contacto la célula cancerosa con un anticuerpo anti-IL13 de cualquiera de las realizaciones anteriores, destruyendo de ese modo la célula cancerosa. Otro aspecto es un método de alivio o tratamiento de un cáncer que expresa IL13 en un mamífero, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de los anticuerpos anti-IL13 de la invención al mamífero. En realizaciones de los métodos anteriores, el cáncer es carcinoma de células renales, glioma, tumores cerebrales, linfoma de Hodgkins, u otros tumores o cánceres que expresan el receptor de IL13 en su superficie. En una realización preferida de estos métodos, el anticuerpo anti-IL13 es un anticuerpo humano o uno humanizado. En otra realización preferida, el anticuerpo se conjuga con un agente citotóxico tal como una toxina o un isótopo radiactivo y un agente citostático tal como inhibidores para cinasas dependientes de ciclina.

25 El método de alivio del cáncer que expresa IL13 prevé la administración del anticuerpo anti-IL13 en combinación con otras formas de tratamiento de cáncer, tales como radioterapia y quimioterapia. Por último, el mamífero también recibe al menos un agente quimioterápico. En una realización específica, el agente quimioterápico es aquel en el que la quimioterapia se selecciona del grupo de fármacos tales como, pero sin limitarse a, doxorubicina, 5-fluorouracilo, arabinósido de citocina, ciclofosfamida, tiotepa, busulfano, citoxina, taxol, metotrexato, cisplatino, melfalano, vinblastina, bleomicina y carboplatino. En otra realización específica, el anticuerpo anti-IL13 puede usarse conjuntamente con otros anticuerpos anti-tumorales tales como, pero sin limitarse a, Acm anti-VEGF, Acm anti-Her2, Acm anti-EGFR, Acm anti-EpCam, Acm anti-angiósido, Acm anti-factor tisular y Acm anti-integrina.

35 En un aspecto adicional, se describe un artículo de fabricación que comprende un envase y una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un anticuerpo anti-IL13 de las realizaciones anteriores, y que comprende además un prospecto que indica que la composición puede usarse para aliviar o tratar un cáncer que expresa IL13.

Otro aspecto de la invención comprende diagnosticar un cáncer o tumor que sobreexpresa IL13 que comprende el uso de los anticuerpos anti-IL13 de la presente invención para detectar la sobreexpresión de IL13 en la muestra biológica tomada de un paciente del que se sospecha que tiene dicho cáncer o tumor.

40 **Breve descripción de las figuras**

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

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

La figura 3 ilustra que no existe inhibición de unión de Acm 228B/C-1 a IL13 humana por el Acm JES10-5A2 (Pharming).

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

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

50 La figura 6 ilustra el efecto de anticuerpos monoclonales anti-IL13 en la regulación por incremento inducida por IL13 de la expresión de CD23 en monocitos humanos.

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

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

La figura 9 representa las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de varios anticuerpos humanizados derivados del anticuerpo monoclonal 228 B/C-1.

Descripción detallada

- 5 Esta invención no se limita a la metodología, protocolos, líneas celulares, vectores o reactivos particulares descritos en el presente documento porque pueden variar. Además, la terminología usada en el presente documento es con el fin de describir solamente realizaciones particulares y no pretende limitar el alcance de la presente invención. Tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen la referencia en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario, por ejemplo, la referencia a “una célula huésped” incluye una pluralidad de tales células huésped.
- 10 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos y cualquier acrónimo usado en el presente documento tienen los mismos significados que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica en el campo de la invención. Aunque puede usarse cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica de la presente invención, los métodos, dispositivos y materiales se describen en el presente documento.
- 15 El término “anticuerpo,” tal como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une de manera inmuno-específica a un antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. Además, el término “anticuerpo” (Ac) o “anticuerpo monoclonal” (Acm) pretende incluir moléculas intactas, así como fragmentos de anticuerpo (tales como, por ejemplo, fragmentos Fab y F(ab')₂) que pueden unirse específicamente a proteínas. Los fragmentos de Fab y F(ab')₂ carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación del animal o planta, y pueden tener menos unión de tejido no específico que un anticuerpo intacto (Wahl *et al.*, J. Nucl. Med. 24:316-325 (1983)).
- 20 Tal como se usa en el presente documento, los anticuerpos “humanos” incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulina humana o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, tal como se describe más adelante y, por ejemplo en la patente estadounidense n.º 5.939.598 por Kucherlapati *et al.*
- 30 Las “funciones efectoras” del anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas que se atribuyen a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o región Fc variante en la secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo, y varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras del anticuerpo incluyen: citotoxicidad dependiente de complemento y unión a C1q; unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de la superficie celular (por ejemplo receptor de células B); y activación de células B.
- 35 La “citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos” o “ADCC” se refiere a una forma de citotoxicidad en la que las Ig secretadas unidas a receptores gamma de Fc (FcγRs) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permiten a estas células efectoras citotóxicas unirse específicamente a una célula diana que porta antígenos y posteriormente destruir la célula diana con enzimas celulares o radicales libres oxidativos. Los anticuerpos “arman” las células citotóxicas y se requieren para tal destrucción. Las principales células para mediar la ADCC, las células NK, expresan sólo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el que se describe más adelante. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK).
- 40 Alternativa o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el que se da a conocer en Clynes *et al.* PNAS (E.E.U.U) 95:652-656 (1998).

Inmunógeno

- 50 Se usó IL13 recombinante para inmunizar ratones para generar los hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales de la presente invención. IL13 recombinante está comercialmente disponible a partir de varias fuentes (véase, por ejemplo R & D Systems, Minneapolis, MN, PeprTech, Inc., NJ, y Sanofi Bio-Industries, Inc., Tervose, PA.). Alternativamente, puede clonarse un gen o un ADNc que codifica para IL13 en un plásmido u otro vector de expresión y expresarse en cualquiera de una serie de sistemas de expresión según métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Se conocen bien métodos de clonación y expresión de IL13 y la secuencia de ácido nucleico para IL13 (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.652.123). Debido a la degeneración del código genético, pueden producirse una multitud de secuencias nucleotídicas que codifican para polipéptidos IL13. Puede variarse la secuencia nucleotídica seleccionando combinaciones basadas en elecciones de codón posibles. Estas combinaciones se realizan según el código genético en tripletes convencional tal como se aplica a la secuencia nucleotídica que codifica para el polipéptido IL13 que se produce de manera natural y han de considerarse todas las

variaciones de este tipo. Puede usarse uno cualquiera de estos polipéptidos en la inmunización de un animal para generar anticuerpos que se unen a IL13.

El polipéptido IL13 inmunógeno puede expresarse, cuando resulta beneficioso, como proteína de fusión que tiene el polipéptido IL13 unido a un segmento de fusión. El segmento de fusión ayuda a menudo en la purificación de proteínas, por ejemplo, permitiendo que la proteína de fusión se aísle y purifique mediante cromatografía de afinidad. Las proteínas de fusión pueden producirse cultivando una célula recombinante transformada con una secuencia de ácido nucleico de fusión que codifica para una proteína que incluye el segmento de fusión unido a o bien el extremo carboxilo terminal y/o bien el extremo amino terminal de la proteína. Los segmentos de fusión pueden incluir, pero sin limitarse a, regiones Fc de inmunoglobulina, glutatión-S-transferasa, β -galactosidasa, un segmento de polihistidina que puede unirse a un ión metálico divalente, y proteína de unión a maltosa.

Se usó una proteína de fusión que comprende una forma mutante de IL13 humana para generar los anticuerpos de la presente invención. Esta forma mutante de IL13 contenía una mutación única que daba como resultado una forma inactiva de la proteína (Thompson *et al.*, J. Biol. Chem. 274: 2994 (1999)). Con el fin de generar anticuerpos neutralizantes con alta afinidad, la proteína de fusión comprendía la proteína IL13 mutante fusionada a una región Fc de inmunoglobulina, específicamente IgG1, y se expresó en una línea celular de mamífero de modo que la proteína recombinante estaba glicosilada de manera natural. La parte Fc de la proteína de fusión puede haber proporcionado una estructura conformacional que expuso un epítipo clave. La glicosilación puede haber aumentado la inmunogenicidad del epítipo, permitiendo la generación de anticuerpos frente a este epítipo particular.

Los polipéptidos IL13 expresados en *E. coli* carecen de glicosilación y los anticuerpos comercialmente disponibles sometidos a prueba se generaron usando esta proteína. Se sometieron a prueba estos anticuerpos, por ejemplo, R&D Systems and Pharmingen, y se encontró que no reaccionan de manera cruzada con el epítipo unido mediante los anticuerpos de la presente invención.

Generación de anticuerpos

Los anticuerpos de la presente invención pueden generarse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender anticuerpos policlonales. El experto en la técnica conoce los métodos de preparación de anticuerpos policlonales (Harlow, *et al.*, Antibodies: a Laboratory Manual, (Cold spring Harbor Laboratory Press, 2^a ed. (1988)).

Por ejemplo, un inmunógeno tal como se describió anteriormente puede administrarse a diversos animales huésped incluyendo, pero sin limitarse a, conejos, ratones, ratas, etc., para inducir la producción de sueros que contienen anticuerpos policlonales específicos para el antígeno. La administración del inmunógeno puede suponer una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Pueden usarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie huésped, e incluyen pero sin limitarse a, adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol, y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Los ejemplos adicionales de adyuvantes que pueden emplearse incluyen el adyuvante MPL-TDM (monofosforil-lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). Los protocolos de inmunización son bien conocidos en la técnica y pueden realizarse mediante cualquier método que provoque una respuesta inmunitaria en el huésped animal elegido. Los adyuvantes también son bien conocidos en la técnica.

Normalmente, el inmunógeno (con o sin adyuvante) se inyecta en el mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales, o por vía intramuscular o a través de la vía i.v.. El inmunógeno puede incluir un polipéptido IL13, una proteína de fusión o variantes de los mismos. Dependiendo de la naturaleza de los polipéptidos (es decir, del porcentaje de hidrofobicidad, porcentaje de hidrofiliidad, estabilidad, carga neta, punto isoeléctrico etc.), puede ser útil conjugar el inmunógeno con una proteína conocida para que sea inmunogénica en el mamífero que se está inmunizando. Tal conjugación incluye o bien conjugación química derivatizando grupos funcionales químicos activos tanto en el inmunógeno como en la proteína inmunogénica que va a conjugarse de modo que se forme un enlace covalente, o bien a través de metodología basada en proteína de fusión, u otros métodos conocidos por el experto en la técnica. Los ejemplos de tales proteínas inmunogénicas incluyen, pero sin limitarse a, hemocianina de lapa californiana, ovoalbúmina, albúmina sérica, tiroglobulina bovina, inhibidor de tripsina de soja y péptidos auxiliares T de unión a distintos ligandos. Pueden usarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica tal como se describió anteriormente.

Los anticuerpos de la presente invención comprenden anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando tecnología de hibridoma, tal como la descrita por Kohler y Milstein, Nature, 256:495 (1975) y la patente estadounidense n.º 4.376.110, por Harlow, *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold spring Harbor Laboratory Press, 2^{sup}.nd ed. (1988), por Hammerling, *et al.*, Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas (Elsevier, N.Y., (1981)), u otros métodos conocidos por el experto. Otros ejemplos de métodos que pueden emplearse para producir anticuerpos monoclonales incluyen, pero sin limitarse a, la técnica de hibridomas de células B humanas (Kosbor *et al.*, 1983, Immunology Today 4:72; Cole *et al.*, 1983, Proc. Natl. Acad. Sc. E.E.U.U 80:2026-2030), y la técnica de EBV-hibridoma (Cole *et al.*, 1985, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss,

Inc., págs. 77-96). Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de las mismas. El hibridoma que produce el AcM de esta invención puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*.

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

10 Generalmente, cuando se elaboran hibridomas que producen anticuerpos, o bien se usan linfocitos de sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano, o bien se usan células del bazo o células de ganglio linfático si se desean fuentes de mamífero no humano. Entonces los linfocitos se fusionan con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986), págs. 59-103). Las líneas celulares inmortalizadas son habitualmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen de roedor, bovino o humano. Normalmente, se emplea una línea celular de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células originales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá normalmente hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), sustancias que impiden el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

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

30 Luego el medio de cultivo en el que las células de hibridoma se cultivan puede someterse a ensayo para determinar la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la IL13. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producida por las células de hibridoma se determina mediante, por ejemplo, inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoabsorción unido a enzimas (ELISA). Tales técnicas se conocen en la técnica y están dentro de la habilidad del experto. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal a IL13 puede determinarse, por ejemplo, mediante un análisis Scatchard (Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)).

35 Una vez identificadas las células de hibridoma deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y crecimiento mediante métodos convencionales (Goding, citado anteriormente). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco y RPMI-1640. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden aislarse o purificarse del medio de cultivo mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxipatito, cromatografía de exclusión en gel, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

45 Existen en la técnica una variedad de métodos para la producción de anticuerpos monoclonales y por tanto, la invención no se limita a su exclusiva producción en hibridomas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse mediante métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en la patente estadounidense n.º 4.816.567. En este contexto, el término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo derivado de un único clon de eucariota, fago o procariota. El ADN que codifica para los anticuerpos monoclonales de la invención puede aislarse y secuenciarse rápidamente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótido que pueden unirse específicamente a genes que codifican para las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos, o tales cadenas de fuentes humanas, humanizadas, u otras). Las células de hibridoma de la invención sirven como una fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede situarse en vectores de expresión, que luego se transforman en células huésped tales como células NSO, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen proteína de inmunoglobulina de otro modo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para los dominios constantes de las cadenas pesadas y ligeras humanas en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente estadounidense n.º 4.816.567; Morrison *et al.*, citado anteriormente) o mediante unión de manera covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulinas de toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido distinto de inmunoglobulina. Un polipéptido distinto de inmunoglobulina de este tipo puede sustituirse por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o puede sustituirse por los dominios variables de un sitio de combinación a antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Los métodos para preparar anticuerpos monovalentes se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de la cadena ligera y la cadena pesada modificada de inmunoglobulina. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto en la región Fc de modo que se impide que la cadena pesada se reticule. Alternativamente, los residuos de cisteína relevantes se sustituyen por otro residuo de aminoácido o se eliminan de modo que se impide la reticulación.

Pueden generarse fragmentos de anticuerpo que reconocen epítomos específicos mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')₂ de la invención pueden producirse mediante escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos de Fab) o pepsina (para producir fragmentos de F(ab')₂). Los fragmentos de F(ab')₂ contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio de CH1 de la cadena pesada.

Para algunos usos, incluyendo el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos y ensayos de detección *in vitro*, puede ser preferible usar anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes partes del anticuerpo se derivan de diferentes especies animales, tales como anticuerpos que tienen una región variable que se deriva de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos quiméricos. Véanse por ejemplo, Morrison, *Science* 229:1202 (1985); Oi *et al.*, *BioTechniques* 4:214 (1986); Gillies *et al.*, (1989) *J. Immunol. Methods* 125:191-202; patentes estadounidenses n.ºs. 5.807.715; 4.816.567 y 4.816.397.

Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo generadas en una especie no humana que se une al antígeno deseado que tiene una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la especie no humana y regiones de entramado (FR) de una molécula de inmunoglobulina humana. A menudo, los residuos de entramado en las regiones de entramado humanas se sustituirán por el residuo correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, preferiblemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones de entramado se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante modelado de las interacciones de los residuos de CDR y entramado para identificar residuos de entramado importantes para la unión a antígeno y comparación de secuencias para identificar residuos de entramado inusuales en posiciones particulares. (Véanse, por ejemplo, Queen *et al.*, patente estadounidense n.º 5.585.089; Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323 (1988)). Los anticuerpos pueden humanizarse usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica incluyendo, por ejemplo, injerto de CDR (documento EP 239,400; publicación PCT WO 91/09967; patentes estadounidenses n.ºs. 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), revestimiento o renovación de superficie (documento EP 592.106; documento EP 519.596; Padlan, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka *et al.*, *Protein Engineering* 7(6):805-814 (1994); Roguska. *et al.*, *PNAS* 91:969-973 (1994)), e intercambio de cadenas (patente estadounidense n.º 5.565.332).

Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan a menudo residuos "de importación", que se obtienen normalmente de un dominio variable "de importación". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo los métodos de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988), sustituyendo CDR de roedor o secuencias de CDR para las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente estadounidense n.º 4.816.667), en los que se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

Se desean particularmente anticuerpos completamente humanos para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos pueden obtenerse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica incluyendo métodos de presentación en fagos descritos anteriormente usando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. Véanse también, las patentes estadounidenses n.ºs. 4.444.887 y 4.716.111; y publicaciones PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741. Las técnicas de Cole *et al.*, y Boerder *et al.*, también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, *Monoclonales Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Riss, (1985); y Boemer *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1): 86-95, (1991)).

Los anticuerpos humanos también pueden producirse usando ratones transgénicos que no pueden expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, pueden introducirse aleatoriamente o mediante recombinación homóloga complejos de genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera humana en células madre embrionarias de ratón. Alternativamente, pueden introducirse la región variable, región constante y región de diversidad humanas en células madre embrionarias de ratón además de los genes de cadena pesada y ligera humanos. Los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera de ratón pueden convertirse en no funcionales de manera separada o simultánea con la introducción de loci de inmunoglobulina humana mediante recombinación homóloga. En particular, la deleición homocigótica de la región JH impide la producción de anticuerpo endógeno. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y microinyectan en blastocistos para producir ratones quiméricos. Luego los ratones quiméricos se crían para producir descendencia homocigótica que expresa anticuerpos humanos. Los ratones

transgénicos se inmunizan de la manera normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, en su totalidad o en una parte de un polipéptido de la invención. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno pueden obtenerse de los ratones inmunizados, transgénicos usando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados por los ratones transgénicos se reorganizan durante la diferenciación de células B, y posteriormente se someten a cambio de clase y mutación somática. Por tanto, usando una técnica de este tipo, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995). Para una explicación detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir tales anticuerpos, véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; la patente europea n.º 0 598 877; las patentes estadounidenses n.ºs. 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; 5.885.793; 5.916.771; y 5.939.598. Además, compañías tales como Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.), Genpharm (San Jose, Calif.) y Medarex, Inc. (Princeton, N.J.) pueden encargarse de proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando tecnología similar a la descrita anteriormente.

Los Acm humanos también podrían obtenerse inmunizando ratones trasplantados con leucocitos de sangre periférica, esplenocitos o médulas óseas humanos (por ejemplo, técnicas de Trioma de XTL). Pueden generarse anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado usando una técnica que se denomina "selección guiada". En este enfoque, un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, se usa para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo. (Jespers *et al.*, *Bio/technology* 12:899-903 (1988)).

Además, los anticuerpos frente a los polipéptidos de la invención pueden utilizarse, a su vez, para generar anticuerpos anti-idiotipo que "imiten" a los polipéptidos de la invención usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. (Véanse, por ejemplo, Greenspan & Bona, *FASEB J.* 7(5):437-444; (1989) y Nissinoff, *J. Immunol.* 147(8):2429-2438 (1991)). Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos que se unen a e inhiben de manera competitiva la multimerización de polipéptidos y/o la unión de un polipéptido de la invención a un ligando para generar anti-idiotipos que "imiten" la multimerización de polipéptidos y/o el dominio de unión y, como consecuencia, unirse a y neutralizar el polipéptido y/o su ligando. Tales anti-idiotipos neutralizantes o fragmentos Fab de tales anti-idiotipos pueden usarse en regímenes terapéuticos para neutralizar el ligando polipeptídico. Por ejemplo, tales anticuerpos anti-idiotípicos pueden usarse para unirse a un polipéptido de la invención y/o para unirse a sus ligandos/receptores, y bloquear de ese modo su actividad biológica.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, anticuerpos que tienen especificidades de unión durante al menos dos antígenos diferentes. En la presente invención, una de las especificidades de unión puede dirigirse hacia IL13, la otra puede ser para cualquier otro antígeno, y preferiblemente para una proteína de la superficie celular, receptor, subunidad de receptor, antígeno específico de tejido, proteína derivada de manera viral, proteína de la envuelta codificada de manera viral, proteína derivada de manera bacteriana, o proteína de superficie bacteriana, etc.

Se conocen bien métodos para obtener anticuerpos biespecíficos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, en los que las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la distribución aleatoria de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulinas, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se logra habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad. Se dan a conocer procedimientos similares en el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

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

También se contemplan anticuerpos heteroconjugados por la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados se componen de dos anticuerpos unidos de manera covalente. Se ha propuesto que tales anticuerpos, por ejemplo, dirijan células del sistema inmunitario hacia células no deseadas (patente estadounidense n.º 4.676.980). Se contempla que los anticuerpos pueden prepararse *in vitro* usando métodos conocidos en química de proteínas sintéticas, incluyendo los agentes de reticulación implicados. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéster. Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los dados a conocer, por ejemplo, en la patente

estadounidense n.º 4.676.980.

Además, pueden generarse anticuerpos de dominio único frente a IL-13. Se han descrito ejemplos de esta tecnología en el documento WO9425591 para anticuerpos derivados de Ig de cadena pesada de *Camelidae*, así como en el documento US20030130496 que describe el aislamiento de anticuerpos completamente humanos de dominio único a partir de bibliotecas de fagos.

Identificación de anticuerpos anti-IL13

La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales antagonistas que inhiben y neutralizan la acción de IL13. En particular, los anticuerpos de la presente invención se unen a IL13 e inhiben la activación del complejo IL 13-receptor. Se describen además anticuerpos designados como 228A-4, 227-26 y 227-43. Los anticuerpos de la presente invención incluyen los anticuerpos designados como 228B/C-1 y se dan a conocer clones humanizados de 228B/C-1. La presente invención también incluye anticuerpos que se unen al mismo epítipo como anticuerpo monoclonal 228B/C-1.

Se sometieron a prueba anticuerpos anti-IL13 candidatos mediante ensayo de inmunoabsorción unido a enzimas (ELISA), inmunotransferencia de tipo Western, u otras técnicas inmunoquímicas. Los ensayos realizados para caracterizar los anticuerpos individuales incluían: (1) Inhibición de la proliferación de IL-13 autocrina de las líneas celulares del linfoma de Hodgkin HDLM-2 y L-1236; (2) Inhibición de la fosforilación de STAT6 inducida por IL13 en células THP-1; y (3) Inhibición de supresión inducida por IL13 de la expresión de CD14 en monocitos humanos primarios; y (4) Inhibición de regulación por incremento inducida por IL13 de la expresión de CD23 en monocitos humanos primarios. Los detalles experimentales se describen en los ejemplos.

Los anticuerpos de la invención incluyen, pero sin limitarse a, anticuerpos policlonales, monoclonales, monovalentes, biespecíficos, heteroconjugados, multiespecíficos, humanos, humanizados o quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos de dominio único, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id frente a anticuerpos de la invención), y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores.

Los anticuerpos pueden ser fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno humanos de la presente invención e incluyen, pero sin limitarse a, fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, Fv unidos por puentes disulfuro (sdFv) y anticuerpos de dominio único que comprenden un dominio o bien VL o bien VH. Los fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno, incluyendo anticuerpos de cadena sencilla, pueden comprender la(s) región/regiones variable(s) sola(s) o en combinación con la totalidad o una parte de lo siguiente: región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. También se incluyen en la invención fragmentos de unión a antígeno que comprenden cualquier combinación de región/regiones variable(s) con una región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. Los anticuerpos de la invención pueden ser de cualquier origen animal incluyendo aves y mamíferos. Preferiblemente, los anticuerpos son humanos, primates no humanos, roedores (por ejemplo, ratón y rata), burro, oveja, conejo, cabra, cobaya, camello, caballo, o pollo.

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

Los anticuerpos de la presente invención pueden describirse o especificarse en lo que se refiere a el/los epítipo(s) o parte(s) de IL13 que reconocen o a los que se unen específicamente. El/Los epítipo(s) o parte(s) de polipéptido puede(n) especificarse tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, mediante las posiciones de los extremos N-terminal y C-terminal, por tamaño en residuos de aminoácidos contiguos, o enumerados en las tablas y figuras.

Los anticuerpos de la presente invención también pueden describirse o especificarse en lo que se refiere a su reactividad cruzada. También se incluyen en la presente invención anticuerpos que se unen a polipéptidos IL13, que tienen al menos una identidad del 95%, al menos el 90%, al menos el 85%, al menos el 80%, al menos el 75%, al menos el 70%, al menos el 65%, al menos el 60%, al menos el 55%, y al menos el 50% (tal como se calcula usando métodos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento) para IL-13.

En realizaciones específicas, los anticuerpos de la presente invención reaccionan de manera cruzada con homólogos de mono de IL13 humana y los epítopos correspondientes de los mismos. En una realización específica, la reactividad cruzada descrita anteriormente es con respecto a cualquier polipéptido antigénico o inmunogénico específico individual, o combinación/combinaciones de los polipéptidos antigénicos y/o inmunogénicos específicos dados a conocer en el presente documento.

Se incluyen además en la presente invención anticuerpos que se unen a polipéptidos codificados por polinucleótidos que hibridan con un polinucleótido que codifica para IL13 en condiciones de hibridación rigurosas. Los anticuerpos

de la presente invención también pueden describirse o especificarse en lo que se refiere a su afinidad de unión a un polipéptido de la invención. Las afinidades de unión preferidas incluyen aquellas con una constante de disociación en equilibrio o K_D de desde 10^{-8} hasta 10^{-15} M. La invención también proporciona anticuerpos que inhiben de manera competitiva la unión de un anticuerpo a un epítipo de la invención tal como se determina mediante cualquier método conocido en la técnica para determinar la unión competitiva, por ejemplo, los inmunoensayos descritos en el presente documento. En realizaciones preferidas, el anticuerpo inhibe de manera competitiva la unión al epítipo en al menos el 95%, al menos el 90%, al menos el 85%, al menos el 80%, al menos el 75%, al menos el 70%, al menos el 60%, o al menos el 50%.

Se incluyen además en la presente invención anticuerpos que se unen al mismo epítipo que los anticuerpos anti-IL13 de la presente invención. Para determinar si un anticuerpo puede competir para unirse al mismo epítipo que el epítipo unido por los anticuerpos anti-IL13 de la presente invención incluyendo los anticuerpos producidos por los hibridomas depositados con la ATCC, puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado, por ejemplo, un ensayo ELISA competitivo. En un ensayo ELISA competitivo a modo de ejemplo, se preincuba IL13 recubierta en los pocillos de una placa de microtitulación con o sin anticuerpo que compite candidato y luego se añade el anticuerpo anti-IL13 marcado con biotina de la invención. La cantidad de anticuerpo anti-IL13 marcado unido al antígeno de IL13 en los pocillos se mide usando conjugado de avidina-peroxidasa y sustrato apropiado. El anticuerpo puede marcarse con un marcador radiactivo o fluorescente o algún otro marcador detectable y medible. La cantidad de anticuerpo anti-IL13 marcado que se une al antígeno tendrá una correlación indirecta con la capacidad del anticuerpo que compite candidato (anticuerpo de prueba) para competir en su unión al mismo epítipo, es decir, cuanto más grande sea la afinidad del anticuerpo de prueba para el mismo epítipo, menos unido estará el anticuerpo marcado a los pocillos recubiertos con antígeno. Un anticuerpo que compite candidato se considera un anticuerpo que se une sustancialmente al mismo epítipo o que compite para unirse al mismo epítipo que un anticuerpo anti-IL13 de la invención si el anticuerpo candidato puede bloquear la unión del anticuerpo IL13 en al menos el 20%, preferiblemente en al menos el 20-50%, incluso más preferiblemente, en al menos el 50% en comparación con el control realizado en paralelo en ausencia del anticuerpo que compite candidato. Se entenderá que pueden realizarse variaciones de este ensayo para llegar al mismo valor cuantitativo.

Vectores y células huésped

En otro aspecto, la presente descripción proporciona constructos de vector que comprenden una secuencia nucleotídica que codifica para los anticuerpos de la presente invención y una célula huésped que comprende un vector de este tipo. Pueden usarse técnicas convencionales para clonación y transformación en la preparación de líneas celulares que expresan los anticuerpos de la presente invención.

Los vectores de expresión recombinantes que contienen una secuencia nucleotídica que codifica para los anticuerpos de la presente invención pueden prepararse usando técnicas bien conocidas. Los vectores de expresión incluyen una secuencia nucleotídica operativamente unida a secuencias nucleotídicas reguladoras de la transcripción o la traducción tales como las derivadas de genes de mamíferos, microbianos, virales, o de insecto. Los ejemplos de secuencias reguladoras incluyen promotores transcripcionales, operadores, potenciadores, sitios de unión a ribosomas del ARNm, y/u otras secuencias apropiadas que controlan el inicio y la terminación de la transcripción y la traducción. Las secuencias nucleotídicas están "operativamente unidas" cuando la secuencia reguladora se refiere de manera funcional a la secuencia nucleotídica para el polipéptido apropiado. Por tanto, una secuencia nucleotídica promotora está operativamente unida a, por ejemplo, la secuencia de cadena pesada del anticuerpo si la secuencia nucleotídica promotora controla la transcripción de la secuencia nucleotídica apropiada.

Además, pueden incorporarse secuencias que codifica para péptidos señal apropiados que no se asocian de manera natural con secuencias de cadena pesada y/o ligera del anticuerpo en vectores de expresión. Por ejemplo, una secuencia nucleotídica para un péptido señal (líder secretor) puede fusionarse en marco a la secuencia polipeptídica de modo que el anticuerpo se secreta al espacio periplásmico o al interior del medio. Un péptido señal que es funcional en las células huésped pretendidas potencia la secreción extracelular del anticuerpo apropiado. El péptido señal puede escindirse del polipéptido tras la secreción del anticuerpo a partir de la célula. Los ejemplos de tales señales secretoras son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, los descritos en los documentos US5698435, US5698417 y US6204023.

Las células huésped incluyen, pero sin limitarse a, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con ADN de bacteriófago recombinante, vectores de expresión de ADN cósmido y ADN plásmido que contienen secuencias que codifican para anticuerpos; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias que codifican para anticuerpos; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, Baculovirus) que contienen secuencias que codifican para anticuerpos; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmido recombinante (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias que codifican para anticuerpos; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, 3T3) que albergan constructos de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus, el promotor 7.5K del virus vaccinia).

El vector puede ser un vector de plásmido, un vector de fago mono o bicatenario, o un vector viral de ARN o ADN mono o bicatenario. Tales vectores pueden introducirse en células como polinucleótidos mediante técnicas bien conocidas para introducir ADN y ARN en las células. Los vectores, en el caso de vectores de fago y virales también pueden introducirse en células como virus empaquetados o encapsulados mediante técnicas bien conocidas para la infección y transducción. Los vectores virales pueden ser competentes en la replicación o defectuosos en la replicación. En el último caso, la propagación viral se producirá generalmente sólo en células huésped de complementación. También pueden emplearse sistemas de traducción libres de células para producir la proteína usando ARN derivados de los constructos de ADN presentes. Tales vectores pueden incluir la secuencia nucleotídica que codifica para la región constante de la molécula de anticuerpo (véanse, por ejemplo, la publicación PCT WO 86/05607; la publicación PCT WO 89/01036; y la patente estadounidense n.º 5.122.464) y el dominio variable del anticuerpo puede clonarse en un vector de este tipo para la expresión de la cadena pesada o ligera completa.

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

Las levaduras incluyen las del género *Saccharomyces*, *Pichia*, *Actinomyces* y *Kluyveromyces*. Los vectores de levadura contendrán a menudo una secuencia de origen de replicación a partir de un plásmido de levadura de 2 μ , una secuencia de replicación de manera autónoma (ARS), una región promotora, secuencias para poliadenilación, secuencias para terminación de la transcripción, y un gen marcador de selección. Las secuencias promotoras adecuadas para vectores de levadura incluyen, entre otros, promotores para metalotioneína, 3-fosfoglicerato cinasa (Hitzeman *et al.*, J. Biol. Chem. 255:2073, (1980)) u otras enzimas glicolíticas (Holland *et al.*, Biochem. 17:4900, (1978)) tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa, y glucocinasa. Se describen además otros vectores y promotores adecuados para su uso en la expresión en levaduras en Fleer *et al.*, Gene, 107:285-195 (1991). Otros promotores y vectores adecuados para levaduras y protocolos de transformación de levaduras se conocen bien en la técnica. Se conocen bien los protocolos de transformación de levaduras. Un protocolo de este tipo se describe por Hinnen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 75:1929 (1978). El protocolo Hinnen selecciona para transformantes *Trp*⁺ en un medio selectivo.

También pueden emplearse sistemas de cultivo de células huésped de mamífero o insecto para expresar anticuerpos recombinantes, por ejemplo, sistemas de Baculovirus para la producción de proteínas heterólogas. En un sistema de insectos, puede usarse el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como un vector para expresar genes foráneos. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia que codifica para el anticuerpo puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo el gen de polihedrina) del virus y colocarse bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo el promotor de polihedrina).

Pueden usarse células de NSO o de ovario de hámster chino (CHO) para la expresión en mamíferos de los anticuerpos de la presente invención. Pueden escindirse secuencias de control de la transcripción y la traducción para vectores de expresión en células huésped de mamífero a partir de genomas virales. Las secuencias promotoras y secuencias de potenciador comúnmente usadas se derivan del virus Polyoma, Adenovirus 2, Virus 40 del simio (SV40), y citomegalovirus humano (CMV). Pueden usarse secuencias de ADN derivadas del genoma viral de SV40 para proporcionar otros elementos genéticos para la expresión de una secuencia de genes estructurales en una célula huésped de mamífero, por ejemplo, origen, promotor temprano y tardío, potenciador, corte y empalme, y sitios de poliadenilación de SV40. Los promotores temprano y tardío virales son particularmente útiles debido a que ambos se obtienen fácilmente a partir de un genoma viral como un fragmento que también puede contener un origen de replicación viral. Están comercialmente disponibles vectores de expresión a modo de ejemplo para su uso en células huésped de mamífero.

Polinucleótidos que codifica para anticuerpos

La descripción proporciona además polinucleótidos que comprenden una secuencia nucleotídica que codifica para un anticuerpo de la invención y fragmentos del mismo. La descripción también abarca polinucleótidos tal como se definen en las reivindicaciones que hibridan en condiciones de hibridación rigurosas o de baja rigurosidad con polinucleótidos que codifican para un anticuerpo de la presente invención.

Los polinucleótidos pueden obtenerse, y determinarse la secuencia nucleotídica de los polinucleótidos, mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, si la secuencia nucleotídica del anticuerpo es conocida, puede constituirse un polinucleótido que codifica para el anticuerpo a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (por ejemplo, tal como se describe en Kutmeier *et al.*, BioTechniques 17242 (1994)), que, brevemente, implica la síntesis de oligonucleótidos solapantes que contienen partes de la secuencia que codifica para el anticuerpo, la hibridación y ligamiento de esos oligonucleótidos, y luego la amplificación de los oligonucleótidos ligados mediante PCR.

Alternativamente, puede generarse un polinucleótido que codifica para un anticuerpo a partir de un ácido nucleico de una fuente adecuada. Si no se dispone de un clon que contiene un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo particular, pero se conoce la secuencia de la molécula de anticuerpo, puede sintetizarse químicamente un ácido nucleico que codifica para la inmunoglobulina u obtenerse a partir de una fuente adecuada (por ejemplo, una biblioteca de ADNc de anticuerpo, o una biblioteca de ADNc generada a partir de, o bien ácido nucleico, preferiblemente ARN poli A⁺, aislado de cualquier tejido o células que expresan el anticuerpo, tal como células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo de la invención) mediante amplificación por PCR usando cebadores sintéticos que pueden hibridar con los extremos 3' y 5' de la secuencia, o bien mediante clonación usando una sonda oligonucleotídica específica para la secuencia génica particular para identificar, por ejemplo, un clon de ADNc de una biblioteca de ADNc que codifica para el anticuerpo. Luego pueden clonarse los ácidos nucleicos amplificados generados mediante PCR en vectores de clonación que pueden replicarse usando cualquier método bien conocido en la técnica.

Una vez que se determina la secuencia nucleotídica y la secuencia de aminoácidos correspondiente del anticuerpo, la secuencia nucleotídica del anticuerpo puede manipularse usando métodos bien conocidos en la técnica para la manipulación de secuencias nucleotídicas, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida al sitio, PCR, etc. (véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2^a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. y Ausubel *et al.*, eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY), para generar anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo para crear sustituciones de aminoácidos, deleciones y/o inserciones.

Puede inspeccionarse la secuencia de aminoácidos de los dominios variables de cadena pesada y/o ligera para identificar las secuencias de las CDR mediante métodos bien conocidos, por ejemplo, mediante comparación con secuencias de aminoácidos conocidas de otras regiones variables de cadena pesada y ligera para determinar las regiones de hipervariabilidad de secuencia. Usando técnicas de ADN recombinante de rutina, pueden insertarse una o más de las CDR dentro de regiones de entramado, por ejemplo, en regiones de entramado humanas para humanizar un anticuerpo no humano, tal como se describió y citó anteriormente. Las regiones de entramado pueden ser regiones de entramado consenso o que se producen de manera natural, y preferiblemente regiones de entramado humanas (véase, por ejemplo, Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 278: 457-479 (1998) para una enumeración de regiones de entramado humanas). Preferiblemente, el polinucleótido generado por la combinación de las regiones de entramado y CDR codifica para un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de la descripción. Preferiblemente, tal como se trató y citó anteriormente, pueden hacerse una o más sustituciones de aminoácidos dentro de las regiones de entramado, y, preferiblemente, las sustituciones de aminoácidos mejoran la unión del anticuerpo a su antígeno. Adicionalmente, pueden usarse tales métodos para hacer sustituciones o deleciones de aminoácidos de uno o más residuos de cisteína de región variable que participan en un enlace disulfuro dentro de la cadena para generar moléculas de anticuerpo que carecen de uno o más enlaces disulfuro dentro de la cadena. Se abarcan otras alteraciones al polinucleótido por la presente descripción y dentro de la experiencia de la técnica.

Además, pueden usarse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855 (1984); Neuberger *et al.*, Nature 312:604-608 (1984); Takeda *et al.*, Nature 314:452-454 (1985)) mediante el corte y empalme de genes a partir de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad de antígeno apropiada junto con genes a partir de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada. Tal como se describió anteriormente, un anticuerpo quimérico es una molécula en la que partes diferentes se derivan de diferentes especies animales, tales como las que tienen una región variable derivada de un Acm murino y una región constante de inmunoglobulina humana, por ejemplo, los anticuerpos humanizados.

Alternativamente, pueden adaptarse técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (patente estadounidense n.º 4.946.778; Bird, Science 242:423-42 (1988); Huston *et al.*, Prog Natl. Acad. Sci. E.E.U.U 85:5879-5883 (1988); y Ward *et al.*, Nature 334: 544-54 (1989)) para producir anticuerpos de cadena sencilla. Los anticuerpos de cadena sencilla se forman uniendo los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv mediante un puente de aminoácidos, dando como resultado un polipéptido de cadena sencilla. También pueden usarse técnicas para la constitución de fragmentos Fv funcionales en *E. coli* (Skerra *et al.*, Science 242:1038-1041 (1988)).

Métodos de producción de anticuerpos anti-IL13

Los anticuerpos de la invención pueden producirse mediante cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular, mediante síntesis química o preferiblemente, mediante técnicas de expresión recombinante.

La expresión recombinante de un anticuerpo de la invención, o fragmento, derivado o análogo del mismo, (por ejemplo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo de la invención o un anticuerpo de cadena sencilla de la invención), requiere de la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica para el anticuerpo o un fragmento del anticuerpo. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica para una molécula de anticuerpo, el vector para la producción del anticuerpo puede producirse mediante tecnología de ADN recombinante. Se construye un vector de expresión que contiene secuencias que codifican para anticuerpos y señales de control de la transcripción y la traducción apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas, y recombinación genética *in vivo*.

El vector de expresión se transfiere a una célula huésped mediante técnicas convencionales y luego las células transfectadas se cultivan mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo de la invención. Los vectores que codifican para las cadenas tanto pesada como ligera pueden coexpresarse en la célula huésped para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa, tal como se detalla a continuación.

Pueden utilizarse una variedad de sistemas de vector de expresión en huésped para expresar las moléculas de anticuerpo de la invención tal como se describió anteriormente. Tales sistemas de expresión en huésped representan vehículos mediante los cuales pueden producirse las secuencias codificantes de interés y posteriormente purificarse, pero también representan células que pueden expresar, cuando se transforman o transfecan con las secuencias que codifican para nucleótidos apropiadas, un molécula de anticuerpo de la invención *in situ*. Las células bacterianas tales como *E. coli*, y células eucariotas se usan comúnmente para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante, especialmente para la expresión de la molécula de anticuerpo recombinante entera. Por ejemplo, células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO), conjuntamente con un vector tal como el elemento promotor génico temprano intermedio principal procedente del citomegalovirus humano son un sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foecking *et al.*, Gen 45:101 (1986); Cockett *et al.*, Bio/Technology 8:2 (1990)).

Además, puede elegirse una variedad de célula huésped que module la expresión de las secuencias insertadas, o que modifique y procese el producto génico de la manera específica deseada. Tales modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos de proteína pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento tra la traducción y la modificación de proteínas y productos génicos. Pueden elegirse líneas celulares o sistemas de huésped apropiados para garantizar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína foránea expresada. Para este fin, pueden usarse células huésped eucariotas que poseen la maquinaria celular para un procesamiento apropiado del transcrito primario, glicosilación, y fosforilación del producto génico. Tales células huésped de mamífero incluyen, pero sin limitarse a, células CHO, COS, 293, 3T3, o células de mieloma.

Para la producción a largo plazo, de alto rendimiento de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, pueden modificarse mediante ingeniería genética líneas celulares que expresan de manera estable la molécula de anticuerpo. En vez de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales, las células huésped pueden transformarse con ADN controlado mediante elementos de control de expresión apropiados (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador de selección. Tras la introducción del ADN foráneo, puede permitirse que las células modificadas por ingeniería genética crezcan durante 1-2 días en medios enriquecidos, y luego se cambian a medios selectivos. El marcador de selección en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de manera estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar foci que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método puede usarse ventajosamente para modificar genéticamente líneas celulares que expresa la molécula de anticuerpo. Tales líneas celulares modificadas por ingeniería genética pueden ser particularmente útiles en la selección y evaluación de compuestos que interaccionan directa o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

Pueden usarse varios sistemas de selección, incluyendo pero sin limitarse al empleo de genes de timidina cinasa del virus del herpes simple (Wigler *et al.*, Cell 11:223 (1977)), hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. E.E.U.U 48:202. (1992)), y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy *et al.*, Cell 22:817 (1980)) en células tk-, hgprt- o aprt-, respectivamente. También puede usarse la resistencia a antimetabolitos como la base de selección para los genes siguientes: dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. E.E.U.U 77:357 (1980); O'Hare *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. E.E.U.U 78:1527 (1981)); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. E.E.U.U 78:2072 (1981)); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Wu y Wu, Biotherapy 3:87-95 (1991)); e higo, que confiere resistencia a higromicina (Santerre *et al.*, Gene 30:147 (1984)). Pueden aplicarse de manera rutinaria métodos comúnmente conocidos en la técnica de tecnología de ADN recombinante para seleccionar el clon recombinante deseado, y tales métodos se describen, por ejemplo, en Ausubel *et al.* (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Krieglner. Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); y en los capítulos 12 y 13, Dracopoli *et al.* (eds), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin *et al.*, J. Mol. Biol 150:1 (1981).

Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo pueden aumentar mediante amplificación de vector (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, "The use of vectors based on gene amplification for the expression of

cloned genes in mammalian cells" (DNA Cloning, Vol.3. Academic Press, Nueva York, 1987)). Cuando un marcador en el sistema de vector que expresa el anticuerpo es amplificable, el aumento en el nivel de inhibidor presente en cultivo de la célula huésped aumentará el número de copias del gen marcador. Puesto que la región amplificada se asocia con el gen del anticuerpo, la producción del anticuerpo también aumentará (Crouse *et al.*, Mol. Cell. Biol. 3257 (1983)).

La célula huésped puede cotransfectarse con dos vectores de expresión de la descripción, codificando el primer vector un polipéptido derivado de cadena pesada y codificando el segundo vector para un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores de selección idénticos que permiten la expresión igual de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Alternativamente, puede usarse un único vector que codifica y puede expresar, polipéptidos de cadena tanto pesada como ligera. En tales situaciones, la cadena ligera debería colocarse antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, Nature 322:52 (1986); Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. E.E.U.U 77:2197 (1980)). Las secuencias codificantes para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez que se ha producido una molécula de anticuerpo de la invención por un animal, se ha sintetizado químicamente, o se ha expresado de manera recombinante, puede purificarse mediante cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, afinidad, particularmente mediante afinidad por el antígeno específico para la Proteína A, y cromatografía por exclusión de tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de los mismos pueden fusionarse a secuencias polipeptídicas heterólogas descritas en el presente documento o conocidas de otro modo en la técnica, para facilitar la purificación.

La presente invención abarca anticuerpos fusionados de manera recombinante o conjugados químicamente (incluyendo conjugaciones tanto de manera covalente como no covalente) con un polipéptido. Los anticuerpos fusionados o conjugados de la presente invención pueden usarse para facilitar la purificación. Véanse por ejemplo, Harbor *et al.*, citado anteriormente, y la publicación PCT WO 93/21232; documento EP 439.095; Naramura *et al.*, Immunol. Lett. 39:91-99 (1994); patente estadounidense n.º 5.474.981; Gillies *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 1428-1432 (1992); Fell *et al.*, J. Immunol. 146:2446-2452(1991).

Además, los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la presente invención pueden fusionarse a secuencias de marcador, tales como un péptido para facilitar la purificación. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos del marcador es un péptido de hexa-histidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), entre otros, muchos de los cuales están comercialmente disponibles. Tal como se describe en Gentz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. E.E.U.U 86:821-824 (1989), por ejemplo, la hexa-histidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas de péptido útiles para la purificación incluyen, pero sin limitarse a, la etiqueta "HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina del virus influenza (Wilson *et al.*, Cell 37:767 (1984)) y la etiqueta "flag".

Usos diagnósticos para anticuerpos anti-IL13

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

Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse, por ejemplo, pero sin limitarse a, para detectar el nivel de IL13 de un paciente con cáncer, incluyendo métodos de diagnóstico tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, los anticuerpos pueden usarse en inmunoensayos para niveles de medición de manera cualitativa y cuantitativa de IL13 en muestras biológicas. Véase por ejemplo, Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2da ed. 1988).

Tal como se trata en más detalle a continuación, los anticuerpos de la presente invención pueden usarse o bien solos o bien en combinación con otras composiciones. Los anticuerpos pueden además fusionarse de manera recombinante a un polipéptido heterólogo en el extremo N o C terminal o conjugarse químicamente (incluyendo conjugaciones de manera covalente y no covalente) con polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención pueden fusionarse de manera recombinante o conjugarse con moléculas útiles como marcadores en ensayos de detección.

La presente invención abarca además anticuerpos o fragmentos del mismo conjugados con a un agente de diagnóstico. Los anticuerpos pueden usarse de manera diagnóstica para, por ejemplo, monitorizar el desarrollo o progresión del cáncer como parte de un procedimiento de prueba clínico para, por ejemplo, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede facilitarse acoplado el anticuerpo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales que emiten positrones usando diversas tomografías de emisión de positrones, e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. La sustancia

detectable puede acoplarse o conjugarse o bien directamente con el anticuerpo (o fragmento del mismo) o bien indirectamente, a través de un producto intermedio (tal como, por ejemplo, un ligador conocido en la técnica) usando técnicas conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.741.900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para su uso como agentes de diagnóstico según la presente invención. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa del rábano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupo prostético adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina, y aecurina; y ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In o ^{99}Tc .

Los anticuerpos también pueden unirse a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno diana. Tales soportes sólidos incluyen, pero sin limitarse a, vidrio, celulosa, poliacrilamida, nailon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

Pueden usarse anticuerpos marcados, y derivados y análogos de los mismos, que se unen específicamente a IL13 para fines de diagnóstico para detectar, diagnosticar, o monitorizar enfermedades, trastornos, y/o estados asociados con la expresión aberrante y/o la actividad de IL13. La invención proporciona la detección de expresión aberrante de IL13, que comprende (a) someter a ensayo la expresión de IL13 en las células o el fluido corporal de un individuo usando uno o más anticuerpos de la presente invención específicos para IL13 y (b) comparar el nivel de expresión génica con un nivel de expresión génica convencional, mediante lo cual un aumento o disminución en el nivel de expresión de IL13 sometido a ensayo en comparación con el nivel de expresión convencional es indicativo de una expresión aberrante.

La invención proporciona un ensayo de diagnóstico para diagnosticar un trastorno, que comprende (a) someter a ensayo la expresión de IL13 en las células o el fluido corporal de un individuo usando uno o más anticuerpos de la presente invención y (b) comparar el nivel de expresión génica con un nivel de expresión génica convencional, mediante lo cual un aumento o disminución en el nivel de expresión génica sometido a ensayo en comparación con el nivel de expresión convencional es indicativo de un trastorno particular.

Los anticuerpos de la invención pueden usarse para niveles de proteína de ensayo en una muestra biológica usando métodos inmunohistológicos clásicos conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, véanse Jalkanen, *et al.*, J. Cell. Biol. 101:978-985 (1985); Jalkanen, *et al.*, J. Cell. Biol. 105:3087-3096 (1987)). Otros métodos basados en anticuerpos útiles para detectar la expresión génica de proteínas incluyen inmunoensayos, tales como el ensayo de inmunoabsorción unido a enzimas (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA). Se conocen en la técnica marcadores de ensayo de anticuerpo adecuados e incluyen marcadores enzimáticos, tales como, glucosa oxidasa; radioisótopos, tales como yodo (^{125}I , ^{121}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{112}In), y tecnecio (^{99}Tc); marcadores luminiscentes, tales como luminol; y marcadores fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina y biotina.

Un aspecto de la invención es la detección y el diagnóstico de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión aberrante de IL13 en un animal, preferiblemente un mamífero y lo más preferiblemente un ser humano. En una realización, el diagnóstico comprende: a) administrar (por ejemplo, por vía parenteral, por vía subcutánea, o por vía intraperitoneal) a un sujeto una cantidad eficaz de una molécula marcada que se une específicamente a IL13; b) esperar durante un intervalo de tiempo tras la administración que permite que la molécula marcada se concentre preferentemente en sitios en el sujeto en los que se expresa el polipéptido (y para la molécula marcada no unida, que se elimine hasta un nivel de referencia); c) determinar el nivel de referencia; y d) detectar la molécula marcada en el sujeto, de modo que la detección de la molécula marcada por encima del nivel de referencia indica que el sujeto tiene una enfermedad o trastorno particular asociado con la expresión aberrante de IL13. El nivel de referencia puede determinarse mediante diversos métodos incluyendo, comparar la cantidad de molécula marcada detectada con un valor convencional previamente determinado para un sistema particular.

Se entenderá en la técnica que el tamaño del sujeto y el sistema de obtención de imágenes usado determinarán la cantidad obtención de imágenes del resto necesaria para producir imágenes de diagnóstico. En el caso de un resto de radioisótopo, para un sujeto humano, la cantidad de radiactividad inyectada oscilará normalmente entre aproximadamente 5 y 20 milicurios de ^{99}Tc . El anticuerpo marcado o fragmento de anticuerpo se acumulará entonces preferentemente en la ubicación de células que contienen la proteína específica. Las imágenes *in vivo* se describen en S.W. Burchiel *et al.*, "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments". (Capítulo 13 en Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S. W. Burchiel y B. A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982).

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

En una realización, la monitorización de la enfermedad o trastorno se lleva a cabo repitiendo el método para

diagnosticar la enfermedad o enfermedad, por ejemplo, un mes tras el diagnóstico inicial, seis meses tras el diagnóstico inicial, un año tras el diagnóstico inicial, etc.

La presencia de la molécula marcada puede detectarse en el paciente usando métodos conocidos en la técnica para la exploración *in vivo*. Estos métodos dependen del tipo de marcador usado. Los expertos en la técnica podrán determinar el método apropiado para detectar un marcador particular. Los métodos y dispositivos que pueden usarse en los métodos de diagnóstico de la invención incluyen, pero sin limitarse a, tomografía computerizada (CT), exploración de cuerpo completo tal como tomografía por emisión de positrones (PET), obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI), y sonografía.

En una realización específica, la molécula se marca con un radioisótopo y se detecta en el paciente usando un instrumento quirúrgico que responde a radiación (Thurston *et al.*, patente estadounidense n.º 5.441.050). En otra realización, la molécula se marca con un compuesto fluorescente y se detecta en el paciente usando un instrumento de exploración que responde a fluorescencia. En otra realización, la molécula se marca con un metal de emisión de positrones y se detecta en la patente usando tomografía-emisión de positrones. Aún en otra realización, la molécula se marca con un marcador paramagnético y se detecta en un paciente usando obtención imágenes por resonancia magnética (MRI).

En otro aspecto, se describe un método para diagnosticar la predisposición de un paciente a desarrollar enfermedades provocadas por la expresión no regulada de citocinas. Las cantidades aumentadas de IL13 en determinadas células, tejidos, o fluidos corporales del paciente pueden indicar que el paciente está predispuesto a padecer determinadas enfermedades. El método comprende recoger una muestra de células, tejido, o fluido corporal de un sujeto que se sabe que tiene niveles bajos o normales de IL13, analizar el tejido o fluido corporal para determinar la presencia de IL13 en el tejido, y pronosticar la predisposición del paciente a determinadas enfermedades inmunitarias basándose en el nivel de expresión de IL13 en el tejido o fluido corporal. El método comprende recoger una muestra de células, tejido, o fluido corporal que se sabe que contiene un nivel definido de IL13 de un paciente, analizar el tejido o fluido corporal para determinar la cantidad de IL13, y pronosticar la predisposición del paciente a determinadas enfermedades basándose en el cambio en la cantidad de IL13 en comparación con un nivel definido o sometido a prueba establecido para células, tejido, o fluido corporal normales. El nivel definido de IL13 puede ser una cantidad conocida basándose en valores de la bibliografía o puede determinarse con anticipación midiendo la cantidad en las células, tejido o fluido corporal normales. Específicamente, la determinación de los niveles de IL13 en determinados tejidos o fluidos corporales permite de manera específica y temprana, preferiblemente antes que se produzca la enfermedad, la detección de enfermedades inmunitarias en el paciente. Las enfermedades inmunitarias que pueden diagnosticarse usando el presente método incluyen, pero sin limitarse a, las enfermedades inmunitarias descritas en el presente documento. El tejido o fluido corporal puede ser sangre periférica, leucocitos de sangre periférica, tejidos de biopsia tales como biopsias de pulmón o piel, y tejido.

35 **Usos terapéuticos de anticuerpos anti-IL13**

Un anticuerpo, con o sin un resto terapéutico conjugado con él, administrado solo o en combinación con factor(es) citotóxico(s) o citostático(s) puede usarse como elemento terapéutico. La presente invención se refiere a terapias basadas en anticuerpos que implican administrar anticuerpos de la invención a un animal, un mamífero, o un ser humano, para tratar una enfermedad mediada por IL13, trastorno, o estado. Los anticuerpos dirigidos contra IL13 son útiles para la inhibición de tumores o la proliferación de células cancerosas en animales, incluyendo pero sin limitarse a vacas, cerdos, caballos, pollos, gatos, perros, primates no humanos etc., así como a seres humanos. Por ejemplo, administrando una dosis terapéuticamente aceptable de un anticuerpo, o anticuerpos, de la presente invención, o un cóctel de los presentes anticuerpos, o en combinación con otros anticuerpos de diversas fuentes, pueden reducirse cánceres o tumores o eliminarse en el mamífero tratado.

Los compuestos terapéuticos de la invención incluyen, pero sin limitarse a, anticuerpos de la invención (incluyendo fragmentos, análogos y derivados de los mismos tal como se describe en el presente documento) y ácidos nucleicos que codifican para anticuerpos de la invención tal como se describe a continuación (incluyendo fragmentos, análogos y derivados de los mismos y anticuerpos anti-idiotípicos tal como se describe en el presente documento). Los anticuerpos de la invención pueden usarse para tratar, inhibir o prevenir enfermedades, trastornos o estados asociados con la expresión y/o actividad aberrante de IL13, incluyendo, pero sin limitarse a, una cualquiera o más de las enfermedades, trastornos, o estados descritos en el presente documento. El tratamiento y/o prevención de enfermedades, trastornos, o estados asociados con la expresión y/o actividad aberrante de IL13 incluye, pero sin limitarse a, aliviar síntomas asociados con esas enfermedades, trastornos o estados. Los anticuerpos de la invención pueden proporcionarse en composiciones farmacéuticamente aceptables tal como se conoce en la técnica o tal como se describe en el presente documento.

Los anticuerpos anti-IL13 de la presente invención pueden usarse terapéuticamente en una variedad de enfermedades. La presente invención proporciona un método para prevenir o tratar enfermedades mediadas por IL13 en un mamífero. El método comprende administrar una cantidad, que previene o trata una enfermedad, de anticuerpo anti-IL13 al mamífero. El anticuerpo anti-IL13 se une a IL13 y regula la expresión de receptor celular de citocina dando como resultado niveles de citocina característicos de estados de no enfermedad.

- La cantidad del anticuerpo que será eficaz en el tratamiento, inhibición y prevención de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión y/o actividad aberrante de IL13 puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales. El anticuerpo puede administrarse en regímenes de tratamiento compatibles con la enfermedad, por ejemplo, una única o algunas dosis a lo largo de uno a varios días para mejorar un estado de enfermedad o dosis periódicas durante un tiempo prolongado para prevenir alergia o asma. Además, pueden emplearse opcionalmente ensayos *in vitro* para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa que va a emplearse en la formulación también dependerá de la vía de administración, y la gravedad de la enfermedad o trastorno, y debe decidirse según el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Pueden extrapolarse dosis eficaces de curvas dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba de modelos animales o *in vitro*.
- Para los anticuerpos, la dosificación administrada a un paciente es normalmente de 0,1 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal del paciente. Preferiblemente, la dosificación administrada a un paciente está entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg de peso corporal del paciente, más preferiblemente de 1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal del paciente. Generalmente, los anticuerpos humanos tienen una semivida más prolongada dentro del cuerpo humano que los anticuerpos de otras especies debido a la respuesta inmunitaria a los polipéptidos foráneos. Por tanto, son posibles a menudo dosificaciones de anticuerpos humanos más bajas y administración menos frecuente. Además, la dosificación y la frecuencia de administración de los anticuerpos de la invención pueden reducirse potenciando la captación y la penetración en tejido (por ejemplo, en el cerebro) de los anticuerpos mediante modificaciones tales como, por ejemplo, la lipidación.
- Los anticuerpos de esta invención pueden utilizarse ventajosamente en combinación con otros anticuerpos monoclonales y quiméricos, o con linfocinas o factores de crecimiento hematopoyéticos (tales como, por ejemplo, IL-2, IL-3, IL-7, IFN, GCSF, GMCSF, Flt3, IL21) y CpG no metilado que contiene oligonucleótidos, por ejemplo, que sirve para aumentar el número o actividad de células efectoras que interactúan con los anticuerpos.
- Los anticuerpos de la invención pueden administrarse solos o en combinación con otros tipos de tratamientos, tales como quimioterapia y radioterapia.
- En un aspecto preferido, el anticuerpo se purifica sustancialmente (por ejemplo, sustancialmente libre de sustancias que limitan su efecto o producen efectos secundarios no deseados).
- El anticuerpo anti-IL13 puede administrarse al mamífero de cualquier manera aceptable. Los métodos de introducción incluyen pero sin limitarse a vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural, de inhalación y oral. Los anticuerpos o composiciones pueden administrarse mediante cualquier vía conveniente, por ejemplo mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, rectal y mucosa intestinal, etc.) y puede administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir los anticuerpos o composiciones terapéuticos de la invención en el sistema nervioso central mediante cualquier vía adecuada, incluyendo inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede facilitarse mediante un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito de Ommaya.
- También puede emplearse administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente de aerosolización. El anticuerpo también puede administrarse en los pulmones de un paciente en forma de una composición de polvo seco (véase por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.514.496).
- En una realización específica, puede ser deseable administrar los anticuerpos o composiciones terapéuticos de la invención de manera local al área que necesita del tratamiento; esto puede lograrse mediante, por ejemplo, y no a modo de limitación, infusión local, aplicación tópica, mediante inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. Preferiblemente, cuando se administra un anticuerpo de la invención, debe tenerse mucho cuidado en usar materiales a los que la proteína no se absorba.
- En otra realización, el anticuerpo puede suministrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véanse Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat *et al.*, en *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, págs. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, págs. 317-327; véase generalmente *ibid.*).
- Aún en otra realización, el anticuerpo puede suministrarse en un sistema de liberación controlada. En una realización, puede usarse una bomba (véanse Langer, citado anteriormente; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald *et al.*, *Surgery* 88:507 (1980); Saudek *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989)). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos (véanse *Medical Applications of Controlled Release*, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, J., *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61 (1983); véanse también Levy *et al.*, *Science* 228:190 (1985); During *et al.*, *Ann. Neurol.* 25:351 (1989); Howard *et al.*, *J. Neurosurg.* 71:105 (1989)). Aún en otra realización, puede colocarse un sistema de liberación controlada en proximidad de la diana terapéutica.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas. Tales composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo, y un portador fisiológicamente aceptable. En una realización específica, el término "fisiológicamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o del estado o enumerado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el cual se administra el agente terapéutico. Tales portadores fisiológicos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También pueden emplearse soluciones salinas y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol como portadores líquidos, particularmente para disoluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, caliza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes de tamponamiento de pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de disoluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida, y similares. La composición puede formularse como supositorio, con aglutinantes y portadores tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores convencionales tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Los ejemplos de portadores adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad eficaz del anticuerpo, preferiblemente de forma purificada, junto con una cantidad adecuada de portador de modo que se proporcione la forma para una administración apropiada al paciente. La formulación debe adaptarse al modo de administración.

En una realización, la composición se formula según procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a seres humanos. Normalmente, las composiciones para administración intravenosa son disoluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente de solubilización y un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los componentes se suministran o bien de manera separada o bien mezclados juntos en una forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, como un concentrado libre de agua o en polvo liofilizado seco en un envase sellado herméticamente tal como una ampolla o sobre indicando la cantidad de principio activo. Cuando la composición va a administrarse mediante infusión, puede dispensarse con una botella de infusión que contiene agua o solución salina de calidad farmacéutica estéril. Cuando la composición se administra mediante inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de modo que los componentes se mezclen antes de la administración.

Se describe un paquete farmacéutico o kit que comprende uno o más envases llenos con uno o más de los componentes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Asociados opcionalmente con tal(es) envase(s) puede haber una nota con la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, nota que refleja la aprobación por la agencia de fabricación, uso o venta para la administración humana.

Además, los anticuerpos de la presente invención pueden conjugarse con diversas moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionucleótidos, o toxinas. Véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; la patente estadounidense n.º 5.314.995; y el documento EP 396.387. Un anticuerpo o fragmento del mismo puede conjugarse con un resto terapéutico tal como una citotoxina, por ejemplo, un agente citostático o citocida, un agente terapéutico o un ión metálico radiactivo, por ejemplo, emisores alfa tales como, por ejemplo, ²¹³Bi. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen paclitaxel, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi-antracina-diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puomicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitarse a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo, dacarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa, clorambucilo, melfalano, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (conocida anteriormente como daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (conocida anteriormente como actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramicina (AMC)), y agentes anti-mitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Se conocen bien técnicas para conjugar tales restos terapéuticos con anticuerpos, véanse, por ejemplo, Amon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2da Ed.), Robinson *et al.* (eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers of Citotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), págs. 475-508 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), págs. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe *et al.*, "The Preparation And Citotoxic

Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”, Immunol. Rev. 62:119-58 (1982). Alternativamente, un anticuerpo puede conjugarse con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo. (Véase, por ejemplo, Segal en la patente estadounidense n.º 4.676.980.)

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

Ejemplos

Ejemplo 1:

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

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

20 Se notificó que la IL13 humana con una mutación (ácido glutámico a lisina) en el residuo de aminoácido n.º 13 se unía a IL13R α 1 con afinidad igual o alta pero había perdido la capacidad para activar las células que portan IL13R α 1 (Thompson *et al.*, J. Biol. Chem., 274: 29944 (1999)). Esta IL13 mutada, inactiva, denominada MT-IL13, se expresó en células de riñón embrionario humano 293-T. Se usó la proteína recombinante purificada como inmunógeno en la presente invención para generar anticuerpos monoclonales anti-IL13. Se sintetizaron dos cebadores de oligonucleótidos: 5' AAGCTTTCCCCAGGCCCTGTGCCTCCCTCTACAGCCCTCAGGAAGCTCAT3' (SEQ ID NO 9) 5' CTCGAGGTTGAACCGTCCCTCGCGAAAAAG 3' (SEQ ID NO 10) que corresponden a la secuencia de oligonucleótidos del gen MT-IL13 y se usaron como moldes en reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) para clonar el gen de IL13 a partir de una biblioteca de ADNc de testículos humanos (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA). Se ligó el fragmento de PCR (342 pares de bases) que carecía de la secuencia de péptido señal prevista de IL13 en el vector pSecTag/FRT (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contenía una secuencia de péptido señal de secreción en el extremo 5' y una secuencia Fc γ 1 humana (regiones constante y bisagra CH2 y CH3) en el extremo 3'. Se confirmó la composición del constructo mediante secuenciación.

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

35 Para una expresión transitoria de MT-IL13/Fc, se transfectó ADN de plásmido purificado en células 293T mediante Lipofectamine 2000 (Invitrogen), según el protocolo del fabricante. A las 72 horas tras la transfección, se recogieron los sobrenadantes del cultivo de células transfectadas para la purificación. Para una expresión estable de MT-IL13/Fc, se establecieron líneas celulares usando una línea de células 293T Flp-In (Invitrogen). Para confirmar la expresión, se analizaron los sobrenadantes del cultivo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Se transfirieron las proteínas separadas a una membrana de nitrocelulosa y se detectaron mediante reacción con anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgG (Fc) humana conjugado con peroxidasa del rábano (HRP) (Sigma, St. Louis, MO) o anticuerpos de cabra policlonales anti-IL13 (R&D Systems, Minneapolis, MN), que luego se detectaron con HRP-IgG de burro anti-cabra (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Se identificaron las proteínas inmunoreactivas en película, usando detección de quimioluminiscencia potenciada (Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce, Rockford, IL).

C. Purificación de MT-IL13/Fc

45 Se purificó MT-IL13/Fc con una columna de afinidad de proteína A hiper-D (Invitrogen) equilibrada con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Tras aplicar el sobrenadante de cultivo celular a la columna, se lavó la resina con más de 20 volúmenes de columna de PBS. Luego, se lavó la resina con tampón SCC (citrate de sodio 0,05 M, cloruro de sodio 0,5 M, pH 6,0) para eliminar proteínas no unidas. Luego se eluyeron las proteínas de fusión de IL13 (citrate de sodio 0,05 M, cloruro de sodio 0,15 M, pH 3,0) y se dializaron en PBS.

50 Se analizaron las fracciones de la columna de afinidad que contenían MT-IL13/Fc mediante SDS-PAGE. Se analizó la pureza de las proteínas mediante tinción con azul de Coomassie y la identidad de las proteínas mediante inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpo de cabra anti-IgG (Fc) humana (Sigma) y anticuerpo de cabra anti-IL13 humana (R&D Systems) tal como se describió anteriormente.

Ejemplo 2:

Generación de anticuerpos monoclonales anti-IL13

A ratones A/J machos (Harlan, Indianapolis, IN), de 8-12 semanas de edad, se les inyectaron por vía subcutánea 20 µg de MT-IL13/Fc en adyuvante completo de Freund (Difco Laboratories, Detroit, MI) en 200 µl de PBS pH 7,4. En intervalos de dos semanas se le inyectaron dos veces los ratones por vía subcutánea 20 µg de MT-IL13/Fc en adyuvante incompleto de Freund. Luego, dos semanas después y tres días antes del sacrificio, volvieron a inyectarse a los ratones por vía intraperitoneal 20 µg del mismo inmunógeno en PBS. Se usaron células del bazo aisladas de uno o más ratones inmunizados con antígeno para la fusión. También se usaron procedimientos similares de inmunización y fusión con IL13 humana expresada en *E. coli* (R&D Systems) como inmunógeno.

En la fusión que conduce a la generación del Acm 228B/C-1 de anti-IL13, se combinaron 26,4x10⁶ células del bazo y 58,8x10⁶ células del bazo a partir de dos ratones inmunizados. Para cada fusión, se prepararon suspensiones celulares individuales a partir de bazo de ratones inmunizados y se usaron para fusión con células de mieloma Sp2/0. Se fusionaron Sp2/0 y células del bazo a una razón de 1:1 en un medio que contenía el 50% de polietilenglicol (P.M. 1450) (Kodak, Rochester, NY) y el 5% de dimetilsulfóxido (Sigma). Luego se ajustaron las células a una concentración de 1,5 x 10⁵ células del bazo por 250 µl de la suspensión en medio DMEM (Invitrogen, CA), complementado con suero bovino fetal al 10%, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, hipoxantina 0,1 mM, aminopterina 0,4 µM, y timidina 16 µM. Se añadieron doscientos cincuenta microlitros de la suspensión celular a cada pocillo de aproximadamente cincuenta placas de microcultivo de 96 pocillos. Después de aproximadamente diez días se retiraron los sobrenadantes del cultivo para seleccionar la reactividad con MT-IL13/Fc en ELISA.

Se recubrieron pocillos de placas de microprueba Immulon 2 (Dynatech Laboratories, Chantilly, VA) añadiendo MT-IL13/Fc purificado (0,1 µg/ml) durante la noche a temperatura ambiente. Después de eliminar la disolución de recubrimiento mediante sacudida de la placa, se añadieron 200 µl de un tampón bloqueante/diluyente (PBS que contenía el 2% de albúmina sérica bovina y el 0,05% de TWEEN® 20) a cada pocillo durante una hora para bloquear los sitios no específicos. Una hora después, se lavaron luego los pocillos con tampón PBST (PBS que contenía el 0,05% de TWEEN® 20). Se recogieron cincuenta microlitros de sobrenadante de cultivo de cada pocillo de fusión, se mezclaron con 50 µl del tampón bloqueante/diluyente y luego se añadieron a los pocillos individuales de las placas de microprueba. Tras una hora de incubación, se lavaron los pocillos con PBST. Luego se detectaron los anticuerpos murinos unidos mediante reacción con anticuerpo de cabra anti-IgG (específico de Fc) de ratón conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch Lab, West Grove, PA) y se diluyeron en 1:2.000 con el tampón bloqueante/diluyente. Se añadió disolución de sustrato de peroxidasa que contenía el 0,1% de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Sigma, St. Louis, MO) y el 0,003% de peróxido de hidrógeno (Sigma) a los pocillos para el desarrollo del color durante 30 minutos. Se terminó la reacción mediante la adición de 50 µl de H₂SO₄ 2 M por pocillo. Se midió la DO₄₅₀ de la mezcla de reacción con un lector de ELISA BioTek (BioTek Instruments, Winooski, VM).

Luego se sometieron a prueba los sobrenadantes del cultivo de los pocillos positivos de selección de MT-IL13/Fc para detectar una unión negativa a una proteína de fusión Fγ1 irrelevante. Luego se seleccionaron pocillos positivos finales para determinar la clonación de célula única mediante dilución limitante. Se volvieron a someter a prueba los sobrenadantes del cultivo de anticuerpos monoclonales para confirmar su reactividad mediante ELISA. Se hicieron crecer hibridomas seleccionados en matraces de agitación y se recogió el sobrenadante de cultivo gastado para la purificación del anticuerpo mediante cromatografía de afinidad de proteína A.

Se sometieron a prueba los anticuerpos purificados mediante cuatro ensayos: i) reactividad cruzada con MT-IL13/Fc expresado en células 293T e IL13 de ratón expresada en *E. coli*; ii) inhibición de proliferación autocrina de IL-13 de células HDLM-2 y L-1236; iii) inhibición de fosforilación de STAT6 inducida por IL13 en células THP-1; y iv) inhibición de expresión de CD14 y CD23 regulada por IL13 en monocitos humanos.

Se obtuvieron setenta y tres Acm anti-IL13 de las fusiones realizadas en ratones inmunizados con MT-IL13/Fc e IL13. Se purificaron treinta y nueve de estos Acm para la caracterización mediante ELISA y ensayos basados en células. Trece de estos 39 Acm inhibieron la proliferación inducida por IL-13 autocrina de células HDLM-2 y L-1236 (véanse la descripción del ensayo y los resultados en el ejemplo 5). Se encontró que cuatro de los Acm eran muy fuertemente reactivos con IL13 humana en ELISA y eran neutralizantes frente a IL13 humana en ensayos basados en células funcionales. Estos Acm se denominaron 228B/C-1, 228A-4, 227-26 y 227-43. Todos estos anticuerpos se generaron usando MT-IL13/Fc glicosilado como inmunógeno.

Ejemplo 3:

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

Se sometió a prueba la reactividad de diversos anticuerpos monoclonales anti-IL13 mediante ELISA. Se recubrieron diferentes pocillos de placas de microprueba de 96 pocillos con o bien IL13 humana no glicosilada expresada en *E. coli* (R&D Systems), MT-IL13/Fc glicosilada expresada en células 293T, o bien IL13 de ratón expresada en *E. coli* (R&D Systems) mediante la adición de 100 µl de proteína IL13 a 0,1 µg/ml en PBS. Tras incubación durante la noche a temperatura ambiente, se trataron los pocillos con PBSTB (PBST que contenía el 2% de BSA) para saturar los sitios de unión restantes. Luego se lavaron los pocillos con PBST.

Se añadieron cien microlitros de Acm anti-IL13 diluidos dos veces en serie (de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (3,33 nM) a 0,05 ng/ml (0,00033 nM)) a los pocillos durante 1 hora a temperatura ambiente. También se sometió a prueba un Acm anti-IL13 JES-5A2 (BD Biosciences-Pharmingen, San Diego, CA) como control positivo. Se generó este anticuerpo usando IL13 humana expresada en *E. coli* como inmunógeno. Se usó un Acm de ratón anti-gp120 de VIH 1 de isotipo coincidente como control negativo irrelevante. Luego se lavaron los pocillos con PBST. Se detectó el anticuerpo unido mediante incubación con HRP-anticuerpo de cabra anti-IgG (Fc) de ratón (Jackson ImmunoResearch) durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se añadió disolución de sustrato de peroxidasa para el desarrollo del color tal como se describió anteriormente. Se midió la DO_{450} usando un lector de ELISA.

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

Las figuras 1 y 2 muestran que 228B/C-1 tiene la afinidad más alta para IL3 humana tanto glicosilada como no glicosilada entre todos los Acm anti-IL13 sometidos a prueba. Ninguno de estos Acm anti-IL13 reaccionó de manera cruzada con IL13 de ratón en ELISA (datos no mostrados).

Ejemplo 4

Falta de competición de la unión de 228B/C-1-HRP a IL13 humana por JES10-5A2

Para tratar si JES10-5A2 y 228B/C-1 se unen al mismo epítipo en IL13 humana, se usó un ELISA de competición para examinar el efecto de JES10-5A2 sobre la unión de 228B/C-1-HRP a IL13 humana expresada en *E. coli*. Se incubó cada pocillo de placas de microprueba de 96 pocillos con 100 μl de proteína IL13 a 0,1 $\mu\text{g/ml}$ en PBS. Tras incubación durante la noche a temperatura ambiente, se trataron los pocillos con PBSTB (PBST que contenía el 2% de BSA) para saturar los sitios de unión restantes. Luego se lavaron los pocillos con PBST. Se mezclaron cincuenta microlitros de 228B/C-1 y JES10-5A2 diluidos dos veces en serie (desde una concentración final de 20 $\mu\text{g/ml}$ hasta 9,76 ng/ml) con 50 μl de 228B/C-1-HRP previamente titulado (a una dilución 1:6.400). Luego se añadieron las mezclas a los pocillos y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se añadió disolución de sustrato de peroxidasa para un desarrollo del color tal como se describió anteriormente. Se midió la DO_{450} usando un lector de ELISA.

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

Ejemplo 5

Selección de anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-IL13 mediante un ensayo de proliferación dependiente de IL-13 autocrina usando células L-1236 y HDLM-2

L-1236 y HDLM-2 son líneas celulares del linfoma de Hodgkin obtenidas de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ, Braunschweig, Alemania). Estas líneas celulares producen IL13 que a su vez activa su proliferación celular de una manera autocrina (Kapp U *et al.*, J. Exp. Med. 189:1939 (1999)). Se cultivaron células (25.000 células/pocillo) en presencia o ausencia de diferentes Acm anti-IL13 (0,2, 0,02 y 0,002 $\mu\text{g/ml}$) en CO_2 al 5% a 37°C durante 3-5 días. Luego se midió la proliferación celular o bien mediante un ensayo usando el compuesto de tetrazolio MTS (Promega, Madison, WI) (lecturas a DO_{490}) o bien mediante la incorporación de ^3H -timidina (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Se esperaba que la adición de un Acm neutralizante anti-IL13 al cultivo de estas líneas celulares inhibiera su proliferación mediante la unión a, e inactivación de, la IL13 producida por estas células. Los resultados ilustrados en la figura 4 muestran el efecto del Acm anti-IL13 de la presente invención sobre la proliferación de células L-1236. El Acm 228B/C-1 muestra la potencia más alta de inhibición de proliferación de células L-1236 de una manera dependiente de la dosis entre los anticuerpos neutralizantes sometidos a prueba. TA1-37 (un Acm anti-IL13 generado usando IL13 humana expresada en *E. coli* como inmunógeno) no tuvo ninguna actividad inhibidora incluso a una dosis de hasta 0,2 $\mu\text{g/ml}$. Se obtuvieron resultados similares con células HDLM-2.

Ejemplo 6

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

IL13 induce la supresión de la expresión de CD14 y la regulación por incremento de la expresión de CD23 en los monocitos humanos (de Waal Malefyt *et al.*, J. Immunol., 151: 6370 (1993), Chomarat *et al.*, Int. Rev. Immunol., 17: 1 (1998)). Se aislaron leucocitos de sangre periférica (PBL) a partir de sangre completa heparinizada, recién recogida de donantes humanos sanos mediante centrifugación por gradiente de densidad en Histopaque-1077 (Sigma). Se añadieron PBL ($1,5 \times 10^6$) suspendidos en medio RPMI-1640 (Invitrogen) con el 5% de suero bovino fetal a cada pocillo de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos que contenía IL13 recombinante (10 ng/ml finales = 0,813 nM) y un anticuerpo monoclonal anti-IL13 o un anticuerpo irrelevante (diluciones en serie de tres veces, desde 12 $\mu\text{g/ml}$

5 finales = 80 nM). Se suprimió o se reguló por incremento la expresión de CD14 o la expresión de CD23 en monocitos, respectivamente, mediante la adición de 0,813 nM de IL13 humana al medio de incubación. El control de medio contenía medio RPMI-1640/FBS sin IL13 recombinante.

5 Se incubaron las células en CO₂ al 5% a 37°C durante 2 días. Se recogieron las células para tinción con anticuerpo anti-CD14-FITC o anti-CD23-PE (BD Biosciences-Pharmingen). Se midieron los niveles de expresión de CD14 y CD23 en la población de monocitos mediante citometría de flujo y se representaron mediante intensidad de fluorescencia media (MFI).

10 Los efectos de Acm anti-IL13 sobre la expresión de CD14 suprimida por IL13 en monocitos humanos se representan en la figura 5. Entre todos los Acm anti-IL13 sometidos a prueba, 228B/C-1 tuvo la potencia más alta en la inhibición del efecto de IL13 sobre la expresión de CD14. Se logró la inhibición completa del efecto de IL13 a 0,33 nM. Las actividades inhibitoras de Acm 227-26 y 228A-4 fueron moderadas, mientras que la de JES10-5A2 fue débil. El efecto de IL13 no pudo inhibirse completamente mediante JES10-5A2 incluso a 80 nM.

15 Los efectos de Acm anti-IL13 sobre la regulación por incremento de CD23 inducida por IL13 en monocitos humanos se representan en la figura 6. De manera similar a los resultados en la expresión de CD14 (figura 5), 228B/C-1 fue el más potente en la inhibición del efecto de IL13 sobre la expresión de CD23 entre los Acm anti-IL13 sometidos a prueba. Se logró la inhibición completa mediante 228B/C-1 a 0,33 nM. La potencia inhibitora de JES10-5A2 fue débil.

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

Ejemplo 7

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

25 IL13 puede activar la línea celular mieloide THP-1(ATCC, Manassas, VA) para inducir la fosforilación de STAT6 que es una etapa crítica en la ruta de transducción de señal de IL13 (Murata T *et al.*, Int. Immunol. 10: 1103-1110 (1998)). Se sometieron a prueba los Acm anti-IL13 para determinar la inhibición de IL13 en este ensayo.

30 Se mantuvieron las células THP-1 en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Invitrogen) complementado con suero bovino fetal al 5%. En el día de los experimentos, se lavaron las células y se incubaron en DMEM libre de suero a 37°C en CO₂ al 5% durante 2 horas. Luego se añadieron 0,3x10⁶ células en 80 µl del medio libre de suero a cada pocillo de una placa de fondo redondeado de 96 pocillos. Ciento veinte microlitros de medio que contenía IL13 humana (concentración final de 10 ng/ml = 0,813 nM) y Acm anti-IL13 (diluciones en serie de 5 veces, desde una concentración final de 0,5 µg/ml = 3,333 nM). Pocillos de control negativo que contenían o bien nada de IL13 o bien IL13 y un Acm de ratón irrelevante de isotipo coincidente.

35 Se incubaron las mezclas a 37°C en CO₂ al 5% durante 10 min. Luego se centrifugaron las placas a 300 x g durante 3 minutos a 4°C. Tras eliminar el sobrenadante, se resuspendieron los sedimentos celulares en 100 µl de tampón de muestra no reductor de Laemmli (tampón de carga de SDS-PAGE, BioRad, CA) y luego se transfirieron a tubos de microcentrifuga. Se calentaron los tubos a 95°C durante 5 minutos y luego se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se recogieron los sobrenadantes y se analizaron mediante SDS-PAGE de gradiente del 4-20%. Se transfirieron las proteínas separadas a una membrana de PVDF que luego se incubó con Acm de ratón diluido anti-Stat6 humana (Y641, fosfoespecifico) (BD Biosciences Pharmingen).

40 Se detectó el anticuerpo unido mediante anticuerpos de cabra anti-IgG (Fc) de ratón conjugados con HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Se identificaron las proteínas inmunoreactivas en película, usando detección de quimioluminiscencia potenciada (Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce). La figura 7 representa los resultados del efecto de Acm anti-IL13 sobre la fosforilación inducida por IL13 de Stat6 en células THP-1. Stat6 se fosforila en células THP-1 tratadas con IL13 humana 0,813 nM. Se encontró la inhibición dependiente de la dosis de la fosforilación de Stat6 cuando las células se trataron con Acm 228B/C-1, 228A-4, 227-26, 227-43 y JES10-5A2. El Acm 228B/C-1 es el anticuerpo neutralizante más potente entre los Acm anti-IL13 sometidos a prueba. Se logró la inhibición completa mediante 228B/C-1 a una concentración de entre 0,667 nM y 0,133 nM. La razón estequiométrica molar aproximada entre 228B/C-1 e IL13 para una inhibición completa fue de 1:2. Esto concuerda con los datos mostrados en las figuras 5 y 6.

50 Ejemplo 8

Clonación molecular de genes de cadena pesada y ligera que codifican para anticuerpos monoclonales anti-IL13

55 Se aisló el ARN total de células de hibridoma usando un kit QIAGEN (Valencia, CA). Se llevó a cabo una reacción de transcripción inversa (ADNc de primera cadena) tal como sigue: se mezclaron 1-1,5 mg del ARN total con 1 ml de dNTP 10 mM, 50 ng de hexámeros aleatorios, y agua libre de ARNasa en un volumen final de 12 ml

Se incubó la mezcla de reacción a 65°C durante 5 minutos y se colocó sobre hielo inmediatamente durante 1 minuto. Tras una breve centrifugación, se añadieron los siguientes reactivos: 4 ml de 5X tampón de primera cadena (Tris-HCl 250 mM, pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM), 2 ml de DTT 0,1 mM, y 1 ml de inhibidor de RNasa RNaseOUT (40 U/ml). Tras mezclar, se incubó la reacción a temperatura ambiente durante 2 minutos. Luego se añadió un mililitro de Superscript II RT (50 U/ml) a la mezcla para incubación a 25°C durante 10 minutos seguido por 50 minutos a 42°C. Tras una breve centrifugación, se incubó la reacción durante 15 minutos a 70°C para inactivar la transcriptasa inversa. Luego se añadió un microlitro de RNasa H (2 U/ml) y se incubó la reacción durante 20 minutos a 37°C para destruir el ARN.

Para amplificar las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, se usó un método descrito por O'Brien y Jones (O'Brien S. y Jones T., "Humanizing antibodies by CDR grafting", Antibody Engineering, Springer Lab manual, Eds. Kontermann y Duble, S (2001)). En resumen, se seleccionaron cebadores 5' a partir de la región del péptido señal (11 conjuntos para la cadena ligera y 12 conjuntos de cebadores degenerados para la cadena pesada) y se seleccionaron cebadores 3' a partir de la región constante de la cadena o bien ligera o bien pesada. Se mezclaron los cebadores 5' y 3' (1,5 ml de 10 mM) con 5 ml de 10X tampón de PCR (Tris-HCl 250 mM, pH 8,8, MgSO₄ 20 mM, KCl 100 mM, (NH₄)₂SO₄ 100 mM, Triton X-100 al 1%, 1 mg/ml de BSA libre de nucleasa), 1 ml de ADNc tal como se preparó anteriormente, 1 ml de Turbo pfu (Stratagene) y agua para ajustar el volumen total de la reacción hasta 50 ml. Se realizó la PCR tal como sigue: 1 ciclo a 94°C durante 4 minutos; 25 ciclos a 94°C durante 30 segundos, a 53°C durante 30 segundos, y a 72°C durante 45 segundos; y 1 ciclo a 72°C durante 7 minutos. Se resolvieron las mezclas de reacción mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

Se purificó el fragmento de ADN amplificado y se clonó en un vector pcDNA3.1. La clonación se llevó a cabo usando el kit de clonación TOPO de Invitrogen siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante (Invitrogen). Se usaron de quince a veinte colonias de *E.coli* transformadas para la purificación de plásmido. Se secuenciaron los plásmidos usando un cebador de T7. Se clonaron las secuencias predominantes para las cadenas pesada y ligera en un vector de expresión de Fab M13 mediante mutagénesis de hibridación (Glaser S. *et al.* Antibody Engineering (Oxford University Press, Nueva York (1995)), Near RI, BioTechniques 12: 88 (1992)). Se confirmaron las propiedades de unión del Fab expresado mediante ELISA. La figura 8 representa las secuencias de aminoácidos de cadena VH y VL para 228B/C.

Ejemplo 9

Mapeo de epítomos

El Acm anti-IL13 228B/C-1 se une a un epítipo conformacional y se une a IL13 de mono cynomologus con la misma alta afinidad que lo hace a IL13 humana. Sin embargo, 228B/C no se une a IL13 murina. Por tanto, la estrategia diseñada para mapear epítomos fue intercambiar partes pequeñas de la IL13 de mono con la secuencia de IL13 de ratón correspondiente. Se sintetizaron oligonucleótidos solapantes. Se realizaron dos series de PCR para ensamblar los constructos híbridos de IL13 de modo que parte de la IL13 de mono se sustituía por la secuencia correspondiente de la IL13 de ratón. Se clonaron las regiones codificantes de IL13 amplificadas mediante PCR finales en el vector pcDNA3.1 en marco con una etiqueta V5 usando el kit de clonación TOPO (Invitrogen). Se confirmó mediante secuenciación que toda la región amplificada mediante PCR sólo contenía las mutaciones de intercambio de dominio deseadas y ninguna mutación no deseada adicional en los vectores de expresión.

Se identificó el epítipo de unión a Acm anti-IL13 como un péptido de 8 meros desde el aminoácido n.º 49 hasta el 56, ESLINVSG (SEQ ID NO 18). Este epítipo está ubicado en la hélice B y el bucle BC en la IL13 humana. Cuando se usó el péptido del epítipo derivado de IL13 de cynomologus para intercambiar la secuencia correspondiente en IL13 murina, la molécula de IL13 híbrida resultante puede unirse a 228B/C con una afinidad similar a la de la IL13 de cynomologus original, validando adicionalmente que el Acm 228B/C se une a la IL13 de cynomologus o humana en este péptido entre los residuos n.º 49-56. La comparación de secuencias entre IL13 humana, de cynomologus y murina revela que sólo tres residuos Ile52, Val54, Gly56 en IL13 humana no están conservados, lo que sugiere que los residuos críticos para la interacción de IL13 y Acm anti-IL13 a través de este péptido de 8 meros están determinados por uno o una combinación de algunos de estos tres residuos.

Este epítipo se confirmó adicionalmente mediante el análisis puntual de péptidos. Se exploró todo el péptido de IL13 humana con una serie de péptidos de 12 meros solapantes sintetizados mediante SPOT en membrana de celulosa. Se identificó el único péptido reactivo con Acm anti-IL13 como un péptido de 12 meros de los aminoácidos n.º 44-56, YCAALESLINVS (SEQ ID NO 19), que se solapa con la región identificada a través experimentos de intercambio de dominio.

Ejemplo 10

Ensayos de ADCC para determinar Acm anti-IL-13

Se aíslan PBMC a partir de muestras de sangre heparinizada frescas mediante técnicas de centrifugación convencionales usando Ficoll-paque (50 ml de capa leucocítica proporcionan ~300 x10⁶ PBMC). Se estimulan las PBMC (20 x10⁶ PBMC) con IL-2 (10 U/ml) en RPMI1640/FCS al 10% durante 24 h a 37°C, CO₂ al 5%.

Tras 24 h, se marcan las células diana (2×10^6 células) HDLM-2 o L-1236 (líneas celulares de linfoma de Hodgkin) incubando con 400 uCi de ^{51}Cr (cromato de sodio) durante la noche a 37°C . Se lavan 4x las células marcadas con ^{51}Cr y se resuspenden en RPMI1640/FCS al 5%. Entonces se disponen alícuotas de las células marcadas en placas de fondo en U de 96 pocillos (pocillo duplicado). Entonces se añaden las PBMC estimuladas con IL-2 a una razón E:T diferente (por ejemplo 80:1, 20:1).

Se diluyen en serie los Acm anti-IL13 que van a someterse a prueba y se disponen alícuotas en los pocillos de modo que la concentración de Acm final es de entre, por ejemplo, 0, 0,5, 5, 50 ug/ml. Tras la incubación, se centrifugan las placas a 900 rpm durante 3 minutos. Se recoge el sobrenadante de cada pocillo y se cuenta la cantidad de radiactividad. Se calcula el porcentaje de lisis celular según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de lisis celular} = (\text{Cpm}_{\text{prueba}} - \text{Cpm}_{\text{espon}}) / (\text{Cpm}_{\text{máx}} - \text{Cpm}_{\text{espon}}) \times 100\%$$

[Para información adicional sobre ADCC, véanse, por ejemplo, L. M. Weiner *et al*, Cancer Res., 48: 2568-2573 (1988); P. Hersey *et al*, Cancer Res., 46: 6083-6090 (1988); y C. J. Hansik *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci., 83: 7893-97 (1986)].

Ejemplo 11

Ensayo de citotoxicidad mediada por complemento (CMC)

Pueden incubarse células tumorales (5×10^4 en 50 μl de medio de cultivo DMEM), suero humano normal (dilución 1:1 en 50 μl de medio) y diversas concentraciones de Acm anti-IL13 humanizado (IgG1) (en 100 μl de medio) en placas de fondo plano de 96 pocillos durante 2 horas a 37°C en CO_2 al 5%. Puede usarse un anticuerpo de isotipo coincidente irrelevante como control negativo. Se añade un reactivo de proliferación celular WST-1 (15 μl ; Roche Diagnostics, Basilea, Suiza) y se incuba durante 5 horas a 37°C . Se lee la densidad óptica de la reacción colorimétrica a 450 nm con un lector de placas de ELISA. El porcentaje de inhibición de CMC mediante el Acm anti-IL13 = $100 \times (\text{DO}_{\text{s/a}} - \text{DO}_{\text{s}}) / (\text{DO}_{\text{ns}} - \text{DO}_{\text{s}})$; $\text{DO}_{\text{s/a}}$ = DO para los pocillos tratados con suero y anticuerpo; DO_{s} = DO para los pocillos tratados con suero; DO_{ns} = DO para los pocillos tratados sin suero ni anticuerpo.

Depósitos

Los siguientes cultivos se han depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas Va. 20110-2209 EE.UU. (ATCC):

Híbrido	ATCC N.º	Fecha de depósito
228B/C-1 anti-IL13	PTA-5657	20 de noviembre de 2003
228A-4 anti-IL13	PTA-5656	20 de noviembre de 2003
227-26 anti-IL 13	PTA-5654	20 de noviembre de 2003
227-43 anti-IL 13	PTA-5655	20 de noviembre de 2003

Este depósito se realizó según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a efectos de procedimiento en materia de patentes y las regulaciones según el mismo (Tratado de Budapest). Esto garantiza el mantenimiento de un cultivo viable durante 30 años desde la fecha de depósito. El organismo se pondrá a disposición por la ATCC según los términos del Tratado de Budapest, lo que garantiza una disponibilidad permanente y sin restricciones de la progenie del cultivo para el público tras la emisión de la patente estadounidense pertinente.

El cesionario de la presente solicitud está de acuerdo con que si el cultivo en depósito muriera o se perdiera o se destruyera cuando se cultive en condiciones adecuadas, se reemplazará inmediatamente tras la notificación por un espécimen viable del mismo cultivo. La disponibilidad de la cepa depositada no debe interpretarse como una licencia para poner en práctica la invención en contravención de los derechos concedidos bajo la autoridad de cualquier gobierno según sus leyes de patentes.

La anterior memoria descriptiva escrita se considera suficiente para permitir a un experto en la técnica poner en práctica la invención. La presente invención se ilustra mediante las realizaciones depositadas.

Lista de secuencias

<110> TANOX, INC.

FUNG, Sek Chung

Moyle, Matthew

<120> TRATAMIENTO DE CÁNCER USANDO ANTICUERPOS ANTI-IL13 NOVEDOSOS

<130> TNX-1088

<150> US60/532.130

<151> 23-12-2003

5

<160> 152

<170> PatentIn versión 3.2

10

<210> 1

<211> 114

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15

<400> 1

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

Phe Asn

<210> 2

<211> 114

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> misc_característica

5 <222> (13)..(13)

<223> xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<400> 2

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

Phe Asn

10 <210> 3

<211> 113

<212> PRT

<213> especie del género *Murinae*

15 <220>

<221> CADENA

<222> (1)..(113)

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

<400> 3

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

Ala

<210> 4

5 <211> 118

<212> PRT

<213> especie del género *Murinae*

<220>

10 <221> CADENA

<222> (1)..(118)

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

<400> 4

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

<210> 5

<211> 118

<212> PRT

5 <213> especie del género *Murinae*

<220>

<221> CADENA

<222> (1)..(118)

10 <223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA LIGERA DE ANTICUERPO MONOCLONAL 228A-4

<400> 5

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

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

<210> 6

<211> 118

<212> PRT

5 <213> especie del género *Murinae*

<220>

<221> CADENA

<222> (1)..(118)

10 <223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA PESADA DE ANTICUERPO MONOCLONAL 228A-4

<400> 6

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

<210> 7

<211> 114

5 <212> PRT

<213> especie del género *Murinae*

<220>

<221> CADENA

10 <222> (1)..(114)

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

<220>

<221> CADENA

15 <222> (1)..(114)

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

<400> 7

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

Arg Ala

<210> 8

<211> 120

<212> PRT

5 <213> especie del género *Murinae*

<220>

<221> CADENA

<222> (1)..(120)

10 <223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA PESADA DE ANTICUERPO MONOCLONAL 227-26-1

<400> 8

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

<210> 9

<211> 50

<212> ADN

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> Cebador de oligonucleótido directo para una secuencia de IL13 mutante

10 <400> 9

aagcttccc caggccctgt gctccctct acagccctca ggaagctcat

50

<210> 10

<211> 30

<212> ADN

15 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> Cebador de oligonucleótido inverso de una secuencia de IL13 mutante

ES 2 390 344 T3

<400> 10
ctcgagggtg aaccgtccct cgcgaaaag 30
<210> 11
5 <211> 22
<212> ADN
<213> ARTIFICIAL
<220>
10 <223> Cebador de oligonucleótido degenerado directo para IL13 de mono
<400> 11
gyyctrngcy ycatggcgct yt 22
<210> 12
15 <211> 25
<212> ADN
<213> ARTIFICIAL
<220>
20 <223> Cebador de oligonucleótido degenerado inverso para IL13 de mono
<400> 12
ttcagttga accgtccyty gcgaa 25
<210> 13
25 <211> 399
<212> ADN
<213> *Macaca fascicularis*
<400> 13
atggcgctct tgttgaccat ggtcattgct ctcaactgcc tcggcggctt tgcctcccca 60
agccctgtgc ctccctctac agccctcaag gagctcattg aggagctggt caacatcacc 120
cagaaccaga aggccccgct ctgcaatggc agcatgggtg ggagcatcaa cctgacagct 180
ggcgtgtact gtgcagccct ggaatccctg atcaacgtgt caggctgcag tgccatcgag 240
aagaccaga ggatgctgaa cggattctgc ccgcacaagg tctcagctgg gcagttttcc 300
agcttgcgtg tccgagacac caaaatcgag gtggcccagt ttgtaaagga cctgctcgta 360
30 **catttaaaga aactttttcg caatggacgg ttcaactga 399**

ES 2 390 344 T3

<210> 14

<211> 34

<212> ADN

<213> ARTIFICIAL

5

<220>

<223> Cebador de oligonucleótido directo para IL13 de mono cynomolgus

<400> 14

10 aagcttcacc atggcgctct tgttgacat ggtc

34

<210> 15

<211> 40

<212> ADN

<213> ARTIFICIAL

15

<220>

<223> Cebador de oligonucleótido inverso para IL13 de mono cynomolgus

<400> 15

20 tcacaagatc tgggctcctc gaggtgaac cgtccattgc

40

<210> 16

<211> 23

<212> ADN

<213> ARTIFICIAL

25

<220>

<223> Cebador de oligonucleótido directo para gamma 1 de Fc

<400> 16

30 ctcgaggagc ccagatcttg tga

23

<210> 17

<211> 35

<212> ADN

<213> ARTIFICIAL

35

<220>

<223> cebador de oligonucleótido inverso para gamma 1 de Fc

<400> 17

gctctagagc ctcattacc cggagacagg gagag

35

<210> 18

5 <211> 8

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

10 <223> SITIO DE UNIÓN DE EPÍTOPO

<400> 18

Glu ser Leu Ile Asn Val ser Gly
1 5

<210> 19

15 <211> 12

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> SITIO DE UNIÓN DE EPÍTOPO

20 <400> 19

Tyr Cys Ala Ala Leu Glu ser Leu Ile Asn Val ser
1 5 10

<210> 20

<211> 23

<212> PRT

25 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRL1 228B/C-1

30 <400> 20

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

Gln Arg Ala Thr Ile ser Cys
20

<210> 21

<211> 23

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

5 <220>

<223> HT2 DE MOLDE DE FRL1

<400> 21

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

10

<210> 22

<211> 23

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

15

<220>

<223> VARIANTE B DE FRL1

<400> 22

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

20

<210> 23

<211> 23

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

25

<220>

<223> VARIANTE J DE FRL1

<400> 23

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

<210> 24

<211> 23

<212> PRT

5

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE L DE FRL1

10 <400> 24

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

<210> 25

<211> 23

<212> PRT

15 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE HT-NEW #300 DE FRL1

20 <400> 25

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

<210> 26

<211> 23

<212> PRT

25 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE HT2-DP27 #29 DE FRL1

<400> 26

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

5 <210> 27

<211> 23

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

10 <220>

<223> VARIANTE HT2-DP27 #53 DE FRL1

<400> 27

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

15 <210> 28

<211> 23

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

20 <220>

<223> VARIANTE HT2-DP27 #66 DE FRL1

<400> 28

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

25 <210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRL2 228B/C

5

<400> 29

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 30

<211> 32

10

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRL3 288 B/C

15

<400> 30

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

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

<210> 31

<211> 32

20

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRL3 HT2

25

<400> 31

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

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

<210> 32

<211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

5 <223> VARIANTE B DE FRL3

<400> 32

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

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

<210> 33

10 <211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

15 <223> VARIANTE J DE FRL3

<400> 33

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

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

<210> 34

20 <211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

25 <223> VARIANTE L DE FRL3

<400> 34

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

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

<210> 35

<211> 32

<212> PRT

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE N DE FRL3

10 <400> 35

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

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

<210> 36

<211> 32

<212> PRT

15 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE P DE FRL3

20 <400> 36

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

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

<210> 37

<211> 32

<212> PRT

25 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE R DE FRL3

<400> 37

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

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

5 <210> 38

<211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

10 <220>

<223> VARIANTE HT2-NEW #1 DE FRL3

<400> 38

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

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

15 <210> 39

<211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

20 <220>

<223> VARIANTE HT2-NEW #9 DE FRL3

<400> 39

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

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

25 <210> 40

<211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE HT2-NEW #14 DE FRL3

5

<400> 40

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

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

<210> 41

<211> 32

10 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> HT2-NEW #21 DE FRL3

15

<400> 41

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

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

<210> 42

<211> 32

20 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE HT2-NEW # 67 DE FRL3

25

<400> 42

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

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

<210> 43

<211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

5

<220>

<223> VARIANTE HT2-NEW #74 DE FRL3

<400> 43

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

10

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

<210> 44

<211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

15

<220>

<223> VARIANTE HT2-NEW #78 DE FRL3

<400> 44

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

20

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

<210> 45

<211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

25

<220>

<223> VARIANTE HT2-NEW #322 DE FRL3

<400> 45

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

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

<210> 46

<211> 32

<212> PRT

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE HT2-NEW #162 DE FRL3

10 <400> 46

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

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

<210> 47

<211> 32

<212> PRT

15 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE HT2-DP27 # 7 DE FRL3

20 <400> 47

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

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

<210> 48

<211> 32

<212> PRT

25 <213> ARTIFICIAL

<220>

ES 2 390 344 T3

<220>

<223> VARIANTE HT2-DP27 #118 DE FRL3

5 <400> 51

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

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

<210> 52

<211> 32

<212> PRT

10 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE HT2-DP27 #123 DE FRL3

15 <400> 52

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

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

<210> 53

<211> 32

<212> PRT

20 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE HT2-DP27 #83 DE FRL3

25 <400> 53

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

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

<210> 54

<211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

5 <220>

<223> VARIANTE HT2-DP27 #135 DE FRL3

<400> 54

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

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

10 <210> 55

<211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

15 <220>

<223> VARIANTE HT2-DP27 #273 DE FRL3

<400> 55

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

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

20 <210> 56

<211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

25 <220>

<223> VARIANTE HT2-DP27 #301 DE FRL3

<400> 56

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

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

<210> 57

<211> 12

<212> PRT

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRL4 228 B/C

10 <400> 57

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
1 5 10

<210> 58

<211> 11

<212> PRT

15 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRL4 HT2

20 <400> 58

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 59

<211> 11

<212> PRT

25 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE B DE FRL4

30 <400> 59

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 60

<211> 30

<212> PRT

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRH1 228 B/C

10 <400> 60

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

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

<210> 61

<211> 30

<212> PRT

15 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRH1 DP27

20 <400> 61

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

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

<210> 62

<211> 30

<212> PRT

25 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRH1 NUEVO

<400> 62

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

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

<210> 63

<211> 30

5 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE HT2-NEW #73 DE FRH1

10

<400> 63

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

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

<210> 64

<211> 30

15 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRH1 HT2-DP27 #7

20

<400> 64

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

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

<210> 65

25 <211> 30

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE HT2-DP27 #40 DE FRH1

<400> 65

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

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

<210> 66

<211> 30

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

10

<220>

<223> VARIANTE HT2-DP27 #268 DE FRH1

<400> 66

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

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

<210> 67

<211> 14

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

20

<220>

<223> FRH2 228 B/C

<400> 67

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

<210> 68

<211> 14

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRH2 DP27

5 <400> 68

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 69

<211> 14

<212> PRT

10 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRH2 NUEVO

15 <400> 69

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

<210> 70

<211> 14

<212> PRT

20 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 1 DE FRH2

25 <400> 70

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

<210> 71

<211> 14

<212> PRT

30 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 3 DE FRH2

<400> 71

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

<210> 72

<211> 14

5 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE HT2-DP27 #7 DE FRH2

10

<400> 72

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Gly
1 5 10

<210> 73

<211> 14

15 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE HT2-DP27 # 43 DE FRH2

20

<400> 73

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 74

<211> 14

25 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE HT2-DP27 #50 DE FRH2

30

<400> 74

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

<210> 75

<211> 14

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

5 <220>

<223> VARIANTE HT2-DP27 #100 DE FRH2

<400> 75

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

10 <210> 76

<211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

15 <220>

<223> FRH3 228 B/C

<400> 76

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

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

20 <210> 77

<211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

25 <220>

<223> FRH3 DP27

<400> 77

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

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

<210> 78

<211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

5

<220>

<223> FRH3 NUEVO

<400> 78

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

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

10

<210> 79

<211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

15

<220>

<223> VARIANTE 1 DE FRH3

<400> 79

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

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

20

<210> 80

<211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

25

<220>

<223> VARIANTE 3 DE FRH3

<400> 80

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

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

<210> 81

<211> 32

<212> PRT

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 4 DE FRH3

10 <400> 81

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

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

<210> 82

<211> 32

<212> PRT

15 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRH3 HT2-NEW #1

20 <400> 82

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

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

<210> 83

<211> 32

<212> PRT

25 <213> ARTIFICIAL

<220>

ES 2 390 344 T3

<223> VARIANTE HT2-NEW #9 DE FRH3

<400> 83

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

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

5 <210> 84

<211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

10 <220>

<223> VARIANTE HT2-NEW #14 DE FRH3

<400> 84

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

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

15 <210> 85

<211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

20 <220>

<223> VARIANTE HT2-DP27 #26 DE FRH3

<400> 85

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

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

25 <210> 86

<211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE HT2-DP27 #275 DE FRH3

5

<400> 86

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

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

<210> 87

<211> 32

10 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE HT2-DP27 #301 DE FRH3

15

<400> 87

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

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

<210> 88

<211> 32

20 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE HT2-DP27 #580 DE FRH3

25

<400> 88

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

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

<210> 89

<211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

5

<220>

<223> VARIANTE HT2-DP27 #345 DE FRH3

<400> 89

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

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

<210> 90

<211> 32

<212> PRT

15 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE HT2-DP27 #634 DE FRH3

20 <400> 90

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

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

<210> 91

<211> 11

<212> PRT

25 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRH4 228B/C

30 <400> 91

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

<210> 92

<211> 11

<212> PRT

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRH4 DP27

10 <400> 92

Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 93

<211> 112

<212> PRT

15 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CADENA LIGERA VARIABLE DE CL5

20 <400> 93

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

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

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

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

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

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

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

<210> 94

<211> 118

<212> PRT

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CADENA PESADA VARIABLE DE CL5

10 <400> 94

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

<210> 95

<211> 112

<212> PRT

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CADENA LIGERA VARIABLE DE CL-13

10 <400> 95

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

<210> 96

<211> 118

<212> PRT

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CADENA PESADA VARIABLE DE CL-13

10 <400> 96

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

<210> 97

<211> 112

5 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CADENA LIGERA VARIABLE DE CL-50

10

<400> 97

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

<210> 98

<211> 118

<212> PRT

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CADENA PESADA VARIABLE DE CL-50

10 <400> 98

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

65

70

75

80

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 99

<211> 15

<212> PRT

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CDR-L1 228B/C

10 <400> 99

Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 100

<211> 15

<212> PRT

15 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 1 DE CDR-L1

20 <400> 100

Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr Gly Gln Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 101

<211> 15

<212> PRT

25 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 2 DE CDR-L1

<400> 101

Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr Gly Gln Ser Phe Leu His
1 5 10 15

5 <210> 102

<211> 15

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

10 <220>

<223> VARIANTE 3 DE CDR-L1

<400> 102

Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Tyr Met His
1 5 10 15

15 <210> 103

<211> 15

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

20 <220>

<223> VARIANTE 4 DE CDR-L1

<400> 103

Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Leu His
1 5 10 15

25 <210> 104

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

30 <220>

<223> CDR-L2 228B/C

<400> 104

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 105

<211> 7

<212> PRT

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 1 DE CDR-L2

10 <400> 105

Leu Ala Ser Asn Leu Asn Ser
1 5

<210> 106

<211> 7

<212> PRT

15 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 2 DE CDR-L2

20 <400> 106

Leu Ala Ser Asn Leu Gln Ser
1 5

<210> 107

<211> 7

<212> PRT

25 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 3 DE CDR-L2

30 <400> 107

Leu Ala Thr Asn Leu Glu Ser

1

5

<210> 108

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

5

<220>

<223> VARIANTE 4 DE CDR-L2

<400> 108

10 **Leu Ala Ser Asn Leu Lys Ser**
1 5

<210> 109

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

15

<220>

<223> VARIANTE 5 DE CDR-L2

<400> 109

20 **Leu Ala Ser Asn Leu Glu Lys**
1 5

<210> 110

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

25

<220>

<223> VARIANTE 6 DE CDR-L2

<400> 110

30 **Leu Ala Ser Arg Leu Glu Ser**
1 5

<210> 111

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 7 DE CDR-L2

5

<400> 111

Leu Ala Ser Asn Leu His Ser
1 5

<210> 112

<211> 7

10

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 8 DE CDR-L2

15

<400> 112

Leu Ala Ser Asn Leu Ser Ser
1 5

<210> 113

<211> 7

20

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 9 DE CDR-L2

25

<400> 113

Leu Ala Ser Phe Leu Glu Ser
1 5

<210> 114

<211> 7

30

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 10 DE CDR-L2

<400> 114

Leu Ala Asn Asn Leu Glu Ser
1 5

5 <210> 115

<211> 9

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

10 <220>

<223> CDR-L3 2288/C

<400> 115

Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Arg Thr
1 5

15 <210> 116

<211> 9

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

20 <220>

<223> VARIANTE 1 DE CDR-L3

<400> 116

Gln Gln Asn Ala Glu Asp Pro Arg Thr
1 5

25 <210> 117

<211> 5

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

30 <220>

<223> CDR-H1 228B/C

<400> 117

Ala Tyr Ser Val Asn
1 5

<210> 118

<211> 5

5 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 1 DE CDR-H1

10

<400> 118

Ala Lys Ser Val Asn
1 5

<210> 119

<211> 5

15 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 2 DE CDR-H1

20

<400> 119

Ala Asn Ser Val Asn
1 5

<210> 120

<211> 5

25 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 3 DE CDR-H1

30

<400> 120

Gly Tyr Ser Val Asn
1 5

<210> 121

<211> 5

5 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 4 DE CDR-H1

10

<400> 121

Ala His Ser Val Asn
1 5

<210> 122

<211> 5

15 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 5 DE CDR-H1

20

<400> 122

Ala Arg Ser Val Asn
1 5

<210> 123

<211> 16

25 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CDR-H2 228B/C

30

<400> 123

Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 124

<211> 16

5 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 1 DE CDR-H2

10

<400> 124

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

<210> 125

<211> 16

15 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 2 DE CDR-H2

20

<400> 125

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

<210> 126

<211> 16

25 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 3 DE CDR-H2

30

<400> 126

Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 127

<211> 16

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

5 <223> VARIANTE 4 DE CDR-H2

<400> 127

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

<210> 128

10 <211> 16

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

15 <223> VARIANTE 5 DE CDR-H2

<400> 128

Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Val Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 129

20 <211> 16

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

25 <223> VARIANTE 6 DE CDR-H2

<400> 129

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

<210> 130

30 <211> 16

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 7 DE CDR-H2

<400> 130

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

5 <210> 131

<211> 16

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

10 <220>

<223> VARIANTE 8 DE CDR-H2

<400> 131

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

15 <210> 132

<211> 16

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

20 <220>

<223> VARIANTE 9 DE CDR-H2

<400> 132

Met Val Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

25 <210> 133

<211> 16

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

30 <220>

<223> VARIANTE 10 DE CDR-H2

<400> 133

Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Ala Ser
1 5 10 15

<210> 134

<211> 16

<212> PRT

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 11 DE CDR-H2

10 <400> 134

Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Lys Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 135

<211> 10

<212> PRT

15 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CDR-H3 228B/C

20 <400> 135

Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn
1 5 10

<210> 136

<211> 10

<212> PRT

25 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 1 DE CDR-H3

30 <400> 136

Asp Gly Arg Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn
1 5 10

<210> 137

<211> 10

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

5 <220>

<223> VARIANTE 2 DE CDR-H3

<400> 137

Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Lys Asn
1 5 10

10 <210> 138

<211> 10

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

15 <220>

<223> VARIANTE 3 DE CDR-H3

<400> 138

Asp Gly Arg Tyr Pro Tyr Ala Met Lys Asn
1 5 10

20 <210> 139

<211> 10

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

25 <220>

<223> VARIANTE 4 DE CDR-H3

<400> 139

Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Ser Asn
1 5 10

30 <210> 140

<211> 10

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 5 DE CDR-H3

5

<400> 140

Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Ala Asn
1 5 10

<210> 141

<211> 10

10

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 6 DE CDR-H3

15

<400> 141

Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Leu Asp Asn
1 5 10

<210> 142

<211> 112

20

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CADENA LIGERA VARIABLE DE CL-89

25

<400> 142

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

<210> 143

<211> 118

<212> PRT

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CADENA PESADA VARIABLE CL-276G

10 <400> 143

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

<210> 144

<211> 112

5 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CADENA LIGERA VARIABLE DE RL-36

10

<400> 144

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

<210> 145

<211> 118

<212> PRT

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CADENA PESADA VARIABLE RL-36

10 <400> 145

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 146

<211> 118

<212> PRT

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CADENA PESADA VARIABLE RL-19

10 <400> 146

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

<210> 147

<211> 118

<212> PRT

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CADENA PESADA VARIABLE RL-11

10 <400> 147

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

<210> 148

<211> 118

<212> PRT

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CADENA PESADA VARIABLE RL-8

10 <400> 148

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

<210> 149

<211> 118

5 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CADENA PESADA VARIABLE RL-45

10

<400> 149

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

<210> 150

<211> 112

<212> PRT

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

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

10 <400> 150

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Gln Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

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

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

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

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

<210> 151

<211> 118

<212> PRT

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CADENA PESADA VARIABLE RL36-L1, 59

10 <400> 151

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 152

<211> 248

<212> PRT

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FV DE CADENA SENCILLA

10 <400> 152

ES 2 390 344 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de cáncer, que comprende un anticuerpo anti IL-13 humana antagonista o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-13 humana, en la que dicho anticuerpo compite con un anticuerpo producido por el hibridoma 228B/C-1 que se designa con el número de depósito de la ATCC PTA-5657 para unirse a IL-13.
2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 para el uso según la reivindicación 1, en la que el anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno se une a un epítipo que tiene la secuencia de aminoácidos ESLINVSG o YCAALESLINVS.
3. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 ó 2 para el uso según la reivindicación 1 ó 2, en la que el anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno comprende (i) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 99, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 104; y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 115; y (ii) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 117, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 123; y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 135.
4. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 ó 2 para el uso según la reivindicación 1 ó 2, en la que el anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno comprende secuencias humanizadas de un anticuerpo producido por el hibridoma 228B/C-1 (PTA-5657) o regiones de unión a antígeno derivadas de las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo producido por el hibridoma 228B/C-1 que se designa con el número de depósito de la ATCC PTA-5657.
5. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 ó 2 para el uso según la reivindicación 1 ó 2, en la que el anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno comprende (i) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una cualquiera de SEQ ID NOS: 3, 142, 144 y 150; y (ii) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una cualquiera de SEQ ID NOS: 4, 143, 145, 146, 147, 148 y 149.
6. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 ó 2 para el uso según la reivindicación 1 ó 2, en la que el anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno comprende una región de cadena VL que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 142, y una región de cadena VH que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 143.
7. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 ó 2 para el uso según la reivindicación 1 ó 2, en la que el anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno comprende:
 - (i) una región de cadena VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la fórmula:
 FRL1-CDRL1-FRL2-CDRL2-FRL3-CDRL3-FRL4, en la que FRL1 consiste en una cualquiera de SEQ ID NOS: 20-25; CDRL1 consiste en una cualquiera de SEQ ID NOS: 99-103; FRL2 consiste en SEQ ID NO: 29; CDRL2 consiste en una cualquiera de SEQ. ID NO: 104-114; FRL3 consiste en una cualquiera de SEQ ID NOS: 30-56; CDRL3 consiste en una cualquiera de SEQ ID NO: 115-116; y FRL4 consiste en una cualquiera de SEQ ID NOS: 57-59; y
 - (ii) una región de cadena VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la fórmula:
 FRH1-CDRH1-FRH2-CDRH2-FRH3-CDRH3-FRH4, en la que FRH1 consiste en una cualquiera de SEQ ID NOS: 60-66; CDRH1 consiste en una cualquiera de SEQ ID NOS: 117-122; FRH2 consiste en una cualquiera de SEQ ID NOS: 67-75; CDRH2 consiste en una cualquiera de SEQ ID NOS: 123-134; FRH3 consiste en una cualquiera de SEQ ID NOS: 76-90; CDRH3 consiste en cualquiera de SEQ ID NOS: 135-141; y FRH4 consiste en una cualquiera de SEQ ID NO: 91-92.
8. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para el uso según las reivindicaciones 1 a 7, en la que el anticuerpo antagonista es un anticuerpo monoclonal.
9. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para el uso según las reivindicaciones 1 a 8, en la que el anticuerpo antagonista comprende una región constante de un anticuerpo IgG.
10. Composición farmacéutica según la reivindicación 9 para el uso según la reivindicación 9, en la que el anticuerpo antagonista es un anticuerpo IgG1, un anticuerpo IgG2, un anticuerpo IgG3 o un anticuerpo IgG4.
11. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para el uso según las reivindicaciones 1 a 10, en la que el anticuerpo antagonista es un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado o un fragmento de los mismos.

12. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 para el uso según las reivindicaciones 8 a 11, en la que el anticuerpo es un fragmento de unión a antígeno de dicho anticuerpo.
- 5 13. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para el uso según las reivindicaciones 1 a 12, en la que el anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo monovalente o un anticuerpo multiespecífico.
14. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, 12 y 13 para el uso según las reivindicaciones 1 a 7, 12 y 13, en la que el fragmento de unión a antígeno es un fragmento Fab, fragmento Fab' o fragmento F(ab')₂.
- 10 15. Composición farmacéutica según la reivindicación 13 para el uso según la reivindicación 13, en la que el anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo multiespecífico que es un anticuerpo biespecífico.
16. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para el uso según las reivindicaciones 1 a 15, que comprende además un portador fisiológicamente aceptable.
- 15 17. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para el uso según las reivindicaciones 1 a 16, en la que la composición va a administrarse mediante inhalación, inyección en bolo o infusión.
18. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 para el uso según la reivindicación 1, en la que dicho cáncer es linfoma de Hodgkin, cáncer de piel, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de células renales, carcinoma de células escamosas, carcinoma de Kaposi asociado con SIDA o cáncer de cerebro.
- 20 19. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 para el uso según las reivindicaciones 1 a 18, en la que dicho cáncer es linfoma de Hodgkin.
20. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 para el uso según las reivindicaciones 1 a 19, en la que el anticuerpo antagonista está asociado con un agente citotóxico.
- 25 21. Composición farmacéutica según la reivindicación 20 para el uso según la reivindicación 20, en la que el agente citotóxico es una toxina, un isótopo radiactivo o un agente citostático.
22. Uso de una composición en el diagnóstico de un cáncer o tumor en una muestra biológica, en la que el cáncer y/o tumor sobreexpresa IL-13, que comprende un anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-13 humana, en la que dicho anticuerpo compite con un anticuerpo producido por el hibridoma 228B/C-1 que se designa con el número de depósito de la ATCC PTA-5657 para unirse a IL-13.
- 30 23. Uso de la composición según la reivindicación 22, en la que el anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno se une a un epítipo que tiene la secuencia de aminoácidos ESLINVSG o YCAALESLINVS.
- 35 24. Uso de la composición según la reivindicación 22 ó 23, en la que el anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno comprende
- (i) una región de cadena VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la fórmula:
- 40 FRL1-CDRL1-FRL2-CDRL2-FRL3-CDRL3-FRL4, en la que FRL1 consiste en una cualquiera de SEQ ID NOs: 20-25; CDRL1 consiste en una cualquiera de SEQ ID NOs: 99-103; FRL2 consiste en SEQ ID NO: 29; CDRL2 consiste en una cualquiera de SEQ ID NO: 104-114; FRL3 consiste en una cualquiera de SEQ ID NOs: 30-56; CDRL3 consiste en una cualquiera de SEQ ID NO: 115-116; y FRL4 consiste en una cualquiera de SEQ ID NOs: 57-59; y
- (ii) una región de cadena VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la fórmula:
- 45 FRH1-CDRH1-FRH2-CDRH2-FRH3-CDRH3-FRH4, en la que FRH1 consiste en una cualquiera de SEQ ID NOs: 60-66; CDRH1 consiste en una cualquiera de SEQ ID NOs: 117-122; FRH2 consiste en una cualquiera de SEQ ID NOs: 67-75; CDRH2 consiste en una cualquiera de SEQ ID NOs: 123-134; FRH3 consiste en una cualquiera de SEQ ID NOs: 76-90; CDRH3 consiste en cualquiera de SEQ ID NOs: 135-141; y FRH4 consiste en una cualquiera de SEQ ID NO: 91-92.
- 50 25. Uso de la composición según la reivindicación 22 ó 23, en la que el anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno comprende (i) una región de cadena VL que comprende una cualquiera de SEQ ID NOs: 3, 142, 144 y 150; y (ii) una región de cadena VH que comprende una cualquiera de SEQ ID NOs: 4, 143, 145, 146, 147, 148 y 149.

26. Uso de la composición según la reivindicación 22 ó 23, en la que el anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno comprende una región de cadena VL que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 142, y una región de cadena VH que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 143.
- 5 27. Uso de la composición según la reivindicación 22 ó 23, en la que el anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno comprende secuencias humanizadas de un anticuerpo producido por el hibridoma 228B/C-1 (PTA-5657) o regiones de unión a antígeno derivadas de las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo producido por el hibridoma 228B/C-1 que se designa con el número de depósito de la ATCC PTA-5657.
- 10 28. Uso de la composición según la reivindicación 22 ó 23, en la que el anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno comprende (i) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 99, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:104; y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 115; y (ii) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 117, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 123; y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 135.
- 15

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

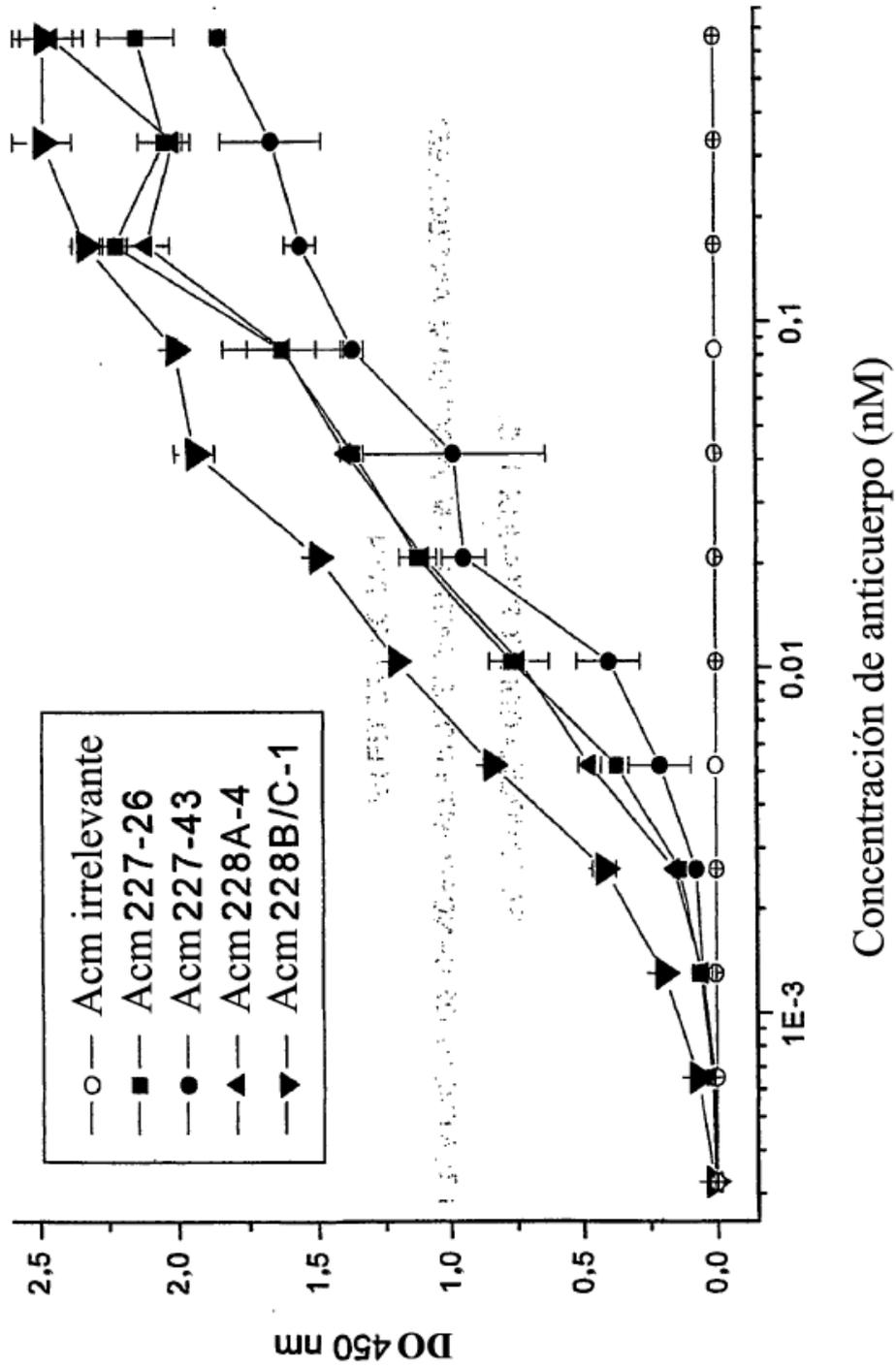


Fig. 2 Unión de Acm anti-IL13 a MT-IL13/Fc

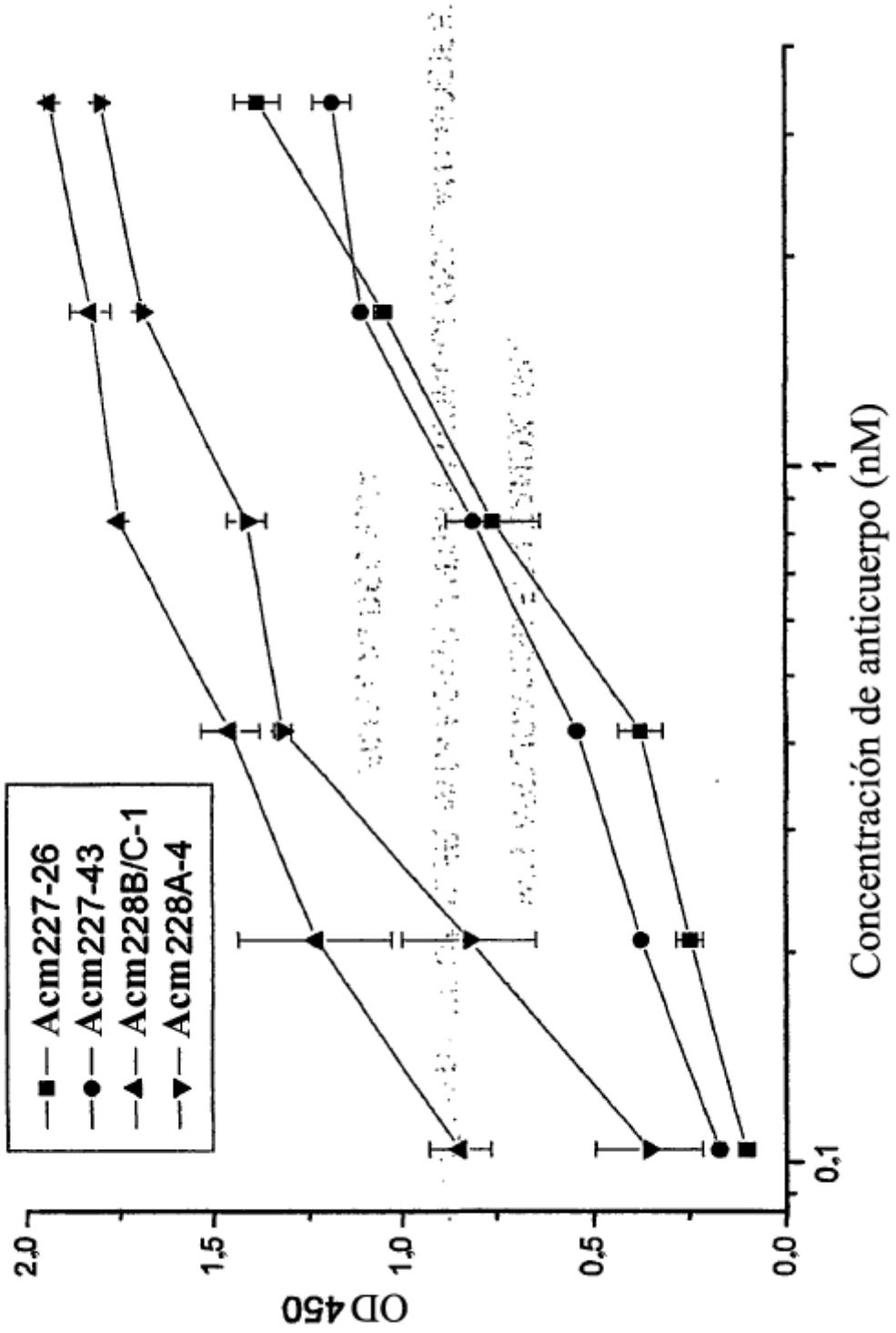


Fig. 3 Acm Anti-IL13 JES10-5A2 no compete con la unión de Acm 228B/C-1-HRP a IL-13 humana en ELISA

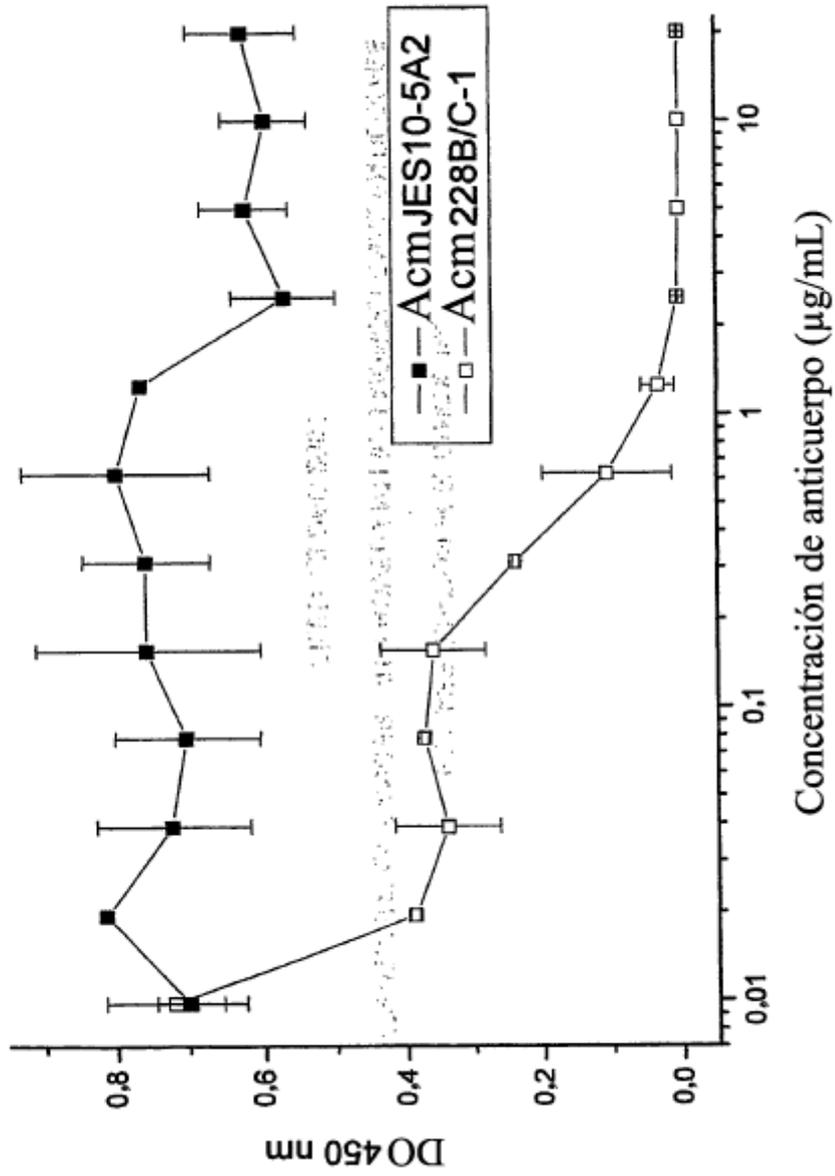


Fig. 4 Efecto de Acm anti-IL13 en la proliferación de células L-1236

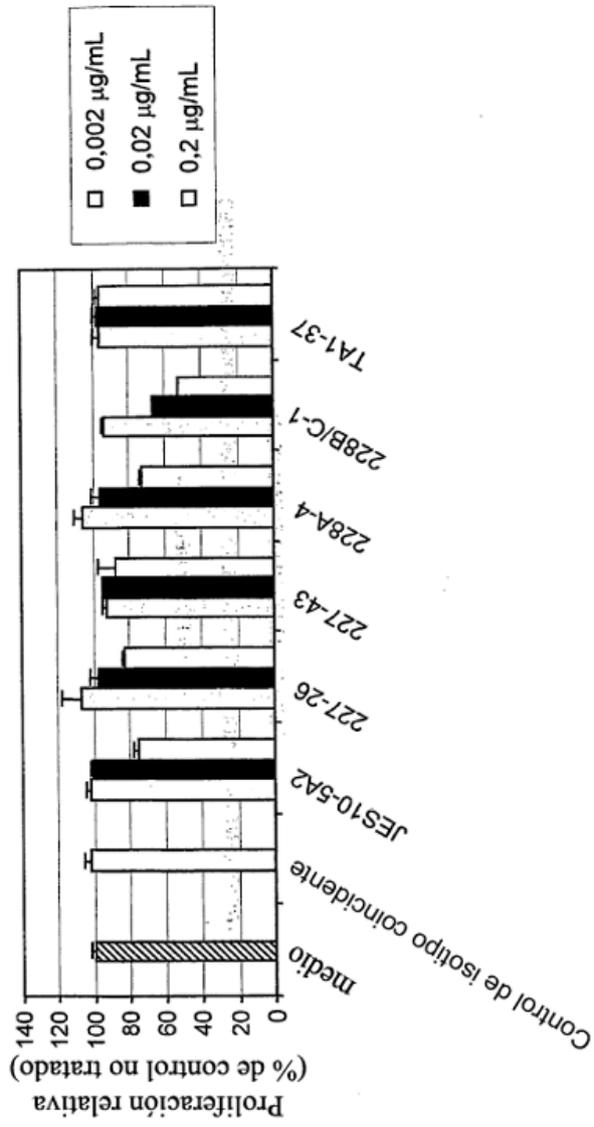


Fig. 5 Efecto de Acm anti-IL13 en la supresión inducida por IL13 de la expresión de CD14 en monocitos humanos

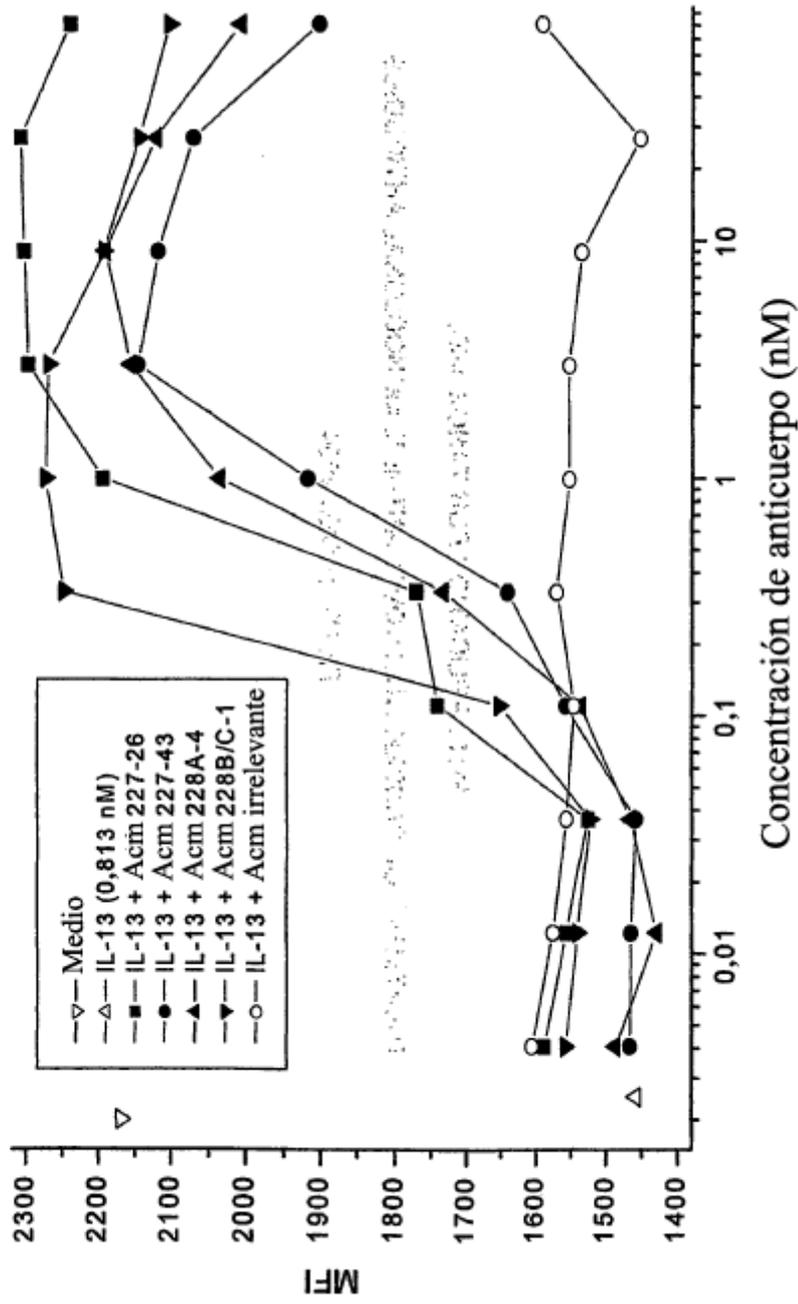


Fig. 6 Efecto de Acm anti-IL13 en la regulación por incremento inducida por IL13 de la expresión de CD23 en monocitos humanos

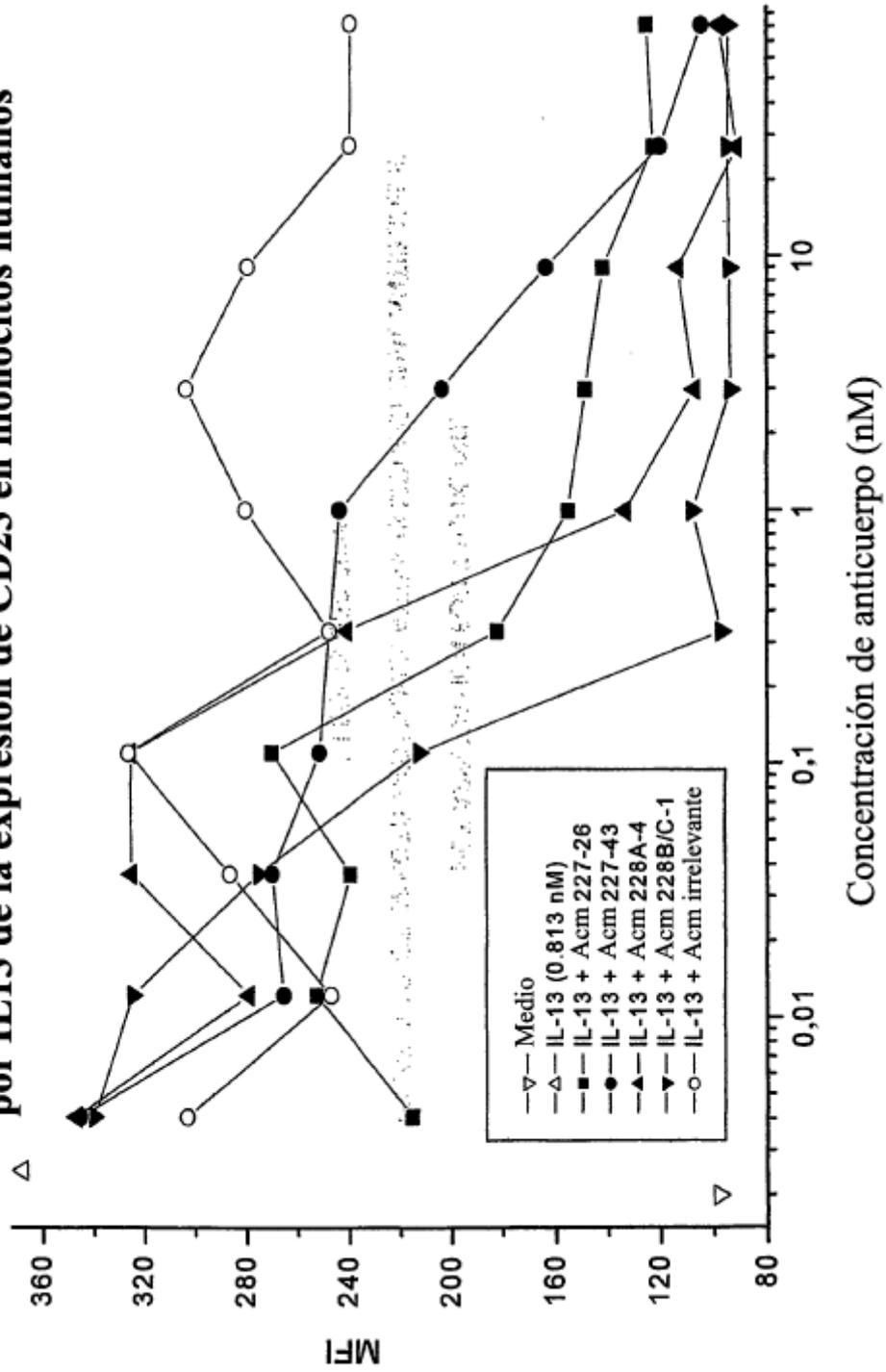


Fig. 7 Acm anti-IL13 inhiben la fosforilación de Stat6 inducida por IL13 en células THP-1

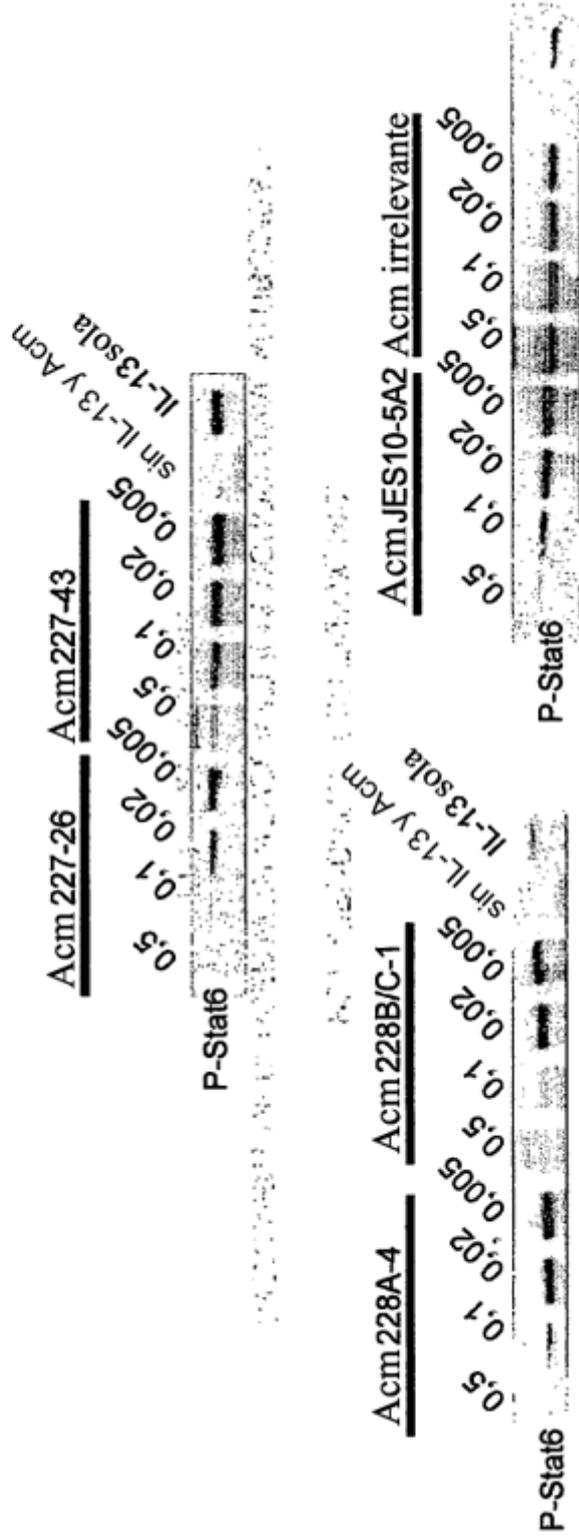


Figura 8

Anti-IL13 228B/C-1 Vk:

N I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T I S C R A S K S V D S Y G N S F M H W
Y Q Q K P G Q P P K L L I Y L A S N L E S G V P A R F S G S G S R T D F T L
T I D P V E A D D A A S Y Y C Q Q N N E D P R T F G G G T K L E I K R A (SEQ ID NO 3)

Anti-IL13 228B/C-1 Vh:

Q V Q L Q E S G P G L V A P S Q S L S I T C T V S G F S L N A Y S V N W V R Q
P P G K G L E W L G M I W G D G K I V Y N S A L K S R L N I S K D S S K S Q V
F L K M S S L Q S D D T A R Y Y C A G D G Y Y P Y A M D N W G H G T S V T V
S S (SEQ ID NO 4)

Figura 9: Secuencias de aminoácidos de región variable para determinados candidatos anti-IL13

CL-89 Vk (SEQ ID NO: 142):

DIVMTQSPDLSVSLGERATINCRASKSVDSYGN^SFMHWYQQKPKGQPPKLLIYLA^NLES^GVDPDRFSGSGSGT
DFTLTIS^SLQAEDVAVYYCQ^QNNEDPRTIFGGG^TKVEIKR

CL-276G Vh (SEQ ID NO 143):

QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTVSGFSL^SAYS^VNWIRPPGKALEWLA^MIWGDGKIVYNSALK^SR^LTISK^DT^S
KNQV^VL^TMTNMDPVD^TATYYCAGDGYYPYAM^DDNWGG^SLVTVSS

RL-36 (Candidato de biblioteca aleatoria) Vk (SEQ ID NO 144):

DIVMTQSPDLSVSLGERATINCRASKSVDSYGN^SFMHWYQQKPKGQPPKLLIYLA^NLES^GVDPDRFSGSGSGT
DFTLTIS^SLQAEDVAVYYCQ^QNNEDPRTIFGGG^TKVEIKR

RL-36 (Candidato de biblioteca aleatoria) Vh (SEQ ID NO 145):

QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTGSGFSL^SAYS^VNWIRPPGKALEWLA^MIWGDGKIVYNSALK^SR^LTISK^DT^S
KNQV^VL^TMTNMDPVD^TATYYCAVDGYYPYAM^DDNWGG^SLVTV
SS

RL36-L1,59 (Candidato maduro de afinidad L1) Vk (SEQ ID NO 150):

DIVMTQSPDLSVSLGERATINCRASKSVDSYGN^SFMHWYQQKPKGQPPKLLIYLA^NLES^GVDPDRFSGSGSGT
DFTLTIS^SLQAEDVAVYYCQ^QNNEDPRTIFGGG^TKVEIKR

RL36-L1,59 (Candidato maduro de afinidad L1) Vh (SEQ ID NO 151):

QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTGSGFSL^SAYS^VNWIRPPGKALEWLA^MIWGDGKIVYNSALK^SR^LTISK^DT^S
KNQV^VL^TMTNMDPVD^TATYYCAVDGYYPYAM^DDNWGG^SLVTVSS