

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 412 005**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/48** (2006.01)

**A61K 38/20** (2006.01)

**A61P 1/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2006 E 06750435 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2013 EP 1877074**

54 Título: **Tratamiento y prevención de la enfermedad intestinal inflamatoria que implica IL-13 y células NKT**

30 Prioridad:

**15.04.2005 US 671624 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**09.07.2013**

73 Titular/es:

**THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (100.0%)  
Office of Technology Transfer, 6011 Executive Boulevard, Suite 325  
Bethesda, MD 20852-3804, US**

72 Inventor/es:

**STROBER, WARREN;  
FUSS, IVAN;  
MANNON, PETER;  
PREISS, JAN;  
PURI, RAJ;  
KAWAKAMI, KOJI;  
FICHTNER-FEIGL, STEFAN y  
KITANI, ATSUSHI**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 412 005 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 y prevención de la enfermedad intestinal inflamatoria que implica IL-13 y células NKT

### Antecedentes de la invención

- 5 La enfermedad intestinal inflamatoria (EII) incluye la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. La colitis ulcerosa es una enfermedad del colon o del intestino grueso. La enfermedad está marcada por inflamación y ulceración de la mucosa del colon, en revestimiento más interno. La inflamación suele comenzar en el recto y la parte inferior del colon, pero también puede afectar a todo el colon, extendiéndose hacia arriba del colon de un modo continuo. Por el contrario, la enfermedad de Crohn puede afectar a cualquier zona del tracto gastrointestinal, incluido el intestino delgado y el colon, generalmente no es continua y puede afectar a todo el espesor de la pared intestinal.
- 10 Se cree que tanto la enfermedad de Crohn como la colitis ulcerosa se deben a una sensibilidad anómala de los linfocitos T en la mucosa frente a los antígenos bacterianos en la luz intestinal ((Sartor, 1995). En personas con EII, el sistema inmunitario reacciona de forma inadecuada, confundiendo alimentos, bacterias y otros materiales del intestino con sustancias extrañas o invasoras. En el proceso, el cuerpo envía glóbulos blancos al revestimiento de los intestinos, donde producen inflamación crónica, Estas células generan productos dañinos que en última instancia conducen a úlceras y lesión intestinal. Cuando esto sucede, el paciente experimenta los síntomas de EII.
- 15 Se estima que ya un millón de americanos tiene EII, con una cifra que se reparte de forma uniforme entre la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. Actualmente no existe una curación médica para la EII, no obstante los tratamientos médicos actuales están dirigidos a suprimir la inflamación anómala en el revestimiento del colon y, de este modo, a controlar los síntomas. Las principales clases de medicación que se usan actualmente para tratar la EII incluyen aminosalicilatos, corticosteroides y medicamentos inmunomoduladores. No obstante, los aminosalicilatos son eficaces únicamente en el tratamiento de episodios leves o moderados de colitis ulcerosa, no se recomienda el uso prolongado de esteroides debido a los efectos secundarios y las actuales medicaciones inmunomoduladoras (p. ej., azatioprina, 6-mercaptopurina y metotrexato) pueden necesitar hasta tres meses antes de que comiencen a producir efectos beneficiosos. Por tanto, se necesitan nuevos y mejores tratamientos para tratar y prevenir los síntomas de la EII.
- 20
- 25

### Sumario de la invención

- 30 En el presente documento se proporciona una sustancia que inhibe la unión de la IL-13 a los receptores de IL-13 sobre las células NKT para usar en el tratamiento o prevención de la respuesta inflamatoria en la enfermedad intestinal inflamatoria, en el que la enfermedad intestinal inflamatoria comprende enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, o en el que la enfermedad intestinal inflamatoria produce fibrosis en un sujeto, en el que la sustancia comprende una IL-13 mutante o un ácido nucleico aislado que codifica una IL-13 mutante, en el que la una IL-13 mutante comprende una mutación que consiste en la sustitución de un residuo de ácido glutámico en la posición 14 de la IL-13 por un residuo de aminoácido cargado positivamente o neutro, y en el que la IL-13 mutante está unida a una molécula efectora, en la que la molécula efectora es una citotoxina o un radionúclido.
- 35 También se proporciona el uso de una sustancia que inhibe la unión de la IL-13 a los receptores de IL-13 sobre las células NKT para preparar un medicamento para el tratamiento o la prevención de la respuesta inflamatoria en la enfermedad intestinal inflamatoria, en el que la enfermedad intestinal inflamatoria comprende enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, o en el que la enfermedad intestinal inflamatoria produce fibrosis en un sujeto, en el que el compuesto comprende una IL-13 mutante o un ácido nucleico aislado que codifica una IL-13 mutante, en el que la una IL-13 mutante comprende una mutación que consiste en la sustitución de un residuo de ácido glutámico en la posición 14 de la IL-13 por un residuo de aminoácido cargado positivamente o neutro, y en el que la IL-13 mutante está unida a una molécula efectora, en la que la molécula efectora es una citotoxina o un radionúclido.
- 40

### Breve descripción de las figuras

- 45 Las figuras adjuntas, que se incorporan y constituyen una parte de esta memoria, ilustran varias formas de realización de la invención y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención.
- Las Figuras 1A - F muestran que la sensibilización previa antes de la exposición intrarrectal a oxazolona conduce a una colitis progresiva crónica. Las Figuras 1A y 1B muestran la pérdida de peso y la mortalidad, respectivamente, de los ratones después de la sensibilización previa con vehículo (etanol) o con oxazolona y la exposición intrarrectal con vehículo o diferentes dosis de oxazolona. Las Figuras C y E muestran aumentos por 5 y por 10, respectivamente, de secciones transversales teñidas con H-E de colon de ratones 7 días después de la sensibilización previa con etanol y la exposición. Las Figuras 1D y 1F muestran los efectos tras la sensibilización previa con oxazolona y la reexposición a un 1 % de oxazolona por vía intrarrectal.
- 50 Las Figuras 2A - B muestran la producción de citocina por los linfocitos de ratones con colitis por oxazolona. (A) Células mononucleares de la lámina propia (LPMC), Células mononucleares hepáticas(HMNC), células de los ganglios linfáticos mesentéricos (MLNC) y esplenocitos (SPC) se aislaron el día 5 tras la inducción de colitis por oxazolona (gris) o colitis por TNBS aguda (negro) y se estimularon in vitro durante 48 horas con anti-CD3 y anti-CD28 unidos a la placa. Las concentraciones de las citocinas se midieron en los sobrenadantes mediante ELISA. (B)
- 55

- 5 LPMC se aislaron los días 2, 5 u 8 tras la inducción de colitis por oxazolona. Las LPMC se estimularon como se ha indicado anteriormente y se midieron las concentraciones de IL-4 (abiertos) e IL-13 (rayados) en los sobrenadantes. Las LPMC, MLNC, o SPC producen una cantidad muy pequeña de IL-13 en el modelo agudo de colitis inducida por TMBS. No obstante, como se ha descrito anteriormente se observa una producción mucho mayor de IL-13 en un modelo crónico de TNBS en ratones BALB/c.
- Las Figuras 3A-B muestran que la neutralización de la IL-13 previene la inducción de la colitis por oxazolona. (A) Pérdida de peso y (B) mortalidad de ratones con colitis por oxazolona tratada con IL-13R $\alpha$ 2-Fc (rombos) o proteína control (cuadrados).
- 10 Las Figuras 4A-D muestran que el agotamiento de los linfocitos NK1.1 protege a los ratones de la colitis por oxazolona pero no de la colitis por TNSB. Pérdida de peso (A+C) y mortalidad (B+D) tras la inducción de colitis por oxazolona (A+B) o colitis por TNSB (C+D) o inyección de vehículo (etanol; círculos). Se inyectó a los ratones anticuerpo control (cuadrados) o con agotamiento de células NK1.1 con PK136 (rombos).
- 15 Las Figuras 5A-B muestran la presentación de antígenos a CD1 y que las células NKT para J $\alpha$ 281 son esenciales para la inducción de colitis con oxazolona. (A) Pérdida de peso de los ratones tras la inyección intrarrectal de vehículo (círculos) u oxazolona tras la inyección i.v. de anticuerpos CD1 de bloqueo (20H2; rombos) o anticuerpo control (cuadrados). (B) Pérdida de peso de ratones CD1KO tras la inducción de colitis con oxazolona (rombos), ratones J $\alpha$ 281KO (círculos) y ratones de tipo silvestre (cuadrados).
- 20 La Figura 6 muestra la producción de citocinas en respuesta a  $\alpha$ GalCer. LPMC (panel superior), esplenocitos o células CD4 (panel inferior) no estimuladas (sin estim.) o estimuladas con anti-CD3 unido a la placa y anti-CD28 soluble, células L no transfectadas y vehículo (LC+Veh.), o células L transfectadas con CD1 y 100 ng/ml de  $\alpha$ GalCer (LCD1+aGC).
- La Figura 7 muestra un gráfico del peso de los ratones con colitis por oxazolona tratados con una toxina de IL-13 de pseudomonas (IL13PE38).
- La Figura 8 muestra una curva del peso de ratones Balb/c que recibieron administración intrarrectal de TNBS.
- 25 La Figura 9 muestra la cuantificación de colágeno en muestras de colon. La inflamación intestinal crónica se establece y se observa aumento de la cantidad de formación de colágeno. La formación de colágeno coincide con la aparición de fibrosis.
- La Figura 10 muestra la medición de citocinas obtenidas según una base semanal de tejido de colon de ratones Balb/c sometidos a administración semanal de TNBS. Inicialmente se encontró una respuesta mediada por Th1 (aumento de IL-12 e IFN-gamma). No obstante, más adelante en el proceso de la enfermedad se observan mayores cantidades de IL-13 y TGF-beta.
- 30 La Figura 11 muestra ratones con colitis por TNBS crónica tratados (comenzando a las 5 semanas en el curso temporal de los experimentos) con un plásmido que contiene una proteína de fusión IL-13R $\alpha$ 2-Fc bloqueante o anticuerpos anti-TGF- $\beta$ . Cada tratamiento, pero no el plásmido simulado control ni los anticuerpos control, conduce a la resolución de la formación de colágeno y la consiguiente fibrosis.
- 35 La Figura 12 muestra la medición de citocinas de ratones tratados con un plásmido que contiene la proteína de fusión IL-13R $\alpha$ 2-Fc o anti-TGF- $\beta$ . La proteína de fusión IL-13R $\alpha$ 2-Fc conduce a la modulación por disminución de la IL-13 y del TGF-beta, mientras que el anti-TGF- $\beta$ . Conduce a la modulación por disminución de TGF- $\beta$  pero no de IL-13.
- 40 La Figura 13 demuestra la expresión de IL-13R $\alpha$ 2 e IL-13R $\alpha$ 1 en el modelo crónico de colitis por TNBS. El aumento de la expresión de IL-13R $\alpha$ 2 se produce en las etapas más tardías del proceso de la enfermedad, mientras que IL-13R $\alpha$ 1 se expresa de forma constitutiva.
- La Figura 14 muestra un análisis por citometría de flujo representativo de las células mononucleares de sangre periférica obtenidas de un paciente con colitis ulcerosa. Se usó análisis por citometría de flujo con dos canales para identificar las células portadoras de marcadores celulares de NKT (p. ej., CD161) y receptores de IL-13, usando anticuerpos conjugados con los fluorocromos adecuados. En sujetos con colitis ulcerosa, se encontró que el 1,29-6,88 % de las células coexpresaban CD161 y IL-13R $\alpha$ 2, mientras que en los controles se encontró que el 0,16-0,38 % de las células coexpresaban estos receptores.
- 45 La Figura 15 muestra las curvas del peso de los ratones a los que se ha administrado oxazolona por vía rectal el día 0 y a los que se ha inyectado mAB anti-IL13 (500 ug i.p.) o anticuerpo control del mismo isotipo de Ig los días 0, 1 y 3.

### **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se puede entender más fácilmente mediante referencia a la siguiente descripción detallada de realizaciones preferidas de la invención y los ejemplos incluidos en la misma y a las figuras y su descripción previa y

siguiente.

Se entenderá también que la terminología usada en el presente documento es para el propósito de describir solo realizaciones particulares y no se desea que sea limitante.

5 Como se usa en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "uno", "una" y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "una sustancia" incluye una o más sustancias.

Tratamiento o prevención de la colitis ulcerosa

10 En el presente documento se proporciona una sustancia para el tratamiento o la prevención de la respuesta inflamatoria de la colitis en un sujeto como se ha indicado anteriormente, en el que la sustancia que inhibe la unión de IL-13 a los receptores de IL-13 sobre los linfocitos T, como las células NKT. Como se divulga en el presente documento, a los receptores sobre los linfocitos T, como las células NKT, pueden dirigirse composiciones como las que se proporcionan en el presente documento para tratar o prevenir la respuesta inflamatoria de la enfermedad intestinal inflamatoria en un sujeto. Como se usa divulga en el presente documento, la IL-13 incluye todas las variantes naturales que se pueden unir a los receptores de IL-13 y estimularlos, tal como se puede encontrar en las células NKT.

15 Cualquier animal que padezca colitis ulcerosa puede tratarse mediante la administración de la sustancia. Por tanto, el sujeto puede ser cualquier mamífero, tal como un ser humano, y puede incluir, entre otros, ratones, ratas, vacas, cobayas, hámster, conejos, gatos, perros, cabras, ovejas, monos, caballos y chimpancés.

20 Como se divulga en el presente documento, un linfocito T puede ser cualquier linfocito T (p. ej., colaborador, citotóxico, supresor) que esté presente en el intestino y exprese un receptor de la IL-13. Las células T asesinas naturales (NKT) constituyen una clase única de linaje de linfocitos T que comparte algunas características con las células NK. Estas células tienen un repertorio de receptores de linfocitos T (TCR) extremadamente restringido, que consiste en una cadena de Va24-JaQ invariable emparejada preferentemente con una cadena Vf311 en seres humanos. Aunque sus ligandos de TCR naturales todavía no se han identificado, las células NKT pueden ser generadas y activadas por antígenos glucolípidos tales como  $\alpha$ -galactosilceramida y glicosil-fofatidilinositol en el contexto de una CD1d, la de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad asociada a la  $\beta$ 2-microglobulina. Las células NKT humanas expresan lectinas de tipo C asociada con NK NKR-P1 (CD 161, la versión humana de NK1.1 de ratón) y CD45RO y tienen una expresión heterogénea de CD4 o CD8. Además de la identificación por marcadores de superficie celular, las células NKT se pueden identificar por la capacidad de la célula para reconocer una molécula presentadora de antígeno de clase I no polimórfica, CD1d. Por ejemplo, las células NKT se pueden identificar funcionalmente por la capacidad de la célula para producir citocinas, tales como IL-13, en respuesta a la estimulación por las células presentadoras de antígenos portadoras de CD1d (Fuss y col., 2004. J.Clin. Invest. 113:1490-7).

### Enfermedad intestinal inflamatoria

35 Por "enfermedad intestinal inflamatoria" (EII) se quiere decir enfermedad inflamatoria recurrente crónica de etiología no aclarada que afecta al intestino delgado y al colon que incluye enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU). La enfermedad de Crohn puede afectar a cualquier porción del tracto intestinal, pero con mayor frecuencia afecta al intestino delgado distal y/o al colon. La colitis ulcerosa afecta solo al colon, generalmente limitada al recto o al colon distal. Los estudios con modelos murinos de EC y de CU sugieren con mucha fuerza que estas dos enfermedades se deben a la alteración de la regulación de la respuesta inmunitaria de la mucosa a los antígenos en la microflora de la mucosa (Sartor, R. B. (1995). Gastroenterol Clin North Am 24, 475-507) (Strober W, y col. (2002) Annu. Rev. Immunol. 20:495-549).

45 Por "respuesta inflamatoria" o "respuesta inmunitaria" se quiere decir la reacción de los tejidos vivos a lesiones, infecciones o irritaciones que se caracterizan por enrojecimiento, sensación de calor, inflamación, dolor y pérdida de función producida como resultado de un incremento del flujo sanguíneo y de la entrada de células y secreciones inmunitarias. La inflamación es la reacción del cuerpo a microorganismos infecciosos invasores y tiene como resultado un incremento del flujo sanguíneo en el área afectada, la liberación de sustancias químicas por los glóbulos blancos y el incremento del flujo de plasma y la llegada de monocitos para limpiar los residuos. Cualquier cosa que estimula la respuesta inflamatoria se dice que es inflamatoria.

50 Un experto en la técnica reconocería que la colitis ulcerosa o la colitis indeterminada se refiere a una afección del colon que se caracteriza por un estado de inflamación en el que se pueden detectar una o más de las siguientes características histológicas: una inflamación superficial caracterizada por la presencia de pérdida de células epiteliales y ulceración en parches, un agotamiento pronunciado de células en globo productoras de mucina y una reducción de la densidad de las glándulas tubulares. Además, en la lámina propia se observa un infiltrado de células inflamatorias mixtas que consisten en linfocitos y granulocitos (consistente esto último en principalmente neutrófilos y, en menor grado, eosinófilos) asociados con una exudación de células en la luz intestinal. Asimismo, a nivel de la submucosa se puede mostrar un marcado edema con pocas células inflamatorias, mientras que en la capa muscular externa un experto en la técnica vería pocos o ningún indicio de inflamación. Véase, por ejemplo, Boirivant y col.,

Journal of Experimental Medicine 188: 1929-1939 (1998). Los síntomas clínicos pueden incluir, entre otros, diarrea, prolapso rectal, pérdida de peso, dolor abdominal y deshidratación.

La enfermedad de Crohn se refiere a la inflamación que afecta a cualquier parte del tracto alimentario, pero con mayor frecuencia a la parte terminal del intestino delgado y/o al colon ascendente adyacente. Con frecuencia, la inflamación se caracteriza por "lesiones en salto", que consisten en áreas de inflamación que alternan con áreas de mucosa normal. El área de intestino afectada en la enfermedad de Crohn está marcada por eritema, edema e incremento de la friabilidad; a veces, el intestino se estrecha y se une a otros órganos abdominales o a la pared intestinal. Las fístulas entre el intestino afectado y otras estructuras, incluida la piel, no son infrecuentes. La exploración microscópica del tejido en la enfermedad de Crohn revela erosiones epiteliales, pérdida de células en globo productoras de mucina y una extensa infiltración de linfocitos que afecta a todas las capas de la mucosa; este infiltrado contiene en ocasiones células gigantes indicativas de formación de granuloma. Cuando hay inflamación presente durante mucho tiempo (crónica), a veces puede causar cicatrices (fibrosis). El tejido cicatricial no suele ser tan flexible como el tejido sano. Por tanto, cuando se produce fibrosis en los intestinos, la cicatrización puede estrechar la anchura del paso (luz) de los segmentos afectados del intestino. Estas áreas constreñidas se denominan estenosis. Las estenosis pueden ser leves o graves, en función de cuánto bloquean el paso de los contenidos del intestino a través del área estrechada. Los síntomas/signos clínicos de la enfermedad de Crohn pueden incluir, entre otros: caquexia, pérdida de peso, mal crecimiento, dolor abdominal, fístulas de drenaje, prolapso rectal y deshidratación.

Como se usa en el presente documento, "unión" hace referencia a la unión de dos o más sustancias con suficiente especificidad como para tener un efecto químico o biológico. Ejemplos de unión incluyen las interacciones iónicas entre un ligando y su receptor o un anticuerpo y su antígeno. Se entiende que dicha unión suele ser un proceso dinámico en el que la unión no es ni permanente ni completa. Por tanto, la unión no necesariamente está limitada en base a una avidez o afinidad específicas, siempre que haya un efecto biológico o químico significativo de dicha unión. Por "especificidad" se quiere decir que la unión se puede distinguir de interacciones aleatorias o de fondo. Tanto la unión entre sustancias como los efectos biológicos y químicos se pueden medir para los procedimientos proporcionados en el presente documento.

Por tanto, una sustancia que inhibe la unión de la IL-13 a los receptores de IL-13 sobre las células NKT puede también inhibir el efecto biológico que se habría producido durante dicha interacción. Además, una sustancia que se une a un receptor de IL-13 sobre una célula puede activar el efecto biológico normal del receptor al tiempo que libera de forma concomitante un efector a la célula que, por ejemplo, tiene como resultado la muerte de la célula.

Por "que trata" se quiere decir que se observa una mejora del estado de enfermedad, es decir la respuesta inflamatoria de la EII, y/o se detecta tras la administración de una sustancia divulgada en el presente documento. El tratamiento puede variar desde un cambio positivo en uno o más síntomas de la enfermedad hasta la mejora completa de la respuesta inflamatoria de la EII (p. ej., reducción de la gravedad o intensidad de la enfermedad, alteración de los parámetros clínicos indicativos del estado del sujeto, alivio de las molestias o incremento o potenciación de la función), como se detecta mediante técnicas conocidas en la materia. Los procedimientos proporcionados en el presente documento se pueden usar para tratar una EII establecida.

Por "prevención" se quiere decir que tras la administración a un sujeto de una sustancia proporcionada en el presente documento, existe un retraso en el inicio o reducción de la magnitud de los síntomas de la EC o la CU (p. ej., inflamación, diarrea, prolapso rectal, pérdida de peso, dolor abdominal, etc.). Como se usa en el documento, "inverso" o "inversión" quiere decir cambiara a la posición, dirección o curso opuestos, tal como en el cambio del curso de una enfermedad desde empeorando a mejorando.

### IL -13

La sustancia proporcionada en el presente documento que inhibe la unión de la IL-13 a los receptores de IL-13 sobre las células NKT comprende una IL-13 modificada que comprende una IL-13 mutante o un ácido nucleico aislado que codifica una IL-13 mutante, en la que la IL-13 mutante comprende una mutación que consiste en la sustitución de un residuo de ácido glutámico en la posición 14 de la IL-13 por un residuo de aminoácido cargado positivamente o neutro, y en el que la IL-13 mutante está unida a una molécula efectora, en la que la molécula efectora es una citotoxina o un radionúclido. Una IL-13 modificada también puede inhibir la unión de la IL-13 a los receptores de IL-13 en las células epiteliales del intestino. Por "IL-13 modificada" se quiere decir una IL-13 no nativa (es decir, una IL-13 que se ha alterado, incluyendo, por ejemplo, delecciones, inserciones, mutaciones, truncamientos, quimeras, conjugaciones o fusiones) pero que conserva sustancialmente las mismas características de unión al receptor de la IL-13 nativa. Por "nativa" se quiere decir una forma natural, tal como la que se encuentra en la naturaleza. La IL-13 modificada puede ser IL-13 humana modificada IL-13 (hIL-13). La interleucina-13 (IL-13) es una citocina pleiotróica que se sabe que comparte muchas de las propiedades de la IL-4, con la que comparte aproximadamente un 30 % de identidad de secuencia. Exhibe actividades de IL-4 sobre monocitos/macrófagos y células B humanas (Minty y col., Nature, 362: 248 (1993), McKenzie y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:3735-3739 (1987) ("McKenzie y col.,"). Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la IL-13 humana se determinaron y expusieron en la publicación de McKenzie et al., supra, y también están disponibles en internet en, por ejemplo, el buscador Entrez browser del National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) con el número de acceso en GenBank

L06801.

Los primeros ocho residuos aminoacídicos de la secuencia establecida por McKenzie y col., (todos e incluyendo la tercer alanina) se consideran en la técnica que son una secuencia señal y la proteína de IL-13 madura se considera que comienza con el residuo número diecinueve, una serina. La SEC ID N° 1 expone la traducción (incluyendo la secuencia señal, los aminoácidos 1-18 y la IL-13 madura, aminoácidos 19-132) depositada por McKenzie y col., en GenBank con el número de acceso indicado anteriormente. La SEC ID N° 8 muestra la secuencia de de la IL-13 madura (aminoácidos 19-132 de la SEC ID N° 1). Las referencias en el presente documento a residuos concretos de la IL-13, como los residuos 92, 110, y 112, y a porcentajes de identidad con la IL-13, son la secuencia de aminoácidos de la IL-13 humana madura (SEC ID N° 8). La SEC ID N° 2 es la secuencia de nucleótidos para la IL-13 humana, incluyendo la secuencia señal y las regiones no codificantes.

Una IL-13 modificada puede comprender un fragmento de IL-13, de modo que el fragmento de IL-13 se puede unir al receptor de IL-13 pero tiene una capacidad reducida para activar dicho receptor. Por ejemplo, un polipéptido que consiste esencialmente en el dominio de unión al receptor de la IL-13. Se necesitan tres regiones de la IL-13 para la señalización del receptor localizadas en las alfa-hélices A, C y D. Se encontró que los ácidos glutámicos de las posiciones 13 y 16 en la alfa-hélice A de la hIL-13, arginina y serina en las posiciones 66 y 69 en la hélice C, y arginina en la posición 109 en la hélice D eran importantes en la inducción de la señalización biológica porque estas mutaciones daban como resultado en la pérdida y/o ganancia de fenómenos funcionales (Madhankumar AB y col., J Biol Chem. 2002 Nov 8;277(45):43194-205). El fragmento de la IL-13 también puede ser una IL-13 mutada, es decir un fragmento de la IL-13 que incluye una mutación adicional (p. ej., una sustitución, adición, delección interna).

Una IL-13 modificada puede estar permutada circularmente (cpIL-13), de modo que cpIL-13 se puede unir al receptor de IL-13 pero tiene una capacidad reducida para activar dicho receptor. La permutación circular es funcionalmente equivalente a tomar una molécula de cadena lineal, fusionando los extremos (directamente o a través de un adaptador) para formar una molécula circular y después cortar la molécula circular en una localización diferente para formar una molécula de cadena lineal nueva con diferentes extremos (véase, por ejemplo, Goldenberg, y col., J Mol. Biol., 165: 407-413 (1983) y Pan y col., Gene 125: 111-114 (1993)). Por tanto, la permutación circular tiene el efecto de esencialmente conservar la secuencia y la identidad de los aminoácidos de una proteína al tiempo que se generan nuevos extremos en diferentes localizaciones. La permutación circular de la IL-13 proporciona un medio por el cual la proteína IL-13 nativa se puede alterar para producir nuevos extremos carboxilo y amino sin disminuir la especificidad y la afinidad de unión por el receptor de IL-13 en las células NKT. La fabricación y el uso de cpIL-13 se describe en la patente de EE.UU. N° 6.518.061.

Se apreciará que mientras que la permutación circular se describe en términos de unir los dos extremos de una proteína y después cortar la proteína circularizada, estas etapas no son realmente necesarias para crear el producto final. Una proteína se puede sintetizar de novo con la secuencia correspondiente a una permutación circular de la proteína nativa. Por tanto, la expresión "IL-13 permutada circularmente (cpIL-13)" hace referencia a proteínas aILIL-13 que tiene una secuencia correspondiente a una permutación circular de una proteína IL-13 nativa con independencia de cómo se construyen. En general, se prefiere una permutación que retiene o mejora la especificidad de unión y/o avidéz (en comparación con la IL-13 nativa). Si los extremos nuevos interrumpen una región crítica de la proteína nativa, la especificidad de unión y la avidéz se pueden perder.

Existen dos requisitos para la creación de una proteína activa permutada circularmente. 1) Los extremos de la proteína nativa se deben localizar favorablemente de modo que la creación de un enlace no destruya la especificidad de unión y/o la avidéz; y 2) debe existir un "sitio de abertura" en el que se pueden formar nuevos extremos sin alterar una región crucial para el plegamiento de la proteína y la actividad de unión deseada (véase, por ejemplo, Thorton et A J Mol Biol., 167: 443-460 (1983)).

Al realizar la permutación circular de la IL-13, es deseable usar un adaptador que conserve la separación entre los extremos comparables con la molécula no permutada o nativa. En general, los adaptadores que son moléculas hetero u homobifuncionales que contienen dos sitios reactivos que puede formar, cada uno, un enlace covalente con los aminoácidos terminales de carboxilo y amino, respectivamente. Los expertos en la técnica conocen bien los adaptadores adecuados e incluyen, entre otros, adaptadores de carbono de cadena lineal o ramificada, adaptadores de carbono heterocíclicos o adaptadores peptídicos. El ejemplo más habitual y sencillo es un adaptador peptídico que normalmente consiste en varios aminoácidos unidos a través de enlaces peptídicos a los extremos de la proteína nativa. Los adaptadores se pueden unir a los aminoácidos terminales a través de sus grupos laterales (p. ej., a través de un enlace disulfuro a la cisteína). No obstante, en realizaciones preferidas los adaptadores se unirán a los grupos amino y carboxilo en el carbono alfa de los aminoácidos terminales. Los grupos funcionales capaces de formar enlaces covalentes con los aminoácidos en los extremos amino y carboxilo son bien conocidos para los expertos en la técnica. Por ejemplo, los grupos funcionales capaces de unirse al grupo amino terminal incluyen anhídridos, carbodiimidias y cloruros ácidos, ésteres activados y similares. De un modo similar, los grupos funcionales capaces de formar enlaces covalentes con el carboxilo terminal incluyen aminas, alcoholes y similares. El adaptador puede ser, en sí mismo, un péptido y estar unido a los extremos proteicos por enlaces peptídicos.

#### **Mutantes de IL -13**

La IL-13 modificada descrita en el presente documento puede ser una IL-13 mutante que se une al receptor de IL-13

pero que tiene menor capacidad para activar la señalización en dicho receptor. La IL-13 mutante puede ser una IL-13 humana mutante (hIL-13). La IL-13 mutante puede tener una afinidad mayor por el receptor de IL-13 que la IL-13 nativa.

Una "mutación" en un polipéptido puede ser la delección, adición o sustitución de uno o más aminoácidos en un polipéptido. Un polipéptido que se produce como resultado de una mutación se denomina en el presente documento "mutéina". Por ejemplo, una mutación puede ser una sustitución de un aminoácido en una posición concreta en un polipéptido con un aminoácido diferente en dicha posición. Por tanto, por ejemplo, la mutación hIL-13E13K indica que el aminoácido nativo en la posición 13 en hIL-13 (ácido glutámico, E) está sustituido por lisina (K). La mutación no requiere una eliminación real y la sustitución del o los aminoácidos en cuestión. La proteína se puede crear de novo con la sustitución del aminoácido en las posiciones de las mutaciones deseadas, de modo que el resultado neto es equivalente a la sustitución del aminoácido en cuestión.

La mutación del ácido glutámico ("E") en la posición 13 a un aminoácido neutro o, más preferentemente, un aminoácido portador de una carga positiva a pH fisiológico, tiene como resultado un mutante que es un antagonista de la IL-13 (Oshima, Y. y Puri, R.K. (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 15185-15191). Es decir, en presencia de dicho mutante, la actividad de la IL-13 endógena está reducida o completamente bloqueada. Esto permite el alivio de afecciones en las que la IL-13 participa como agente causal o de potenciación. Dichas afecciones incluyen, por ejemplo, asma, rinitis alérgica, ciertos cánceres, como la enfermedad de Hodgkin, sarcoma de Kaposi y carcinoma de células renales y susceptibilidad a Leishmaniasis. Cabe destacar que la presencia de una mutación a un aminoácido neutro o, más preferentemente, a un aminoácido básico en la posición de la IL-13 hace que la mutante sea un antagonista de la actividad de IL-13, incluso si la molécula contiene otras mutaciones, como el cambio de la arginina de la posición 112 a ácido aspártico, lo que, de otro modo, haría que la mutante fuera un agonista potente de la actividad de la IL-13. Por ejemplo, el mutante doble IL-13E13KR112D es un antagonista de la actividad de la IL-13 (Oshima, Y y Puri RK. *FASEB J.* 2001 Jun;15 (8):1469-71) incluso aunque la IL-13R112D mutante sea un potente agonista de la actividad mediada por la IL-13 (Oshima Y, y col., *J Biol Chem.* 2000 May 12;275(19):14375-80).

Los mutantes de la IL-13 en los que el ácido glutámico en la posición 13 se cambia a un residuo con una carga neutra que actuarán como antagonistas de la actividad de la IL-13. El ácido glutámico en la posición 13 se puede cambiar a un residuo que sea neutro o que tenga carga positiva a un pH fisiológico. Por ejemplo, el residuo de ácido glutámico en la posición 13 de la SEC ID N° 8 se puede mutar a lisina (IL-13E13K), arginina (IL-13E13R) o histidina (IL-13E13H). Por tanto, la IL-13 modificada puede ser IL-13E13K mutante de SEC ID N° 8.

La IL-13 mutante divulgada en el presente documento también puede ser una IL-13 truncada, es decir un fragmento de la IL-13 que incluye una mutación adicional (p. ej., una sustitución, adición, delección interna).

Estas y otras mutantes de IL-13 se describen en los documentos WO99/51643, WO01 /25282, WO01/34645, las patentes de EE.UU. N° 5.614.191, 5.919.456, 6.296.843 y 6.576.232.

### 35 Quimeras

La sustancia para usar en el presente documento es una molécula quimérica que comprende una molécula de unión al receptor de IL-13 (IL13RBM) unida a una molécula efectora como se proporciona en las reivindicaciones. Como se usa en el presente documento, "IL13RBM" se refiere a una molécula que se une a un receptor de IL-13 con suficiente afinidad y especificidad para apuntar a los receptores de IL-13 significativamente sobre el fondo. Como se describe en el presente documento, una IL13RBM puede ser una IL-13 nativa, tal como, por ejemplo, hIL-13. En muchos casos, la IL13RBM no activará el receptor de la IL-13. Por tanto, una IL13RBM también puede ser una IL-13 modificada, tal como, por ejemplo, una IL-13 mutante o fragmento de IL-13. Una IL13RBM puede ser un anticuerpo contra el receptor de IL-13. Asimismo, usando el modelo molecular de un receptor de la IL-13, se puede proporcionar otra IL13RBM con estructuras adecuadas.

Una "molécula quimérica" es una molécula sencilla creada uniendo dos o más moléculas que existen por separado en su estado nativo. La molécula sencilla quimérica tiene la funcionalidad deseada de todas sus moléculas constituyentes.

La molécula efectora puede ser cualquier molécula que se pueda conjugar con un IL13RBM y ejercer una función concreta. La molécula efectora normalmente tiene una actividad característica que se desea proporcionar a la célula NKT diana. Ejemplos no limitantes de moléculas efectoras incluyen citotoxinas, marcadores, radionúclidos, anticuerpos y agentes farmacológicos. La molécula efectora para usar de acuerdo con la invención es una citotoxina o un radionúclido.

Una IL13RBM conjugada con una o más citotoxinas se puede usar para matar células que expresan (o sobreexpresan) un receptor de IL-13, por ejemplo células NKT. Como se usa en el presente documento, las citotoxinas pueden ser cualquier agente citotóxico (es decir, una molécula que puede matar una célula tras ponerse en contacto con la célula) o una subunidad citotóxica o mutante de la misma, que se puede conjugar con una IL13RBM. Ejemplos de citotoxinas incluyen, entre otros, radionúclidos (p. ej., <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C, <sup>32</sup>P, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>90</sup>Y, <sup>89</sup>Zr, <sup>201</sup>Tl, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>57</sup>Cu, <sup>213</sup>Bi, <sup>211</sup>At, radionúclidos conjugados y agentes quimioterapéuticos. Otros ejemplos de citotoxinas

incluyen, entre otros, antimetabolitos (p. ej., 5-fluorouracilo (5-FU), metotrexato (MTX), fludarabina -), agentes anti-microtúbulos (p.ej., vincristina, vinblastina, colchicina, taxanos (como paclitaxel y docetaxel). agentes alquilantes (p. ej., ciclofosfamida, melfalán, biscloroetilnitrosourea (BCNU), agentes de platino (p. ej., cisplatino (también denominado Cddp), carboplatino oxaliplatino JM-216, CI-973 ), anthraciclinas (p.ej., doxorubicina, daunorubicina), antibióticos (p. ej., mitomicina-C), inhibidores de la topoisomerasa (p. ej., etopósido, tenopósido, y camptotecinas). La citotoxina del presente procedimiento puede además ser exotoxina de *Pseudomonas* (PE) o una subunidad citotóxica o mutante de la misma, toxina diftérica (TD) o una subunidad citotóxica o mutante de la misma, ricina, saporina, gelonina, caliqueamicina, doxorubicina, ribotoxina, proteína inactivadora del ribosoma o abrina. Las citotoxinas divulgadas del presente documento también pueden modificarse para eliminar su capacidad para la unión inespecífica.

La exotoxina A de *Pseudomonas* (PE) es una proteína monomérica extremadamente activa (peso molecular de 66 kD), secretada por *Pseudomonas aeruginosa*, que inhibe la síntesis de proteínas en células eucariotas a través de la inactivación del factor de elongación 2 (EF-2) catalizando su ADP-ribosilación (catalizando la transferencia del resto ADP-ribosilo del NAD oxidado en el EF-2). La PE contiene tres dominios estructurales que actúan en concierto para producir citotoxicidad. La estructura de la PE se conoce en la técnica y se divulga en, por ejemplo, Pastan I, y col., (Annu Rev Biochem. 1992. 61:331-54) y Debinski W, y col., (J. Biol Chem. 1995. 270(28):16775-80). La secuencia para PE se puede encontrar en la base de datos GenBank a través del número de acceso K01397 (SEC ID N° 3). El dominio I (aminoácidos 1-252) participa en la unión celular. El dominio II (aminoácidos 253-364) es responsable de la translocación al citosol y el dominio III (aminoácidos 400-613) participa en la ribosilación del ADP del factor 2 de elongación, que inactiva la proteína y produce la muerte celular. La función del dominio Ib (aminoácidos 365-399) permanece indefinido, aunque una gran parte de él, los aminoácidos 365-380 se pueden eliminar sin pérdida de citotoxicidad. Además, la eliminación del dominio I tiene como resultado una molécula de PE truncada (PE40), que conserva toda la actividad de ADP-ribosilación. Véase Siegall y col., J Biol. Chem. 264: 14256-14261 (1989), incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad por sus enseñanzas del uso de la exotoxina A de *Pseudomonas* en una proteína de fusión.

Además, las moléculas de PE se pueden modificar adicionalmente usando mutagénesis dirigida a sitio u otras técnicas conocidas en la materia, para alterar la molécula para una aplicación deseada concreta. También se pueden usar medios para alterar la molécula de PE de un modo que no afecte sustancialmente a las ventajas funcionales proporcionadas por las moléculas de PE descritas en el presente documento y se pretende que el presente documento cubra dichas moléculas resultantes.

Para las propiedades citotóxicas máximas de una molécula de PE se divulgan varias modificaciones de la molécula. Las modificaciones en la secuencia del extremo carboxilo de la PE afectan a la translocación de la molécula al citosol de las células diana. Las secuencias de aminoácidos que se han encontrado eficaces incluyen REDLK (SEC ID N° 5) (como en la PE nativa), REDL (SEC ID N° 6), RDEL (SEC ID N° 7), o KDEL (SEC ID N° 4), repeticiones de estas u otras secuencias que funcionan para mantener o reciclar proteínas en el retículo endoplásmico, denominadas en el presente documento "secuencias de retención endoplásmicas". Véase, por ejemplo, Chaudhary y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:308-312 y Seetharam y col. J Biol. Chem. 266: 17376-17381 (1991).

Se pueden realizar deleciones de los aminoácidos 365-380 del dominio Ib sin perder actividad. Además, una sustitución de metionina en la posición aminoacídica 280 en lugar de glicina para permitir el comienzo de la síntesis de la proteína y de la serina en la posición aminoacídica 287 en lugar de cisteína para evitar la formación de puentes disulfuro inadecuados, es beneficiosa.

La IL13RBM se puede insertar en sustitución para el dominio a. Se ha conseguido una inserción similar en lo que se conoce como la molécula TGF $\alpha$ -PE40 (también denominada TP40) descrita por Heimbrook y col., Proc. Natl Acad Sci., USA, 87: 4697 -4701 (1990) y la patente de EE.UU. n° 5.458. 878.

Una IL13RBM se puede unir a la molécula de PE denominada PE38. Esta molécula de PE es una forma truncada de la PE compuesta por los aminoácidos 253-364 y 381-608. La IL13RBM se puede unir a PE38, seguida de las secuencias nativas REDLK (SEC ID N° 5) o las secuencias mutantes KDEL (SEC ID N° :4) o RDEL (SEC ID N° 7). Las lisinas en las posiciones 590 y 606 pueden estar opcionalmente mutadas a glutamina. Además, la PE38 se puede modificar adicionalmente para crear una variante conocida como PE38QQR sustituyendo los residuos de lisina en las posiciones 509 y 606 por glutamina y sustituyendo el residuo en 613 por arginina (Debinski y col., Bioconj. Chem., 5: 40 (1994)). La IL13RBM se puede unir a la molécula de PE denominada PE4E. La PE4E es una PE de "longitud completa" como un dominio de unión mutado y nativo inactivo en el que los aminoácidos 57, 246, 247, y 249 están todos sustituidos por glutamatos (véase, por ejemplo, Chaudhary y col., J Biol. Chem., 265: 16306 (1995)). Por tanto, en un aspecto, la molécula efectora es la exotoxinas de *Pseudomonas* PE35, PE38, PE38KDEL, PE40, PE4E o PE38QQR.

La IL13RBM se puede insertar en un punto dentro del dominio III de la molécula PE. La IL13RBM se puede condensar entre aproximadamente las posiciones de aminoácidos 607 y 609 de la molécula PE. Esto significa que la molécula dirigida se inserta después de aproximadamente el aminoácido 607 de la molécula y un extremo carboxilo adecuado de la PE se recrea colocando los aminoácidos aproximadamente 604-613 de la PE después de la molécula dirigida. Por tanto, la molécula dirigida se inserta dentro de la molécula de PE recombinante después de



aproximadamente el aminoácido 607 y es seguida por los aminoácidos 604-613 del dominio m. La IL13RBM también se puede insertar en el dominio lb para sustituir las secuencias no necesarias para la toxicidad (Debinski, y col., (1991) Mol. Cell. Biol., 11: 1751-1753).

5 Las moléculas de PE se pueden condensar con la molécula dirigida (p. ej., IL13RBM) por medios recombinantes. Los genes que codifican las cadenas de proteínas se pueden clonar en ADNc o en forma genómica usando cualquier procedimiento conocido para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989)). Los procedimientos de clonación de genes que codifican PE condensada a varios ligandos son bien conocidos para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Siegall y col., FASEB J, 3:2647-2652 (1989); y Chaudhary y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 4538-4542 (1987)).

10 Los expertos en la técnica se darán cuenta que modificaciones, deleciones, inserciones y similares adicionales se pueden realizar en las moléculas quiméricas del presente procedimiento o en las secuencias de ácido nucleico que codifican las moléculas quiméricas dirigidas al receptor de IL-13.

15 Como la PE, la toxina diftérica (DT) mata las células mediante ADP-ribosilación del factor de elongación 2, de modo que inhibe la síntesis de proteínas. No obstante, la toxina diftérica se divide en dos cadenas, A y B, unidas por un puente disulfuro. En contraste con la PE, la cadena B de la DT, que está en el extremo carboxilo, es responsable de la unión al receptor, y la cadena A, que está presente en el extremo amino, contiene la actividad enzimática (Uchida y col., Science, 175:901-903 (1972); Uchida y col., J Biol. Chem., 248: 3838-3844 (1973)).

20 La expresión "Toxina diftérica" (DT), como se usa en el presente documento, se refiere a la DT nativa de longitud completa o a una DT que se ha modificado. Las modificaciones normalmente incluyen la eliminación del dominio diana en la cadena B y, más específicamente, implican truncamientos de la región carboxilo de la cadena B. El dominio de unión al receptor nativo de la DT se puede eliminar mediante truncamiento de la cadena B de la toxina diftérica. Por ejemplo, la DT puede ser DT388, en la que la secuencia en carboxilo terminal que comienza en el residuo 389 se elimina, o DT389, en la que se elimina la secuencia en carboxilo terminal que comienza en el residuo 399 (Chaudhary, y col., 1991 Bioch. Biophys. Res. Comm., 180: 545-551). En la técnica se conocen otros ejemplos de DT y estas DT son útiles como el resto de citotoxina de las quimeras divulgadas para usar en los procedimientos enseñados en el presente documento.

25 Como las citotoxinas quiméricas de PE, las moléculas de DT se pueden conjugar químicamente con una molécula de IL-13 o condensar con IL-13 por medios recombinantes. Los genes que codifican las cadenas de proteínas se pueden clonar en ADNc o en forma genómica usando cualquier procedimiento de clonación conocido para los expertos en la técnica. Los expertos en la técnica también conocen bien procedimientos de clonación de genes que codifican la DT condensada a varios ligandos (véase, por ejemplo, Williams y col., J Biol. Chem. 265: 11885-11889 (1990)).

Otras moléculas efectoras, incluidas otras citotoxinas, se describen en los documentos WO99/51643, WO01/25282, WO01/34645, WO03/047632, las patentes de EE.UU. N° 5,614,191, 5,919,456, 6,296,843, 6,428,788 y 6,576,232.

### 35 **Marcadores detectables**

Marcadores detectables adecuados incluyen cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmuoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Marcadores útiles en la presente invención incluyen perlas magnéticas (p. ej., DYNABEADSTM), colorantes fluorescentes (p. ej., isotiocianato de fluoresceína, rojo texas, rodamina, proteína verde fluorescente y similares), radiomarcadores (p. ej., 3H, 125J, 35S, 40 14C, o 32p), enzimas (p. ej., peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina y otros de uso habitual en un ELISA) y marcadores colorimétricos, tales como oro coloidal o cristal coloreado o perlas de plástico (p. ej., poliestireno, polipropileno y látex).

45 Los expertos en la materia conocen bien los medios para detectar dichos marcadores. Por tanto, por ejemplo, los radiomarcadores se pueden detectar usando película fotográfica o contadores de centelleo, los marcadores fluorescentes se pueden detectar usando un fotodetector para detectar la iluminación emitida. Los marcadores enzimáticos normalmente se detectan proporcionando a la enzima un sustrato y detectando el producto de la reacción producido por la acción de la enzima sobre el sustrato y los marcadores colorimétricos se detectan simplemente visualizando el marcador coloreado.

### **Agentes farmacológicos**

50 Otras moléculas efectoras adecuadas incluyen agentes farmacológicos o sistemas de encapsulación que contienen varios agentes farmacológicos. Por tanto, la molécula dirigida de la molécula quimérica se puede unir directamente a un fármaco que se va a proporcionar directamente en la célula NKT. Dichos fármacos son bien conocidos para el experto en la técnica e incluyen doxorubicina, ribotoxina, vinblastina, genisteína y moléculas antisentido. La doxorubicina y la ribotoxina son no inmunogénicas y, por tanto, se pueden usar en múltiples aplicaciones.

55 Se divulga un conjugado de IL13RBM con uno o más vehículos de liberación. Dichos conjugados se pueden usar para proporcionar otras sustancias como un fármaco a las células que expresan un receptor al que se une la IL-13. Se puede usar cualquier vehículo de liberación que se pueda conjugar con IL13RBM. Ejemplos de estos vehículos

de liberación incluyen liposomas y lípidos (p. ej., micelas). También se pueden usar liposomas que encapsulan fármacos o micelas que incluyen fármacos. Los expertos en la técnica conocen procedimientos para preparar liposomas unidos a proteínas. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 4.957.735; y Connor y col., *Pharm. Ther.*, 28: 341-365 (1985).

## 5 Ácidos nucleicos

IL13RBM conjugada con uno o más ácidos nucleicos se puede usar para proporcionar especialmente el o los ácidos nucleicos en una célula diana (p. ej., una que exprese un receptor al que se una la IL-13). Se puede usar cualquier ácido nucleico que se pueda conjugarse con IL13RBM. Los ácidos nucleicos se pueden unir directamente a IL13RBM o unir mediante un adaptador formando un complejo con o encapsulado en otro resto (p. ej., un lípido, un liposoma, un recubrimiento viral), que esté unido a IL13RBM. El ácido nucleico puede proporcionar cualquier número de funciones efectoras. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica una o más proteínas se puede usar para proporcionar una actividad enzimática, sustrato y/o epítipo a una célula diana. Para estas aplicaciones u otras en las que se desee la expresión (p. ej., transcripción o traducción) del ácido nucleico, el ácido nucleico es, preferentemente, un componente de un casete de expresión que incluye todas las secuencias reguladoras necesarias para expresar el ácido nucleico en la célula. Casetes de expresión adecuados normalmente incluyen el promotor, los codones de inicio y terminación y se seleccionan para optimizar la expresión de una célula diana. Los procedimientos de construir casetes de expresión adecuados son bien conocidos para los expertos en la técnica

### Conjugación

La molécula dirigida y la molécula efectora pueden unirse mediante diversos medios bien conocidos para los expertos en la técnica. Por tanto, la molécula efectora se puede conjugarse (p. ej., unir de forma covalente) con una L13RBM por cualquier procedimiento conocido en la técnica para conjugarse dos de estas moléculas. Por ejemplo, la IL13RBM se puede derivar químicamente con una molécula efectora bien directamente o usando un adaptador (espaciador). Se conocen varios procedimientos y reactivos (p. ej., reticuladores) para mediar esta conjugación. Véase, por ejemplo, el catálogo de Pierce Chemical Company; y Means and Feeney, *Chemical Modification of Proteins*, Holden-Day Inc., San Francisco, Calif. 1971. Varios procedimientos y moléculas adaptadoras para unir varios compuestos incluyendo radionúclidos, quelatos metálicos, toxinas y fármacos, a proteínas (p. ej., anticuerpos) se describen en, por ejemplo, el documento EP-A-188,256; las patentes de EE.UU. N° 4.671.958; 4.659.839; 4.414.148; 4.699.784; 4.680.338; 4.569.789; y 4.589.071; y Borlinghaus y col., *Cancer Res.* 47: 4071-4075 (1987). En particular, la producción de varias inmunotoxinas es bien conocida dentro de la técnica y se puede encontrar en, por ejemplo: "Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates: Aiming the Magic Bullet," Thorpe y col., *Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine*, Academic Press, pp. 168-190 (1982); Waldmann (1991) *Science*, 252: 1657 (1993) y las patentes de EE.UU. n° 4.545.985 y 4.894.443.

Cuando la molécula efectora es un polipéptido, la molécula quimérica, incluida la molécula IL13RBM y la efectora, puede ser una proteína de fusión. Una "proteína de fusión" hace referencia a un polipéptido formado por la unión de dos o más polipéptidos a través de un enlace peptídico formado entre el extremo amino de un polipéptido y el extremo carboxilo de otro polipéptido. La proteína de fusión se puede formar mediante acoplamiento químico de los polipéptidos constituyentes o se puede expresar como un único polipéptido a partir de una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión contigua única. Una proteína de fusión sencilla es una proteína de fusión que tiene una única estructura polipeptídica contigua. Las proteínas de fusión se pueden preparar usando técnicas convencionales en biología molecular para unir los dos genes en el marco en un único ácido nucleico y expresar después el ácido nucleico en una célula huésped adecuada en condiciones en las cuales se produce la proteína de fusión.

Un experto apreciará que la molécula dirigida y las moléculas efectoras se pueden unir en cualquier orden. Por tanto, cuando la molécula dirigida es un polipéptido, la molécula efectora se puede unir al extremo amino o carboxi de la molécula dirigida. La molécula dirigida también se puede unir a una región interna de la molécula efectora o, por el contrario, la molécula efectora se puede unir a una localización interna de la molécula dirigida, siempre que la unión no interfiera con las correspondientes actividades de las moléculas.

En algunas circunstancias, es deseable proporcionar la molécula efectora de IL13RBM cuando la molécula quimérica ha alcanzado su sitio diana. Por tanto, los conjugados quiméricos que comprenden enlaces escindibles en la proximidad del sitio diana se pueden usar cuando se tiene que proporcionar el efector en el sitio diana. La escisión del enlace para proporcionar la molécula efectiva de IL13RBM se puede efectuar mediante actividad enzimática o condiciones en las que el conjugado esté sujeto al interior de la célula diana o en las proximidades del sitio diana. Los expertos en la técnica conocen una serie de adaptadores escindibles diferentes. Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 4.618.492; 4.542.225; y 4.625.014. Los mecanismos para proporcionar un agente de estos grupos adaptadores incluye, por ejemplo, irradiación de un enlace fotolábil e hidrólisis catalizada con ácido. La patente de EE.UU. N° 4,671,958, por ejemplo, incluye una descripción de inmunocombinados que comprenden adaptadores que se escinden en el sitio diana *in vivo* mediante enzimas proteolíticas del sistema de complemento del paciente. En vista del gran número de procedimientos que se han comunicado para unir varios compuestos radiodiagnósticos, compuestos radioterapéuticos, fármacos, toxinas y otros agentes a anticuerpos, un experto en la técnica podrá determinar un procedimiento adecuado para unir una molécula efectora dada a una molécula de IL-13.

### Receptores solubles de IL-13

Una sustancia que puede inhibir la unión de la IL-13 a los receptores de IL-13 en las NKT puede comprender un receptor de IL-13 soluble. Un receptor de IL-13 soluble puede ser, por ejemplo, un receptor de IL-13 unido a la región constante (Fc) de una inmunoglobulina (es decir, una trampa de citocina). El receptor de IL-13 soluble del procedimiento proporcionado puede comprender IL-13R $\alpha$  o IL13R $\alpha$ 2. El IL-13R $\alpha$  puede ser IL-13R $\alpha$  de rata o fragmentos del mismo. La secuencia de este receptor se puede consultar en la base de datos GenBank a través del número de acceso AY044251. El IL-13R $\alpha$  puede ser IL-13R $\alpha$  de ratón o fragmentos del mismo. La secuencia de este receptor se puede consultar en la base de datos GenBank a través del número de acceso S80963. El IL-13R $\alpha$  puede ser también IL-13R $\alpha$  humano o fragmentos del mismo. La secuencia de este receptor se puede consultar en la base de datos GenBank a través del número de acceso U62858.

El IL-13R $\alpha$ 2 puede ser IL-13R $\alpha$ 2 humano o fragmentos del mismo. La secuencia de este receptor se puede consultar en la base de datos GenBank a través del número de acceso NM\_000640. El IL-13R $\alpha$ 2 también puede ser un IL-13R $\alpha$ 2 de ratón o fragmentos del mismo. La secuencia de este receptor se puede consultar en la base de datos GenBank a través del número de acceso U65747.

### Anticuerpos

Una sustancia que puede inhibir la unión de la IL-13 a los receptores de IL-13 en las NKT puede comprender un anticuerpo. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" incluye, entre otros, inmunoglobulina completa (es decir, un anticuerpo intacto) de cualquier clase. Los anticuerpos nativos normalmente son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150 kDa compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Normalmente, cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un enlace covalente disulfuro, aunque el número de enlaces disulfuro entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina varía. Cada cadena pesada y ligera también tienen puentes disulfuro intracatenarios separados de forma regular. Cada cadena pesada tiene, en un extremo, un dominio variable (VH) seguido por una serie de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (VL) en un extremo y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que algunos residuos de aminoácidos forman una interfaz entre los dominios variables de las cadenas ligera y pesada. Las cadenas ligeras de los anticuerpos de cualquier especie de vertebrados se pueden asignar a uno de dos tipos claramente distintos, Kappa ( $\kappa$ ) y Lambda ( $\lambda$ ) en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. En función de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas humanas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG-1, IgG-2, IgG-3 e IgG-4; IgA-1 e IgA-2. Un experto en la materia reconocería las clases equiparables en ratón. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, epsilon, gamma y mu, respectivamente.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos contra la IL-13 humana (Dolganov, y col. "Coexpression of the interleukin-13 and interleukin-4 genes correlates with their physical linkage in the cytokine gene cluster on human chromosome 5q23-31" Blood 87 (8), 3316-3326 (1996)). La secuencia de la IL-13 humana se puede consultar en GenBank a través del nº de acceso U31120. Los anticuerpos del procedimiento proporcionado también pueden ser anticuerpos contra IL-13 de ratón (Brown, y col., "A family of small inducible proteins secreted by leukocytes are members of a new superfamily that includes leukocyte and fibroblast-derived inflammatory agents, growth factors, and indicators of various activation processes" J. Immunol. 142 (2), 679-687 (1989)). Esta secuencia se puede consultar en la base de datos GenBank a través del número de acceso NM\_008355..

El anticuerpo puede ser un anticuerpo contra el receptor de IL-13. Dicho anticuerpo es IL13RBM.

En el presente documento, el término "variable" se usa para describir determinadas partes de los dominios variables que difieren en secuencia entre los anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, normalmente la variabilidad no se distribuye de manera uniforme dentro de los dominios variables de anticuerpos. Esta se concentra normalmente en tres segmentos denominados regiones determinantes de la complementariedad (RDC) o regiones hipervariables tanto en los dominios variables de cadena ligera como de cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan estructurales (FR). Cada uno de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprenden cuatro regiones FR, adoptando principalmente una configuración de lámina  $\beta$ , conectada por tres CDR, que forman bucles de conexión y en algunos casos formando parte de la estructura de lámina. Las CDR de cada cadena pueden mantenerse juntas en estrecha proximidad por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat E. A. y col., "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987)). Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como, la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos..

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo o fragmentos" de los mismos" incluye anticuerpos

- quiméricos y anticuerpos híbridos, con especificidades antigénicas o epitópicas duales o múltiples y fragmentos, 60 tales como F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fab, scFv y similares, incluyendo fragmentos híbridos. Por lo tanto, se proporcionan fragmentos de anticuerpos que conservan la capacidad de unirse a sus antígenos específicos. Por ejemplo, fragmentos de anticuerpos que conservan actividad de unión por IL-13, IL-13R $\alpha$ , o IL-13R $\alpha$ 2 se incluyen dentro del
- 5 significado de la expresión "anticuerpo o fragmento de los mismos", Dichos anticuerpos y fragmentos pueden fabricarse por técnicas conocidas en el campo técnico y pueden explorarse para determinar la especificidad y la actividad de acuerdo con los procedimientos expuestos en los Ejemplos y en los procedimientos generales para la producción de anticuerpos y exploración de anticuerpos para determinar la especificidad y la actividad (Véase Harlow y Lane. *Antibodies, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Publications, New York, (1988)).
- 10 Dentro del significado de "anticuerpo o fragmentos de los mismos" también se incluyen conjugados de fragmentos de anticuerpos y proteínas de unión a antígeno (anticuerpos monocatenarios) como se describe, por ejemplo, en la 10 Patente de Estados Unidos N° 4.704.692.
- Opcionalmente, los anticuerpos se generan en otras especies y se "humanizan" para la administración a seres humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo murinos) son inmunoglobulinas
- 15 quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv u otras subsecuencias de anticuerpos de unión a antígeno) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que restos procedentes de una región determinante de la complementariedad (RDC) del receptor se sustituyen por restos de una RDC de especies no humanas (anticuerpo donante) tales como ratón, rata o conejo que
- 20 poseen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas En algunos casos, los restos flanqueantes Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por restos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o secuencias flanqueantes. En general, los anticuerpos humanizados comprenderán sustancialmente todos de al menos uno y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR
- 25 corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas de las regiones RF son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá de manera óptima al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana (Jones y col., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature*, 332: 323-327 (1988); y Presta, *Curry Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992)).
- 30 En la técnica se conocen bien procedimientos para la humanización de anticuerpos no humanos. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos aminoacídicos introducidos en el mismo procedente de una fuente que es no-humana. Estos restos aminoacídicos no-humanos son denominados frecuentemente restos "importados", que normalmente se extraen de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones y col., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann y col.,
- 35 *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen y col., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), sustituyendo las RDC o secuencias de RDC de roedores por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567), en los que se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente
- 40 anticuerpos humanos en los que algunos restos de la RDC y posiblemente algunos restos de la RF se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.
- La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para su uso en la fabricación de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el procedimiento "más adecuado", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se explora contra toda la biblioteca de
- 45 secuencias de dominio variable humano. Después, la secuencia humana más parecida a la de roedor se acepta como la región estructural (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims y col., *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia y col., *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). Otro procedimiento usa una región flanqueante particular de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligera o pesada. Para varios anticuerpos humanizados diferentes puede usarse la misma región flanqueante (Carter y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta y col., *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).
- 50 Además es importante que los anticuerpos estén humanizados manteniendo una alta afinidad por el antígeno u otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina
- 55 tridimensionales se encuentran normalmente disponibles y son conocidos por los expertos en la materia. Existen programas informáticos disponibles que ilustran y presentan posibles estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis de la posible función de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influye en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los restos FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de la secuencia consenso e importadora para conseguir las características deseadas del anticuerpo, tales como afinidad por el antígeno (o antígenos) diana
- 60 aumentada. En general, los restos de la RDC participan directa y mas sustancialmente en ejercer influencia sobre la

unión al antígeno (véase el documento WO 94/04679, publicado el 3 de marzo de 1994).

Pueden usarse animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que, después de la inmunización, son capaces de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (U(H)) en ratones de línea germinal mutante y quiméricos da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la serie génica de inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones de línea germinal mutante dará como resultado la producción de anticuerpos humanos después de la exposición al antígeno (véase, por ejemplo, Jakobovits y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551-255 (1993); Jakobovits y col., Nature, 362: 255-258 (1993); Bruggemann y col., Year in Immunol., 7:33 (1993)). Los anticuerpos humanos también pueden producirse en fagotecas de presentación (Hoogenboom y col., J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks y col., J. Mol. Biol., 222: 581 (1991)). Los procedimientos de Cote y col. y de Boerner y col. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner y col., J. Immunol., 147(1): 86-95 (1991)).

El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos salvo posibles mutaciones de origen natural que puedan estar presentes en menores cantidades. Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo particular, aunque el resto de la cadena (o cadenas) es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad deseada (Véase, la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567 y Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)).

Los anticuerpos monoclonales de la invención pueden prepararse usando procedimientos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, Nature, 256: 495 (1975) o Harlow y Lane. Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Publications, New York, (1988). En un procedimiento de hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, se inmuniza normalmente con un agente inmunizante para producir linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. El agente inmunizante puede comprender IL-13 o fragmentos de la misma (p. ej., IL13RBM) o el receptor soluble de IL-13 (p. ej., IL-13R $\alpha$ , o IL-13R $\alpha$ 2) o un fragmento del mismo. Tradicionalmente, la generación de anticuerpos monoclonales ha dependido de la disponibilidad proteína o péptidos purificados para su uso como inmunógeno. Más recientemente se han usado inmunizaciones basadas en ADN para provocar fuertes respuestas inmunitarias y generar anticuerpos monoclonales. En esta estrategia, se usa la inmunización basada en ADN, en la que el ADN que codifica IL-13 o fragmentos de la misma (p. ej., IL13RBM) o el receptor soluble de IL-13 (p. ej., IL-13R $\alpha$ , or IL-13R $\alpha$ 2) o un fragmento del mismo que se expresa como una proteína de fusión con IgG1 humana se inyecta en el animal huésped de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica (por ejemplo, Kilpatrick KE, y col. Gene gun delivered DNA-based immunizations mediate rapid production of murine monoclonal antibodies to the Fl t-3 receptor. Hybridoma. 1998 Dec;17(6):569-76; Kilpatrick KE y col., High-affinity monoclonal antibodies to PED/PEA-15 generated using 5 mg of DNA. Hybridoma. 2000 Aug;19(4):297-302,

Una estrategia alternativa para la inmunización con proteína purificada o con ADN es usar antígenos expresados en baculovirus. Las ventajas de este sistema incluyen facilidad de generación, elevados niveles de expresión y modificaciones postraduccionales que son muy similares a las observadas en sistemas de mamíferos. Esto da como resultado la presentación de proteínas extrañas sobre la superficie del virión. Este procedimiento permite la inmunización con virus completo, eliminando la necesidad de purificar antígenos diana.

Generalmente, en los procedimientos de producción de anticuerpos monoclonales, si se desean células de origen humano se usan linfocitos de sangre periférica ("PBL") o si se desean fuentes de mamíferos se usan células esplénicas o células de nódulos linfáticos. Los linfocitos se fusionan después 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) pp. 59-103). Las líneas celulares inmortalizadas normalmente son células de mamífero transformadas, que incluyen células de mieloma de origen roedor, bovino, equino y humano. Normalmente, se emplean líneas de células de mieloma de rata o de ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que contenga preferentemente una o más sustancias que inhiban el crecimiento o la supervivencia de células inmortalizadas no fusionadas. . Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirán hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que impiden el crecimiento de células deficientes en HGPRT. Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son las que se fusionan eficazmente, mantienen estable el nivel de expresión elevado del anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferidas son líneas de mieloma murinas, que pueden obtenerse, por ejemplo, del Centro de Distribución de Células del Instituto Salk, San Diego, California y de la Colección de Cultivos Tipo Americana de Rockville, Md. Para la producción de anticuerpos monoclonales humanos también se han descrito líneas de células

de mieloma humano 5 y de heteromiéloma humano-ratón (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur y col., "Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications" Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) págs. 51-63). El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma puede después ensayarse para determinar la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra IL-13, o un fragmento de la misma (p. ej., IL13RBM), o el receptor soluble de IL-13 (p. ej., IL-13R $\alpha$ , or IL-13R $\alpha$ 2) o un fragmento del mismo. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma 10 se determina por inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Dichas técnicas y ensayos se conocen en la técnica y se describen adicionalmente más adelante en los Ejemplos o en el documento Harlow y Lane Antibodies, A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, (1988).

Después de identificar las células de hibridoma deseadas, los clones pueden subclonarse por dilución limitante o por procedimientos de separación de células activadas por fluorescencia FACS y se cultivan por procedimientos convencionales. Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, Medio de Eagle Modificado por Dulbecco y medio RPMI-1640. Como alternativa, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como ascitis en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden aislarse o purificarse del medio de cultivo o del fluido de ascitis por procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, cromatografía de proteína A-Sefarosa, proteína G, hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía por afinidad.

Los anticuerpos monoclonales también pueden fabricarse por procedimientos de ADN recombinante, tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales divulgados en el presente documento puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la presente invención sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede insertarse en vectores de expresión, que después se transfectan en células huéspedes tales como células COS de simio, células de ovario de hámster Chino (CHO), células de plasmacitoma o células de mieloma que de otro modo no producen la proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huéspedes recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante por los dominios constantes de cadena pesada y ligera en lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567) o por unión covalente a toda la secuencia codificante de inmunoglobulina o a parte de la secuencia codificante para un polipéptido que no es inmunoglobulina. Opcionalmente, dicho polipéptido que no es inmunoglobulina se sustituye por los dominios constantes de un anticuerpo del procedimiento proporcionado o se sustituye por los dominios variables de un sitio de combinación al antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprenda un sitio de combinación al antígeno que tenga especificidad por IL-13 o un fragmento de la misma (p. ej., IL13RBM), o al receptor soluble de IL-13 (p. ej., IL-13R $\alpha$ , o IL-13R $\alpha$ 2) o un fragmento del mismo y otro sitio de combinación al antígeno que tenga especificidad para un antígeno diferente.

Los procedimientos *in vitro* también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente fragmentos Fab, puede conseguirse usando procedimientos rutinarios conocidos en la técnica. Por ejemplo, la digestión puede realizarse usando papaína. Los ejemplos de digestión con papaína se describen en el documento WO 94/29348 publicado el 22 de diciembre de 1994, en la Patente de Estados Unidos N° 4.342.566 y en Harlow y Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, (1988). La digestión de anticuerpos con papaína produce normalmente dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos Fab, cada uno con un solo sitio de unión a antígeno y un fragmento Fc residual. El tratamiento con pepsina produce un fragmento, denominado fragmento F(ab')<sub>2</sub>, que posee dos sitios de combinación a antígeno y que además puede entrecruzar antígenos.

Los fragmentos Fab producidos en la digestión de anticuerpos también contienen los dominios constantes de la cadena ligera y el primer dominio constante de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' se diferencian de los fragmentos Fab por la adición de pocos restos en el término carboxilo del dominio de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. El fragmento F(ab')<sub>2</sub> es un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab' unidos por un puente disulfuro a la región bisagra. En el presente documento, se denomina Fab'-SH, a Fab' cuando el resto (o restos) de cisteína de los dominios constantes contiene un grupo tiol libre. Originalmente, los fragmentos de anticuerpo se produjeron como pares de fragmentos Fab' que poseían cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

También se proporciona un paratopo o fragmento del anticuerpo aislado inmunogénicamente específico. Un epítipo específico inmunogénico del anticuerpo puede aislarse del anticuerpo completo por modificación química o mecánica de la molécula. Los fragmentos purificados así obtenidos se ensayan para determinar su inmunogenicidad y especificidad por los procedimientos indicados en la presente memoria. Opcionalmente, los paratopos inmunorreactivos del anticuerpo se sintetizan directamente. Un fragmento inmunorreactivo se define como una secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente de dos a cinco aminoácidos consecutivos derivados de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo.

Un procedimiento de producción de proteínas que comprende los anticuerpos de la presente invención es unir dos o más péptidos o polipéptidos juntos mediante técnicas de química de proteínas. Por ejemplo, los péptidos o polipéptidos pueden sintetizarse químicamente usando equipo de laboratorio normalmente disponible usando química Fmoc (9-fluorenil-metiloxycarbonilo) o Boc (terc-butiloxycarbonilo) (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA).  
 5 Un experto en la materia puede apreciar fácilmente que un péptido o polipéptido correspondiente al anticuerpo de la presente invención, por ejemplo, puede sintetizarse mediante reacciones químicas convencionales. Por ejemplo, un péptido polipéptido puede sintetizarse y no escindirse de su resina de síntesis mientras que el otro fragmento de un 10 anticuerpo puede sintetizarse y posteriormente escindirse de la resina, por lo que se expone a un grupo terminal que se bloquea funcionalmente sobre el otro fragmento. Mediante reacciones de condensación peptídica, estos dos fragmentos pueden unirse covalentemente mediante un enlace peptídico a su extremo carboxilo y amino, respectivamente, para formar un anticuerpo o un fragmento del mismo. (Grant. *Synthetic Peptides: A User Guide*. W. H. Freeman y Co., N. Y. (1992); Bodansky y Trost ., Ed. (1993) *Principles of Peptide Synthesis*. Springer-Verlag Inc., NY. De manera alternativa, el péptido o polipéptido se sintetiza independiente in vivo como se ha descrito anteriormente. Una vez aislado, estos péptidos o polipéptidos independientes pueden unirse para formar un anticuerpo o fragmento del mismo mediante reacciones de condensación peptídicas similares.

Por ejemplo, el ligamiento enzimático de fragmentos peptídicos clonados o sintéticos permite que se unan fragmentos peptídicos relativamente cortos para producir fragmentos peptídicos más largos, polipéptidos o dominios de proteína completa (Abrahmsen y col., *Biochemistry*, 30: 4151 (1991)). De manera alternativa, el ligamiento químico natural de péptidos sintéticos puede usarse para construir mediante síntesis péptidos o polipéptidos grandes de fragmentos peptídicos más cortos. Este procedimiento consiste en una reacción química de dos etapas (Dawson y col. *Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation*. *Science*, 266: 776-779 (1994)). La primera etapa es la reacción quimioselectiva de un péptido-alfa-tioéster sintético desprotegido con otro segmento peptídico desprotegido que contiene un resto de cisteína amino-terminal para proporcionar un intermedio unido a tioéster como el producto covalente inicial. Sin cambios en las condiciones de reacción, este intermedio experimenta una reacción intramolecular rápida, espontánea para formar un péptido natural unido al sitio de ligamiento. La aplicación de este procedimiento de ligamiento químico natural a la síntesis total de una molécula de proteína se ilustra mediante la preparación de interleucina 8 (IL-8) humana (Baggiolini y col. (1992) *FEBS Lett.* 307: 97-101; Clark-Lewis y col., *J. Biol. Chem.*, 269: 16075 (1994); Clark-Lewis y col., *Biochemistry*, 30: 3128 (1991); Rajarathnam y col., *Biochemistry* 33: 6623-30 (1994)).

Como alternativa, los segmentos peptídicos desprotegidos se unen químicamente donde el enlace formado entre los segmentos peptídicos como resultado del ligamiento químico es un enlace no natural (no peptídico) (Schnolzer, M y col. *Science*, 256: 221 (1992)). Esta técnica se ha usado para sintetizar análogos de dominios de proteínas así como grandes cantidades de proteínas relativamente puras con actividad biológica completa (deLisle Milton y col., *Techniques in Protein Chemistry IV*. Academic Press, Nueva York, págs. 257-267 (1992)).

Se proporcionan fragmentos de anticuerpos que poseen bioactividad. Los fragmentos polipeptídicos de la presente invención pueden ser proteínas recombinantes obtenidas por clonación de ácidos nucleicos que codifican el polipéptido en un sistema de expresión capaz de producir dos fragmentos polipeptídicos 40 de los mismos, tal como un sistema de expresión basado en adenovirus o en baculovirus. Por ejemplo, el dominio activo de un anticuerpo puede determinarse a partir de un hibridoma específico que puede producir un efecto biológico asociado con la interacción del anticuerpo con IL-13, o un fragmento de la misma (p. ej., IL13RBM), o el receptor soluble de IL-13 (p. ej., IL-13R $\alpha$ , o IL-13R $\alpha$ 2) o un fragmento del mismo. Por ejemplo, pueden delecionarse aminoácidos encontrados que no contribuyen ni a la actividad ni a la especificidad de unión o afinidad del anticuerpo sin perder la actividad respectiva. Por ejemplo, en diversas realizaciones, los aminoácidos amino o carboxilo terminales se eliminan secuencialmente de la molécula que no es de inmunoglobulina original o modificada o de la molécula de inmunoglobulina y la actividad respectiva se ensaya en uno de los muchos ensayos disponibles. En otro ejemplo, un fragmento de un anticuerpo comprende anticuerpo modificado en el que al menos un aminoácido se ha sustituido por el aminoácido de origen natural en una posición específica, y una parte de cualquiera de los aminoácidos amino terminal o carboxilo terminal o incluso una región interna del anticuerpo, se ha reemplazado por un fragmento polipeptídico u otro resto, tal como biotina, que puede facilitarse en la purificación del anticuerpo modificado. Por ejemplo, un anticuerpo modificado puede fusionarse a una proteína de unión a maltosa, mediante cualquier química peptídica o clonando los ácidos nucleicos respectivos que codifican los dos fragmentos polipeptídicos en un vector de expresión de manera que la expresión de la región codificante de cómo resultado un polipéptido híbrido. El polipéptido híbrido puede purificarse por afinidad pasándole sobre una columna de afinidad de amilosa y después el receptor del anticuerpo modificado puede separarse de la región de unión a maltosa por escisión del polipéptido híbrido con el factor Xa específico de proteasa. (Véase, por ejemplo, *New England Biolabs Product Catalog*, 1996, pág. 164.). También se encuentran disponibles procedimientos de purificación similares para el aislamiento de proteínas híbridas de células eucariotas.

Los fragmentos, unidos o no a otras secuencias, incluyen inserciones, delecciones, sustituciones, u otras modificaciones de regiones particulares seleccionadas o restos aminoácidos específicos, siempre que la actividad del fragmento no esté significativamente modificada o afectada en comparación con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo no modificado. Estas modificaciones pueden proporcionar alguna propiedad adicional, tal como eliminar o añadir aminoácidos capaces de formar enlaces disulfuro, para aumentar su biolongsitud, modificar sus características secretoras, etc. En cualquier caso, el fragmento debe poseer una propiedad bioactiva, tal como

actividad de unión, regulación de unión en el dominio de unión. Las regiones funcionales o activas del anticuerpo pueden identificarse por mutagénesis de una región específica de la proteína, seguido por la expresión y ensayo del polipéptido expresado. Dichos procedimientos son fácilmente evidentes para un profesional experto en la técnica y puede incluir mutagénesis específica de sitio del ácido nucleico que codifica el antígeno. (Zoller y col. Nucl. Acids Res. 10: 6487-500 (1982).

Para seleccionar anticuerpos que se unan selectivamente a una proteína, variante o fragmento particular pueden usarse diversos formatos de inmunoensayo. Por ejemplo, de manera rutinaria, para seleccionar anticuerpos que 10 inmunorreaccionan selectivamente con una proteína, variante de proteína o sus fragmentos se usan inmunoensayos ELISA en fase sólida. Véase Harlow y Lane. (Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, (1958)), para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo que podrían usarse para determinar la unión selectiva. La afinidad de unión de un anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, por análisis Scatchard de Munson y col., (Anal. Biochem., 107: 220 (1980).

También se proporciona un kit con reactivos para anticuerpos que comprende envases del anticuerpo monoclonal o fragmentos del mismo de la invención y uno o más reactivos para detectar la unión del anticuerpo o fragmento del mismo a IL-13 o a un fragmento de la misma (p. ej., IL13RBM), o al receptor soluble de IL-13 (p. ej., IL-13R $\alpha$ , or IL-13R $\alpha$ 2) o a un fragmento del mismo. Los reactivos pueden incluir, por ejemplo, marcadores fluorescentes, marcadores enzimáticos u otros marcadores. Los reactivos también pueden incluir anticuerpos secundarios o terciarios o reactivos para reacciones enzimáticas en las 20 que las reacciones enzimáticas producen un producto que puede visualizarse.

#### 20 **Procedimientos de exploración/producto por proceso**

La sustancia para usar como se describe en el presente documento puede comprender una molécula capaz de bloquear la unión de IL-13 al receptor de IL-13 en las células NKT, en el que la molécula se produce mediante el procedimiento de 1) poner en contacto las células NKT que expresan el receptor de IL-13 con la molécula, 2) someter a ensayo la célula para determinar la capacidad de la IL-3 para unirse a las células MNT en contacto con la molécula y 3) producir la molécula. En el presente documento también se proporciona una molécula producida mediante este procedimiento.

También se describe un procedimiento para explorar una sustancia capaz de bloquear la la unión de IL-13 al receptor de IL-13 en las células NKT, que comprende: a) poner en contacto las células NKT que expresan el receptor de IL-13 con una molécula candidato, 2) someter a ensayo la célula para determinar la capacidad de la IL-3 endógena para unirse a las células MNT en contacto con la molécula.

La capacidad de la IL-3 endógena para unirse a los receptores de IL-13 las células NKT in Vitro se puede evaluar usando procedimientos estándar en la técnica, tales como, por ejemplo, usando análisis de citometría de flujo con dos canales para identificar las células portadoras de los marcadores de células NKT (p. ej., CD161) y la IL-13 unida a los receptores de IL-13, usando anticuerpos conjugados con los fluorocromos adecuados.

También se describe un procedimiento para explorar una sustancia capaz de bloquear la unión de IL-13 al receptor de IL-13 en las células NKT, que comprende: a) administrar la sustancia a un animal que tiene EII; y b) someter a ensayo al animal para detectar un efecto sobre la capacidad de la IL-13 para unirse a las células NKT que tiene como resultado la reducción de la respuesta inflamatoria de la colitis.

También se describe un procedimiento para explorar una sustancia capaz de tratar la EII (p. ej., colitis o enfermedad de Crohn), que comprende a) administrar la sustancia a un animal que tiene EII (p. ej., colitis o enfermedad de Crohn); b) someter a ensayo al animal para detectar una reducción de los niveles de células NKT o una reducción en unión de la IL-13 a las células NKT, una reducción de cualquiera de estos parámetros que indican que la sustancia es capaz de tratar la EII.

La capacidad de una sustancia para reducir el efecto inductor de inflamación de la IL-13 se puede determinar evaluando las manifestaciones histológicas y clínicas, como se expone en el presente documento, del animal con colitis antes y después de la administración de la sustancia de interés y cuantificando la cantidad de reducción de la inflamación. Un experto en la técnica también puede cuantificar el número células NK-T por procedimientos convencionales en la técnica y los descritos en la presente memoria para determinar si la sustancia reduce el número de células NK-T naturales, como se determina en células de la lámina propia o PBM. Estos procedimientos incluyen, entre otros, ELISA, PCR, FACS, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa y ELISPOT, transferencias de Northern, transferencias de Southern y transferencias de Western.

El animal en el que se produce la colitis puede ser cualquier mamífero, tal como un ser humano, y puede incluir, entre otros, ratones, ratas, cobayas, hámster, conejos, gatos, perros, cabras, monos y chimpancés. La colitis puede producirse en el animal mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, la colitis puede producirse introduciendo en el colon del animal una cantidad eficaz de un reactivo hapteno. Como ejemplo, el reactivo hapteno puede ser ácido trinitrotolueno sulfónico (TNBS) u oxazolona (4-ethoximetilen-2-fenil-2-oxazolin-5-ona).



La colitis mediada por Th1 puede inducirse en ratones usando TNBS. La colitis aguda inducida por TNBS se puede inducir en ratones SJL o C57BL10 usando una dosis única de TNBS. Brevemente, se administran 2,5 mg de TNBSO (pH 1,5 - 2,0; Sigma Aldrich, St Louis, MO) en un 50 % de etanol por vía intrarectal en un volumen total de 150  $\mu$ l a ratones ligeramente anestesiados. Par establecer un modelo crónico de colitis inducida por TNBS se administra a ratones Balb/c dosis semanales de TNBS por vía rectal del siguiente modo. Se administra a los ratones 1,5 mg de TNBS (liberados en un vehículo del 50 % en etanol en un volumen total de 150  $\mu$ l) durante las semanas 1-2, 2,0 mg de TNBS durante las semanas 3-4 y 2.5 mg de TNBS durante las semanas 5-6.

La colitis mediada por Th2 puede inducirse con oxazolona en ratones. Brevemente, los ratones se presensibilizan mediante pintura en la piel con ,2 ml de oxazolona al 3 % en un 100 % de etanol; 5 days después de la presensibilización se expone a los ratones por vía intrarrectal oxazolona a 150 ml de oxazolona al 1 % en un 50 % de etanol con anestesia general con isofluraon (Baxter, Deerfield, IL).

### Tratamiento de la EII

En el presente documento se proporcionan medios para tratar o prevenir la enfermedad intestinal inflamatoria (EII) en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéutica de una sustancia que modula la actividad de IL-13. La EII incluye colitis ulcerosa (CU) y enfermedad de Crohn (EC). El hecho de que la EC y la CU difieren entre sí tanto clínica como patológicamente sugiere dos procesos inmunitarios diferentes en las dos enfermedades. En concreto, la EC está marcada por un proceso inflamatorio granulomatoso transmural que normalmente se asocia con respuestas inmunitarias Th1; mientras que la CU es una enfermedad más superficial en la que el daño epitelial es un factor predominante y normalmente hay autoanticuerpos que son, generalmente, marcadores de respuestas Th2 (Podolsky DK. (2002) N. Engl. J. Med. 347:417-429). Estas diferencias también se ven en estudios de los perfiles inmunitarios en la EC y la CU que muestran que la EX está asociada con una respuesta predominante de IFN- $\gamma$  dirigida a IL-2, una característica de la inflamación Th1, mientras que en la CU este tipo de respuesta no está presente y parece que la inflamación está dirigida por una respuesta de IL-13 de Th2.

A pesar de la respuesta Th1 predominante en la EC, en el presente documento se muestra que las células T CD+ activadas en la lámina propia procedentes de pacientes con EC producen un incremento de las cantidades de la IL-13, aunque el incremento es bastante modesto en comparación con el observado con las células de pacientes con CU. Además, las células que producen IL-13 en la EC son células T CD4+ (es decir, células T convencionales), mientras que las células que producen IL-13 en la CU son células NKT. Esto último viene indicado por el hecho de que producen IL-13 en respuesta a la estimulación por las células presentadoras de antígenos portadoras de CD1d, una característica definitoria de las células NK (Fuss y col., 2004. J.Clin. Invest. 113:1490-7).

En un modelo crónico de colitis inducida por TNBS (es decir, un modelo de EC), en el que se administra TNBS por vía rectal a ratones BALB/c todas las semanas durante 6-8 semanas, los ratones desarrollan una inflamación intestinal crónica marcada por eritema colónico y dilatación a nivel macroscópico e infiltración celular transmural de la lámina propia a nivel microscópico; no obstante, la inflamación tiene menos intensidad que la observada en el modelo agudo de colitis inducida por TNBS y, en consecuencia, los ratones no exhiben una pérdida de peso progresiva y sobreviven durante largos periodos de tiempo. Al principio durante la evolución de esta colitis, las células de la lámina propia de los ratones producen grandes cantidades de IFN- $\gamma$ , lo que indica la presencia de una inflamación mediada por células T Th1 similar a la de la colitis aguda inducida por TNBS y EC. No obstante, aproximadamente 3-4 semanas tras el inicio de la administración de TNBS, las células colónicas comienzan a producir IL-23 y, de forma concomitante, comienzan a producir menos IFN- $\gamma$  y más IL-17. Estas citocinas se encuentran en los estados más crónicos de las inflamaciones Th1. Después, 4-5 semanas después del inicio de la administración de TNBS, las células colónicas comienzan a producir IL-13 y, una semana después, TGF- $\beta$ . En este punto se comienza a ver la aparición de fibrosis en las lesiones colónicas. No obstante, si se administra a los ratones IL-13R $\alpha$ 2-Fc, una sustancia que bloquea la unión de IL-13 a su receptor, los ratones no producen TGF- $\beta$  y no desarrollan fibrosis.

El modelo de colitis muestra que la IL-13 no está estrictamente asociada con la inflamación mediada por células T Th2 y se puede producir junto con una inflamación mediada por células T Th1. Además, muestra que la IL-13, a través de la inducción de TGF $\beta$ , induce fibrosis. Además, la producción de IL-13 por las células de pacientes con EC está implicada en la fibrosis que se produce en esta enfermedad.

El medio proporcionado se puede usar para tratar o prevenir la EC o la CU. Por tanto, se proporcionan medios para tratar o prevenir la enfermedad de Crohn en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéutica de una sustancia que modula la actividad de IL-13. En un aspecto, el procedimiento divulgado puede invertir o prevenir el desarrollo de fibrosis en estos sujetos. Por tanto, se proporcionan medios para tratar o prevenir la enfermedad de Crohn en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéutica de una sustancia que modula la actividad de IL-13. La sustancia que modula la actividad de la IL-13 puede ser cualquier de las sustancias divulgadas que bloquean la unión de IL-13 a los receptores de la IL-13 en las células NKT. Por tanto, la sustancia del presente procedimiento puede ser una IL-13 modificada, como una IL-13 mutante o una IL-13 quimérica. Por tanto, en el presente documento se describe un procedimiento de tratamiento o prevención de la colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéutica de una IL-13 mutante. Además, se describe un procedimiento de tratar o prevenir la colitis ulcerosa en

un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéutica de una molécula de unión al receptor de la IL-13 (IL13RBM) unida a una molécula efectora. La molécula efectora puede ser cualquier molécula efectora descrita en el presente documento.

#### Administración del efector a NKT

- 5 En el presente documento se divulga la expresión de receptores de IL-13 en células NKT en el intestino de colitis ulcerosa. Por tanto, se proporciona un procedimiento *ex vivo* para proporcionar específicamente una molécula efectora a una célula NKT, que comprende unir la molécula efectora a una molécula de unión al receptor de IL-13 (IL13RBM) y proporcionar a la célula una cantidad eficaz de la molécula efectora unida a IL13RBM.

10 La expresión “proporcionar específicamente”, como se usa en el presente documento, se refiere a la asociación preferencial de una molécula con una célula o tejido portadora de una molécula diana o marcador concreta y no con células o tejidos que carecen de dicha molécula diana. Por supuesto, se reconoce que se puede producir cierto grado de interacción inespecífica entre una molécula y una célula o tejido no diana. No obstante, la liberación específica se puede distinguir como mediada por un reconocimiento específico de la molécula diana. Normalmente, la liberación específica tiene como resultado una asociación mucho más fuerte entre la molécula liberada y las células portadoras de la molécula diana que entre la molécula liberada y las células que carecen de la molécula diana.

15 El IL13RBM puede ser una IL-13 nativa o modificada, tal como, por ejemplo, IL-13 humana, IL-13 humana mutante o un fragmento de las mismas, o la IL13RBM puede ser un receptor soluble de IL-13 (p. ej., TL-13R $\alpha$ , o IL-13R $\alpha$ 2) o un fragmento de los mismos. La molécula se puede conjugar con IL13RBM o la molécula efectora unida a IL13RBM puede ser una proteína de fusión. La molécula efectora puede potenciar o inhibir la actividad de la célula NKT. La molécula efectora puede ser cualquier molécula efectora divulgada en el presente documento. EN un aspecto, la molécula efectora se selecciona es una citotoxina, un marcador, un radionúclidos, un fármaco, un liposoma o un anticuerpo. Por ejemplo, la molécula efectora pueden ser las exotoxinas de *Pseudomonas* PE35, PE38, PE38KDEL, PE40, PE4E o PE38QQR.

#### 25 Administración

Las sustancias proporcionadas en el presente documento se pueden administrar de diversos modos dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico y del área que se va a tratar. Las sustancias divulgadas se pueden administrar, por ejemplo, por vía subcutánea, intravenosa, mucosa, inhalación, intranasal, intrarectal, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intracavital o transdérmica.

30 Para la administración parenteral, las preparaciones incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, todas incluyendo medios salinos y tamponados. Vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, cloruro sódico y dextrosa, Ringer lactato o aceites fijos. Vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y de nutrientes y reponedores de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes.

40 Para la administración tópica, las formulaciones pueden incluir pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizaciones, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables transportadores farmacéuticos convencionales, acuosos, polvo o bases oleosas y espesantes.

Las composiciones para administración oral incluyen, polvos o gránulos, suspensiones o soluciones en agua o medio no acuoso, cápsulas, sellos o comprimidos. Puede ser deseable usar espesantes, agentes aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, auxiliares de dispersión o aglutinantes.

45 Algunas de las composiciones pueden administrarse potencialmente como una sal de adición de ácidos o bases farmacéuticamente aceptable, formada por reacción con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido tiocianico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico, y ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico y ácido fumárico o por reacción con una base inorgánica tal como hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio y bases orgánicas tales como mono-, di-, trialkil y aril aminas y etanolaminas sustituidas.

#### Dosis

55 Las sustancias proporcionadas en el presente documento se pueden administrar a cantidades o concentraciones eficaces. Una concentración o cantidad eficaz de una sustancia es una que da como resultado el tratamiento o prevención de la respuesta inflamatoria de la EII. Las dosificaciones y los programas para la administración de la sustancia proporcionada pueden determinarse empíricamente y la realización de dichas determinaciones se incluye en la experiencia de la materia. Los expertos en la materia comprenderán que la dosificación de las sustancias

proporcionadas que deben administrarse variará dependiendo de, por ejemplo, el sujeto que recibirá la sustancia, de la vía de administración, del tipo particular de sustancia usada y de otros fármacos que se administren. Un experto en la técnica puede usar ensayos in Vitro para optimizar la dosificación in vivo de una sustancia concreta, incluyendo la concentración y el curso temporal de la administración.

5 Los intervalos de dosis para la administración de las sustancias son aquéllos bastante largos para producir el efecto deseado en el que se afecta a los síntomas del trastorno. La dosis no debería ser tan larga que produzca efectos secundarios adversos, tales como reacciones cruzadas indeseadas y reacciones anafilácticas. Generalmente, la dosificación variará con la edad, la afección, el sexo y el grado de la enfermedad en el paciente y puede determinarla un experto en la técnica. En caso de cualquier contraindicación, el médico de cada paciente individual  
10 puede ajustar la dosificación. La dosificación puede variar y puede administrarse en una o más administraciones de dosis diarias, durante uno o varios días.

Por ejemplo, la orientación en cuanto a la dosis de selección apropiada cuando la sustancia es un anticuerpo se encuentra en la bibliografía sobre usos terapéuticos de los anticuerpos, por ejemplo, Handbook of Monoclonal Antibodies, Ferrone y col., eds., Noyes Publications, Park Ridge, N. J., (1985) cap. 22 y págs. 303-357; Smith et al.,  
15 Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Haber et al., eds., Raven Press, New York (1977) pág. 365-389.

Una dosis diaria típica de la sustancia proporcionada podría variar de aproximadamente 1 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal, o más, al día, en función de los factores mencionados anteriormente. En un aspecto, el tratamiento puede consistir en una única dosis diaria de 1 mg a 20 mg/kg de peso corporal de una sustancia proporcionada en el presente documento. En otro aspecto, la sustancia se perfunde durante un periodo de 10 minutos a 48 horas. Como  
20 otro ejemplo, los receptores solubles y los anticuerpos proporcionados en el presente documento se pueden administrar a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 mg/kg. Como otro ejemplo, la IL-13 modificada que comprende citotoxinas se puede administrar a 1, 10, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, o 1000 mg/kg. Como otro ejemplo, la IL-13 mutante mutant IL13 se puede administrar a de 1 a 10 mg/kg.

Durante el periodo de infusión de dos horas, la presión sanguínea, el pulso y la temperatura de los sujetos pueden controlarse antes y a intervalos de 30 minutos. Los sujetos pueden proporcionar una evaluación de laboratorio consistente en un hemograma completo (CBC) con fórmula diferencial, recuento plaquetario, perfil químico SMA-18, velocidad de sedimentación globular (VSG) y ensayo de proteína C reactiva en 1) el momento de la infusión; 2) 24 horas después de la infusión; 3) 72 horas después de la infusión; 4) dos semanas después de la última infusión; 5) cuatro semanas después de la última infusión; (6) seis semanas después de la última infusión y 7) ocho semanas  
25 después de la última infusión.

Los sujetos también pueden someterse a colonoscopia rutinaria con video-supervisión en el momento de la infusión de una sustancia proporcionada en el presente documento a las dos, cuatro, seis y ocho semanas después de la última infusión. Adicionalmente, las muestras de suero procedente de los sujetos pueden ensayarse por ELISA para determinar los niveles de actividad de IL-13 y/o de actividad de las células NKT para controlar la eficacia del fármaco. Del mismo modo, pueden cultivarse muestras de biopsia de tejidos obtenidas durante la colonoscopia para purificar y aislar células de la lámina propia y someterlas a ensayo también. Los PBM purificados también pueden aislarse, cultivarse y someterse a ensayo.  
30

Por ejemplo, para evaluar la eficacia del tratamiento en seres humanos con un trastorno caracterizado por colitis, tal como, por ejemplo, colitis ulcerosa, con una sustancia que module la actividad de IL-13, pueden realizarse los siguientes estudios. Para el control del trastorno pueden seleccionarse pacientes con inflamación activa del colon y/o del íleon terminal cuya terapia médica convencional ha fracasado, que puede incluir prednisona y/u otros inmunomoduladores conocidos en la técnica (por vía parenteral u oral). La eficacia del fármaco puede controlarse mediante colonoscopia. Los pacientes pueden asignarse al azar para dos protocolos diferentes. En un protocolo, los sujetos pueden continuar con la medicación inicial y en el segundo protocolo, los sujetos pueden reducir de forma gradual su medicación después de recibir la sustancia que modula la actividad de IL-13.  
35

Después de la administración de una sustancia para el tratamiento, inhibición o prevención de la EII, la eficacia de la sustancia terapéutica puede evaluarse de diversas maneras bien conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, un experto habitual en la materia comprenderá que una sustancia de la invención es eficaz en el tratamiento o inhibición de la inflamación de una EII establecida en un sujeto observando que la sustancia reduce la inflamación o impide un aumento adicional de la inflamación. La inflamación puede medirse por procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, usando biopsias de tejidos para evaluar el daño tisular o ensayos con anticuerpos para detectar la presencia de citocinas inflamatorias en una muestra (por ejemplo, fluidos corporales, pero sin limitación, sangre) procedente de un sujeto o paciente, o midiendo los niveles de citocina en el paciente. La eficacia del tratamiento también puede determinarse midiendo el número de células NKT en el sujeto (por ejemplo en el colon o en sangre periférica) con inflamación por EII. Un tratamiento que inhiba un aumento inicial o posterior de células NKT o niveles de IL-13 en un sujeto o paciente con inflamación de una EII establecida o que de cómo resultado una disminución en el número de células NKT o niveles de IL-13 en un sujeto o paciente con inflamación de una colitis establecida es un tratamiento eficaz.  
40  
45  
50  
55

Las sustancias proporcionadas en el presente documento pueden administrarse profilácticamente a pacientes o a sujetos que están en riesgo de padecer enfermedad intestinal inflamatoria o a los que se les acaba de diagnosticar  
60

enfermedad intestinal inflamatoria. En sujetos a los que se acaba de diagnosticar EII pero que aún no presentan una colitis establecida o la respuesta inflamatoria de una colitis establecida (medida por biopsia u otros ensayos para detectar la inflamación debida a colitis) en sangre u otro fluido corporal, el tratamiento eficaz con una sustancia proporcionada en el presente documento inhibe parcial o completamente la aparición de los síntomas de EII y/o el inicio de CU o de EC.

### Coadministración

También se describen procedimientos el tratamiento o prevención de la respuesta inflamatoria de la EII mediante la coadministración cualquiera de las sustancias proporcionadas en el presente documento con otro agente terapéutico. Otros agentes terapéuticos pueden incluir, entre otros, anticuerpos, como anticuerpos anti-IL4, citocinas o agentes inmunomoduladores.

Ejemplos de estas citocinas, anticuerpos y agentes inmunomoduladores que pueden emplearse en los procedimientos de la presente invención incluyen, entre otros, azatioprina, 6-mercaptopurina, metotrexato, IVIG, antisuero contra antígenos de membrana de linfocitos (es decir, suero antitimocítico (ATS), globulina antitimocítica (ATG), suero antilinfocítico (ALS), globulina antilinfocítica (ALG), anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8), anti-TNF $\alpha$ , anti-IFN $\gamma$ , oligonucleótidos STAT4 antisentido, anti-ICAM1, oligonucleótidos ICAM-1 antisentido, anti-CD40L, anti-CD25 (anti-marcador) e IL-10. De acuerdo con los procedimientos proporcionados en el presente documento pueden administrarse otras citocinas, anticuerpos y/o agentes inmunomoduladores para tratar un episodio agudo de enfermedad o para mantener el estado del sujeto en un estado no inflamatorio.

### Estrategias para la administración de ácidos nucleicos

Las sustancias proporcionadas en el presente documento también pueden administrarse *in vivo* y/o *ex vivo* a pacientes o a sujetos como una preparación de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) que codifique una sustancia, de manera que las células propias del paciente o del sujeto capten el ácido nucleico y produzcan y secreten las sustancias codificadas. Por tanto, la sustancia puede comprender un ácido nucleico aislado que codifica una IL-13 modificada, como se divulga en el presente documento.

Los ácidos nucleicos pueden estar en forma de ADN o ARN desnudo o los ácidos nucleicos pueden estar en un vector para la administración de los ácidos nucleicos a las células, donde el ácido nucleico está bajo la regulación transcripcional de un promotor, como entendería bien un experto habitual en la técnica. Pr tanto, la sustancia puede comprender un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una IL-13 modificada, como se divulga en el presente documento.

El vector puede ser una preparación disponible en el mercado, tal como un vector de adenovirus (Quantum Biotechnologies, Inc. (Laval, Quebec, Canadá). La administración del ácido nucleico o del vector a las células puede realizarse mediante una diversidad de mecanismos. Como ejemplo, la administración se puede realizar mediante un liposoma, usando preparaciones de liposomas disponibles en el mercado, tales como, LIPOFECTIN, LIPOFECTAMINA (GIBCO-BRL, Inc., Gaithersburg, MD), SUPERFECT (Qiagen, Inc. Hilden, Alemania) y TRANSFECTAM (Promega Biotec, Inc., Madison, WI), así como otros liposomas desarrollados de acuerdo con procedimientos convencionales en la técnica. Además, el ácido nucleico o vector proporcionado en el presente documento puede administrarse *in vivo* por electroporación, cuya tecnología está disponible en Genetronics, Inc. (San Diego, CA) así como mediante una máquina de SONOPORACIÓN (ImaRx Pharmaceutical Corp., Tucson, AZ).

Como un ejemplo, la administración del vector puede realizarse mediante un sistema viral, tal como un sistema de vector retroviral que puede integrar un genoma retroviral recombinante (véase, por ejemplo, Pastan y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 4486, 1988; Miller y col., Mol. Cell. Biol. 6: 2895, 1986). Después, el retrovirus recombinante puede usarse para infectar y, por lo tanto, administrar los ácidos nucleicos de células infectadas que codifican, por ejemplo, una IL-13 modiciada. El procedimiento exacto de introducir el ácido nucleico alterado en células de mamífero no está, por supuesto, limitado al uso de vectores retrovirales. Existen otras técnicas ampliamente disponibles para este procedimiento, incluyendo el uso de vectores adenovirales (Mitani y col., Hum. Gene Ther. 5:941-948, 1994), vectores virales adenoasociados (VAA) (Goodman y col., Blood 84: 1492-1500, 1994), vectores lentivirales (Naidini y col., Science 272: 263-267, 1996) y vectores retrovirales pseudotipificados (Agrawal y col., Exper. Hematol, 24: 738-747, 1996). También pueden usarse técnicas de transducción física, tales como administración de liposomas y mecanismos de endocitosis y otros mediados por receptores (véase, por ejemplo, Schwartzberger y col., Blood 87: 472-478, 1996) por nombrar algunos ejemplos. Este procedimiento se puede usar junto con cualquier de estos u otros rocedimientos de transferencia de genes normalmente usados.

Como un ejemplo, si el ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención se administra a las células de un sujeto en un vector de adenovirus, la dosificación para la administración del adenovirus a seres humanos puede variar de aproximadamente  $10^7$  a  $10^9$  unidades formadoras de placas (ufp) por inyección pero puede ser tan elevada como  $10^{12}$  ufp por inyección (Crystal, Hum. Gene Ther. 8:985-1001, 1997; Alvarez y Curiel, Hum. Gene Ther. 8:597-613, 1997). Un sujeto puede recibir una sola inyección o, si fueran necesarias inyecciones adicionales, estas pueden repetirse a intervalos de seis meses (u otros intervalos de tiempo apropiados, según determine el experto médico) durante un periodo indefinido y/o hasta que se haya establecido la eficacia del tratamiento.

La administración parenteral del ácido nucleico o vector proporcionado, si se usa, se caracteriza generalmente por inyección. Se pueden preparar inyectables en formas convencionales, bien como soluciones líquidas o suspensiones, formas sólidas adecuadas para disolución o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Una estrategia revisada más recientemente para la administración parenteral implica el uso de un sistema de liberación lento o sostenido de manera que se mantenga una dosificación constante (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 3.610.795). Como consulta adicional sobre formulaciones adecuadas y diversas vías de administración de compuestos terapéuticos, véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (19th ed.) ed. A.R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA 1995.

#### **Vehículos farmacéuticamente aceptables**

Las sustancias proporcionadas en el presente documento pueden usarse terapéuticamente en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por "farmacéuticamente aceptable" se quiere decir un material que no es indeseable biológicamente, o de otro modo, es decir, el material se puede administrar a un sujeto junto con la sustancia sin producir ningún efecto biológico indeseado o sin interactuar de un modo perjudicial con cualquiera de los otros componentes de una composición farmacéutica en la que está contenido. El vehículo se seleccionaría naturalmente para minimizar cualquier degradación del principio activo y para minimizar cualquier efecto secundario adverso en el sujeto, y sería bien conocido por un experto en la materia.

Los expertos en la materia conocen bien vehículos farmacéuticos. Estos serían más normalmente vehículos convencionales para la administración de fármacos a seres humanos, incluyendo soluciones tales como agua estéril, solución salina y soluciones tamponadas a pH fisiológico. Las composiciones pueden administrarse por vía intramuscular o por vía subcutánea. Otros compuestos se administrarán de acuerdo con procedimientos convencionales usados por los expertos en la materia.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir vehículos, espesantes, diluyentes, tampones, conservantes, agentes de superficie activa y similares, además de la molécula de elección. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir uno o más principios activos, tales como agentes antimicrobianos, agentes antiinflamatorios y anestésicos.

Los vehículos adecuados y sus formulaciones se describen en Remington: The Science and Practice of Pharmacy ((19th ed.) ed. A.R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA 1995). Normalmente, en la formulación se usa una cantidad adecuada de una sal farmacéuticamente aceptable para hacer que la formulación sea isotónica. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otros, solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. El pH de la solución es, preferentemente, de 5 a 8 y, más preferentemente, de 7 a 7,5. Otros vehículos incluyen preparaciones de liberación sostenida, como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, en las que las matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo películas, liposomas o microcápsulas. Será evidente para los expertos en la técnica que ciertos vehículos pueden ser más preferibles según, por ejemplo, la vía de administración y la concentración de sustancia que se esté administrando.

#### **Composiciones identificadas por exploración con composiciones divulgadas / química combinatoria /diseño farmacológico asistido por ordenador**

Las composiciones divulgadas, tales como IL-13 o fragmentos de la misma (p. ej., IL13RBM), o el receptor soluble de IL-13 (p. ej., IL-13R $\alpha$ , or IL-13R $\alpha$ 2) o un fragmento del mismo, pueden usarse como dianas para cualquier técnica de modelado molecular para identificar la estructura de las composiciones divulgadas o para identificar moléculas posibles o reales, tales como moléculas pequeñas, que interactúan de un modo deseado con las composiciones divulgadas.

Se entiende que cuando las composiciones divulgadas se usan en técnicas de modelado, se identificarán moléculas, tales como moléculas macromoleculares que tengan propiedades particulares deseadas tales como inhibición o estimulación de la función de la molécula diana. También se divulgan las moléculas identificadas y aisladas cuando se usan las composiciones divulgadas, tales como IL-13, o fragmentos de la misma, el receptor soluble de IL-13 (p. ej., IL-13R $\alpha$ , or IL-13R $\alpha$ 2) o un fragmento del mismo. Por lo tanto, los productos producidos usando las estrategias de modelado molecular que implican las composiciones divulgadas, tales como, IL-13 o un fragmento de la misma (p. ej., IL13RBM), o el receptor soluble de IL-13 (p. ej., IL-13R $\alpha$ , or IL-13R $\alpha$ 2) o un fragmento del mismo también se consideran divulgados en el presente documento.

Por lo tanto, un modo para aislar moléculas que se unan a una molécula de elección es mediante diseño lógico. Esto se consigue mediante información estructural y modelado por ordenador. La tecnología de modelado por ordenador permite la visualización de la estructura atómica tridimensional de una molécula seleccionada y el diseño lógico de nuevos compuestos que interactuarán con la molécula. La construcción tridimensional depende normalmente de datos procedentes de análisis de cristalografía de rayos x o formación de imágenes por RMN de la molécula seleccionada. La dinámica molecular requiere datos de campo de fuerza. Los sistemas gráficos por ordenador permiten predecir como se unirá un nuevo compuesto a la molécula diana y permiten la manipulación experimental de las estructuras del compuesto y de la molécula diana para determinar una perfecta especificidad de unión. La predicción de lo que será la interacción compuesto - molécula cuando se produzcan pequeños cambios en uno o

ambos requiere programación informática de mecánica molecular y ordenadores informáticamente intensivos, normalmente acoplados con interfaces por menús, de fácil manejo entre el programa de diseño molecular y el usuario.

5 Son ejemplos de sistemas de modelado molecular los programas CHARMM y QUANTA, Polygen Corporation, Waltham, MA. CHARMM realiza la minimización de energía y funciones de dinámica molecular. QUANTA realiza la construcción, modelado gráfico y análisis de la estructura molecular. QUANTA permite la construcción, modificación, visualización y análisis interactivos del comportamiento de las moléculas entre sí.

10 Diversos artículos revisan el modelado por ordenador de fármacos interactivos con proteínas específicas, tales como Rotivinen, y col., 1988 Acta Pharmaceutica Fennica 97, 159-166; Ripka, New Scientist 54-57 (16 de junio, 1988); McKinaly y Rossmann, 1989 Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29, 111-122; Perry and Davies, QSAR: Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design pp. 189-193 (Alan R Liss, Inc. 1989); Lewis y Dean, 1989 Proc. R. Soc. Lond. 236, 125-140 y 141-162; y con respecto a una enzima modelo para componentes de ácido nucleico, Askew, y col., 1989 J. Am. Chem. Soc. 111, 1082-1090. Se encuentran disponibles otros programas por ordenador que exploran y representan gráficamente productos químicos de compañías tales como BioDesign, Inc., Pasadena, CA., Allelix, Inc, Mississauga, Ontario, Canadá, y Hypercube, Inc., Cambridge, Ontario. Aunque estos se diseñan principalmente para la aplicación hacia fármacos específicos para proteínas particulares, estos pueden adaptarse para el diseño de moléculas que interaccionan específicamente con regiones de ADN o ARN específicas, una vez que se identifica esta región.

### Composiciones con funciones similares

20 entiende que las composiciones descritas en el presente documento tienen determinadas funciones, tales como la unión a IL-13R $\alpha$  o IL13R $\alpha$ 2. En el presente documento se divulgan determinados requisitos estructurales para la realización de las funciones divulgadas y se entiende que existe una diversidad de estructuras que pueden realizar la misma función las cuales están relacionadas con las estructuras divulgadas y que estas estructuras conseguirán finalmente el mismo resultado, por ejemplo inhibición de la unión de IL-13 a células NKT o la liberación de una molécula efectora a una célula NKT.

Los ejemplos siguientes se exponen para proporcionar a los expertos habituales en la técnica una divulgación y descripción completa de cómo se elaboran los compuestos y las composiciones reivindicadas en el presente documento. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, la temperatura está en °C o es a temperatura ambiente y la presión es la atmosférica o cercana a ella.

### 30 EJEMPLOS

#### Ejemplo 1: Células NKT en la EII

Se usó un modelo de ratón de colitis inducida con oxazolona para estudiar la producción de citocinas Th2. En el modelo de colitis inducida con oxazolona para Th2, la colitis se indujo por la administración intrarrectal del agente hapténico oxazolona en un vehículo de etanol. En esta colitis, los efectos tóxicos iniciales del agente de inducción conducen a la inundación de la lámina propia con antígenos antibacterianos y, por tanto, a la inducción de una respuesta inmunitaria que conduce a posterior inflamación. La producción de citocinas Th2 conduce a esto último ya que la inflamación se caracteriza por un aumento de la secreción de IL-4 e IL-5 y la inflamación puede mejorarse por la administración de anti-IL-4 (Boirivant y col., 1998).

40 La colitis inducida con oxazolona está mediada por células NKT que pueden producir grandes cantidades de citocinas Th2 cuando son estimuladas por anti-CD3 o  $\alpha$ GalCer. Inicialmente, esto consiste en la secreción de IL-4, que rápidamente reemplaza la secreción de IL-13. Esta respuesta de IL-13 se origina a partir de las células NK-T que responden a la presentación a antígenos mediada por CD1 y parece ser un componente clave de la inflamación, ya que la neutralización de IL-13 impide el desarrollo de colitis inducida con oxazolona. Dado el parecido de la colitis inducida con oxazolona en ratones con la colitis ulcerosa en seres humanos, estos datos indican que en seres humanos sería eficaz un tratamiento similar de la enfermedad inflamatoria humana.

Se obtuvieron ratones macho C57B1/10 de un criadero mantenido por el National Cancer Institute (NCI, Bethesda, MD) y se enjalaron en condiciones sin patógenos específicos (SPE). En todos los experimentos se usaron ratones de 5 a 7 semanas de edad. Los ratones KO B6x129Sv CD1 (defectivos en CD1) se recibieron de Exley/Balk (Cui y col., 1997; Smiley y col., 1997), los ratones KO C57B1/6-J $\alpha$ 281 (defectivos en J $\alpha$ 281) fueron una generosa donación del Dr. Taniguchi (Cui y col., 1997) y se criaron en una instalación para animales en el hospital de Brigham and Women, Harvard Medical School, Boston, MA. La oxazolona (4-etoximetilen-2-fenil-2-oxazolona-5-ona) se obtuvo en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

55 Para sensibilizar previamente a los ratones se rasuró un campo de 2x2 cm de la piel abdominal y se aplicaron 200  $\mu$ l de una solución al 3 % (p/v) en etanol al 100 %. Cinco días después de la sensibilización previa, los ratones se volvieron a exponer por vía intrarrectal con 150  $\mu$ l de oxazolona al 1 % en etanol al 50 % o solamente etanol al 50 % (es decir vehículo) con anestesia general con isoflurano (Baxter, Deerfield, IL). La inyección intrarrectal se administró con un catéter umbilical de poliuretano (Sherwood, St. Louis, MO). La neutralización de IL-13 *in vivo* se

realizó con IL-13R2-Fc. Los ratones recibieron 5 x 200 µg de proteína control o de IL-13R2-FcN comenzando el día antes de la sensibilización previa i.v. y después cada dos días i.p. El agotamiento de las células NK1.1+ se consiguió inyectando 250 µg de anticuerpos monoclonales anti-NK1.1 de ratón (clon PK136) i.v. 48 horas antes y después de la sensibilización. Los ratones control recibieron IgG2a de ratón. Los análisis por FACS de esplenocitos de animales tratados mostraron que las células NK así como los células NKT se habían agotado completamente. La presentación a antígenos por moléculas CD1 se bloqueó *in vivo* con anti CD1.1 de ratón (clon 20H2, donación de A. Bendelac). A los ratones se les inyectó 1 mg de anticuerpo cada 2 días.

Cinco días después de la inducción de la colitis se sacrificó a los ratones. Los colonos se extirparon y los segmentos se fijaron en formalina (Fisher, Fair Lawn, NJ). Después de incluir en parafina se cortaron secciones de 5 µm y se tiñeron con Hematoxilina/Eosina (Lerner, New Haven, CT).

Se aislaron esplenocitos (SPC), células de ganglios linfáticos mesentéricos (MLNC) o células de la lámina propia los días 2 o 7 después de la inducción de la colitis. Las células se aislaron como se describe con detalle en Current Protocols of Immunology (Scheiffele, 2002). En resumen, después de eliminar células epiteliales se aislaron las LPMC mediante incubación de tiras de colon en HBSS/ EDTA 2,5 mM. Las células nucleares se proporcionaron mediante digestión de los tejidos en medio ISCOVES suplementado con FCS al 10 %, colagenasa 200 U/ml (Roche, Indianapolis, IN), DNasa 10 µg/ml (Roche) y gentamicina 1 µg/ml (BioWhittaker, Walkersville, MD). Finalmente, se separaron los leucocitos de las células epiteliales mediante centrifugación en un gradiente PERCOLL (Amersham, Piscataway, NJ) de 33 % y 66 %. Las células MLN y los esplenocitos se aislaron triturando el tejido en una placa Petri y filtrando la suspensión de células a través de una malla de 40 µm. Las células esplénicas se trataron con tampón de lisis ACK para la lisis de los glóbulos rojos (Biosource, Camarillo, CA). Inicialmente, las células CD3 se aislaron con columnas de selección de linfocitos T de ratón (R&D, Minneapolis, MN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células CD4 purificadas se seleccionaron positivamente con perlas para CD4 y columnas mini MACS (Miltenyi, Auburn, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se cultivaron en RPM1640 suplementado con FCS al 10 %, HEPES 20 mM, NCTC al 5 %, Glutamina 2mM, Penicilina/Estreptomina 50 µg/ml, Gentamicina 50 µg/ml, 2-mercaptoetanol 50 µM y 50 U de IL-2 U rhu. Para estimular linfocitos con αGalCer, como células presentadoras de antígenos, se usó una línea celular de fibroblasto (L-929) transfectada con CD1 de ratón. Las células L se trataron durante 1,5 h con Mitomicina C y se sembraron a 1x10<sup>5</sup> células/ml. Se añadió α-Galactosil-Ceramida (αGalCer; Kirin, Tokyo, Japón) o vehículo a 100 ng/ml. La concentración de linfocitos era generalmente de 1x10<sup>6</sup> células/ml. Después de 48 horas de cultivo, los sobrenadantes se recogieron y se conservaron a -20 °C hasta análisis posterior. La IL-4 y la IL-5 se midieron con equipos ELISA OptEIA Pharmingen. La IL-13 se midió con un kit Quantikine M ELISA de R&D (Minneapolis, MN).

Las células se tiñeron con anticuerpos contra CD3 (2C11), CD4 (RM4-5), NK1.1 (PK136), Ly49C (5E6), Ly6C (AL-30 21) y DX5 después de la incubación con FcBlock (2.4G2) (todo de BD Pharmingen). La tinción superficial se analizó sobre un escáner de FACS (Becton-Dickinson, Mansfield, MA). Las cifras relativas se calcularon con el software CellQuest después de seleccionar linfocitos vivos en el diagrama de dispersión.

Para obtener una respuesta inflamatoria crónica de más larga duración en el modelo de ratón de colitis inducida con oxazolona, los ratones se presensibilizaron con oxazolona al 3 % mediante pintura en la piel 5 días antes de la exposición rectal y después se les inyectó por vía intrarrectal oxazolona al 1 % para inducir colitis. Como se muestra en la Figura 1A, solamente desarrollan colitis y pérdida de peso progresiva los ratones presensibilizados, mientras que los animales sin tratamiento previo no desarrollaron ninguna inflamación. Además, como se muestran en la Fig. 1B, la colitis inducida en este caso condujo a una debilidad progresiva crónica y a pérdida de peso de manera que después de 7-10 días la mayoría de los animales había perdido un 40 % de su peso corporal inicial y se estaban muriendo. El examen histológico del colon los días 7-10 mostró un edema masivo en la pared intestinal e infiltración por leucocitos. Las capas superficiales de la mucosa mostraron infiltraciones densas con pequeños granulocitos polinucleares y ulceraciones grandes interrumpiendo la capa de eritrocitos que estaba presente. Como se muestra en la Fig. 1D+E, esta fotografía histopatológica es similar a la observada en la colitis ulcerosa en seres humanos, lo que indica que un mecanismo patológico similar contribuye a daño tisular en ambas inflamaciones. Finalmente, como se muestra en la Fig. 2A, células mononucleares aisladas de la lámina propia (LPMC), de ganglios linfáticos mesentéricos (MLNC) o de bazo (SPC) y después estimuladas con anti-CD3/anti-CD28 *in vitro* produjeron grandes cantidades de citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) pero solamente bajos niveles de IFN-γ. Por el contrario, las LPMC aisladas ratones con colitis inducida con TNBS produjeron niveles no detectables de IL-4 e IL-5 y solamente bajos niveles de IL-13, pero cantidades muy altas de TNF-α.

La producción de IL-4 por LPMC aisladas a diferentes momentos durante el transcurso de la colitis inducida con oxazolona disminuyó gradualmente. En cambio, la producción de IL-13 por LPMC (así como MLNC o CM hepáticas) durante el mismo intervalo de tiempo aumentó (Fig. 2B). Este fenómeno se había observado en otros modelos animales mediados por células Th2 (Minty y col., 1997; Urban y col., 1998). Para establecer una función patógena para IL-13 en la colitis inducida con oxazolona, la IL-13 se neutralizó por administración *in vivo* de IL-13R2 fusionada a la parte Fc de la IgG1 humana (IL-13R2-Fc) en el momento de la administración intrarrectal con oxazolona. La cadena α2 del receptor de IL-13 tiene una afinidad 100 veces superior por IL-13 que la cadena α1, pero solamente la última transmite una señal intracelular después del acoplamiento. La proteína de fusión IL-13R2-Fc se une a IL-13 y se ha demostrado que neutraliza la bioactividad de IL-13 *in vivo* (Donaldson y col., 1998). Como se muestra en la Fig. 3, los ratones tratados con IL-13R2-Fc se protegían de la inducción de colitis con oxazolona:

después de una pérdida de peso transitoria inicial similar a la observada solo con etanol, recuperaron su peso corporal inicial el día 3 y el día 5 la histología colónica no podía diferenciarse de la de los ratones a los que se les había proporcionado solo etanol. Asimismo, como se muestra en la Figura 15, los ratones tratados con anticuerpos monoclonales anti-IL13 (500 µg, i.p.) mantuvieron el peso corporal inicial tras la inducción de colitis con oxazolona en comparación con el de los ratones a los que se administró el isotipo de la IgG control.

Como se ha mencionado anteriormente, las células mononucleares aisladas de ratones con colitis inducida con oxazolona producen cantidades aumentadas de IL-13 *in vitro* cuando se estimulan con anti-CD3 y anti-CD28. Sin embargo, cuando estas células mononucleares se purificaron mediante una columna de selección negativa para enriquecer células positivas a CD3, esta estimulación condujo a una producción de IL-13 enormemente disminuida. Dado que la columna de selección contiene perlas de vidrio revestidas con anti-IgG de ratón, esta contiene células que expresan receptores de Fc (CD16 o CD32) y se revisten con inmunoglobulinas; por lo tanto es posible que la producción de IL-13 por LPMCEstimuladas con anti-CD3 en colitis inducida con oxazolona necesite una célula positiva al receptor de Fc. Además de mastocitos y linfocitos B, CD16 expresa células NKT y células NK (Koyasu, 1994) y puede producir IL-13 (Terabe y col., 2000). Para investigar la implicación de cualquiera de los dos últimos tipos de células, los ratones recibieron inyecciones repetidas de anticuerpo anti-NK1.1 monoclonal (PK136) para agotar las células NK1.1 antes de la exposición a oxazolona. Dicho tratamiento agotó todas las células NK y NKT, según se determina por tinción de esplenocitos DX5 y NK1.1. Como se muestra en la Fig 4A+B, se observó que los ratones con estas células agotadas no desarrollaron pérdida de peso ni pruebas macroscópicas/microscópicas de inflamación colónica y no manifestaron producción aumentada de citocina Th2 después de la exposición intrarrectal con oxazolona.

En estudios posteriores para determinar si esta función patogénica para las células positivas a NK1.1 es específica de la colitis inducida con oxazolona, se compararon ratones C57B1/10 con agotamiento de NK1.1 con ratones C57B1/10 no tratados en cuanto a su susceptibilidad con respecto a la colitis inducida con TNBS, un modelo de colitis mediada por Th1 parecido a la enfermedad de Crohn en seres humanos. Como se muestra en la Fig 4C+D, el agotamiento de células NK1.1+ no afecta de manera significativa a la pérdida de peso o mortalidad de ratones con colitis inducida por TNBS y de manera notable, hubo una tendencia a una mayor pérdida de peso en ratones deplecionados. Estos resultados sugieren que las células portadoras de NK1.1 en la mucosa desempeñan, en cualquier caso, una función inhibitoria para la inducción de una inflamación mediada por Th1 en la colitis inducida por TNBS, un efecto previamente observado en otros modelos de inflamaciones intestinales mediadas por Th1 (Saubermann y col., 2000).

Mientras que los estudios anteriores muestran que la colitis con oxazolona está mediada por células positivas a NK1.1 estos no proporcionan información sobre si las últimas células son células NK o NKT, ya que las NK1.1 están presentes en estos dos tipos de células. Para tratar este tema, se examinó si la colitis inducida con oxazolona se veía afectada por el bloqueo de la presentación de antígenos por moléculas CD1 que influye en la activación de células NKT pero no en la activación de células NK. Esto se consiguió mediante la administración de un anticuerpo anti-CD1 monoclonal que se había observado que bloqueaba CD1 *in vivo* sin agotamiento de células NKT y sin afectar la presentación a antígeno por el MHC de clase II (Park y col., 1998). Como se muestra en la Figura 5, la administración de este anticuerpo en el momento de la administración intrarrectal con oxazolona previene el desarrollo de la colitis inducida con oxazolona.

Como se muestra en la Figura 5B, estos resultados se confirmaron con estudios de ratones CD1-KO, en los que se observó que la administración intrarrectal de oxazolona a ratones presensibilizados no desarrolla colitis ni tampoco respuesta colónica Th2. A pesar de la ausencia de células NKT, los ratones CD1-KO habían mostrado que eran completamente capaces de crear respuestas Th2 (Smiley y col., 1997). Por lo tanto, este resultado no puede atribuirse a ningún fallo intrínseco de la desactivación CD1 KO para crear una respuesta Th2.

Finalmente se observó que ratones Jα281 KO eran resistentes a la inducción de colitis con oxazolona (Figura 5B). Aunque la mayoría de las células NKT sin CD1 usan el VVα14Jα281TCR canónico, algunos resultados sugieren la existencia de células NKT con otros TCR. Estas células NKT "atípicas" están presentes en ratones Jα281-KO, pero se ha demostrado que es insuficiente para inducir una respuesta inflamatoria. Considerados en conjunto, los datos de los ratonesKO tratados con anticuerpos muestran que la colitis inducida con oxazolona depende de la inducción de linfocitos T por antígenos restringidos a CD-1 y que los linfocitos T son células NK1.1+Jα281+CD16+CD4+.

En estudios adicionales se determinó si los células NKT se infiltraban o no en la lámina propia de ratones con colitis inducida con oxazolona. Sin embargo, este objetivo se hace difícil por el hecho de que mientras que NK1.1 es un marcador frecuente de células NKT, los linfocitos T con función de células NKT también se han identificado en la población negativa a NK1.1. Además, la mayoría de los marcadores de células NK-T dependen de los niveles de activación celular. Por lo tanto, las células NKT pierden su expresión de NK1.1 después de la activación (Chen y Paul, 1997) y otro marcador de células NK/NKT, Ly49C, está regulado por incremento en células NKT. Además de la activación, las células NKT de diferentes tejidos coexpresan diferentes marcadores sustitutos de la función de células NK junto con el TCR. Teniendo en cuenta estas limitaciones, se observó que durante el transcurso de la colitis inducida con oxazolona el número total de linfocitos se expandía significativamente en la lámina propia (~ 10 veces), hígado 10 (~ 6 veces), ganglios linfáticos mesentéricos (~ 50 veces) y bazo (~ 2 veces). Además, en la lámina propia y en el hígado el número relativo de células NKT se expande en relación con otras poblaciones de



células. Por lo tanto, en la lámina propia de ratones no tratados el 7 % (NK1.1) o el 0,4 % (Ly49C) de los linfocitos T coexpresan un marcador de linfocitos T citotóxicos naturales. Después de la inducción de colitis con oxazolona el 21 % de linfocitos T infiltrados son positivos para NK1.1 y el 34 % son positivos para Ly49C. En el hígado, en el que puede encontrarse el mayor porcentaje de células NKT, la expresión de NK1.1 en células positivas para CD3 aumenta del 9,9 % al 48 % de células, mientras que la expresión de Ly49C es baja. Por razones desconocidas, las células NKT están ausentes de los ganglios linfáticos mesentéricos incluso después de la inducción de la colitis: en este lugar, puede identificarse menos del 1 % de las células como células NKT. Finalmente, en el bazo de ratones no tratados el 3,1 % de las células positivas para CD3 son NK1.1+ y después de la inducción de la colitis con oxazolona el 5,1 % se hacen positivas a NK1.1, mientras que el número de células Ly49C+ aumenta del 0,6 % al 28 %.

Para resumir estos hallazgos, los linfocitos T con marcadores sustitutos de función de células NKT se expanden en la lámina propia, el hígado y el bazo.

Finalmente, para investigar la producción de citocinas de las LPMC y SPC en respuesta al antígeno presentado por CD1, estas células se estimularon con  $\alpha$ GalCer, un glucolípido sintético que se había observado que activaba la mayoría de las líneas de células NKT de una manera dependiente de CD1 (Kawano y col., 1997). Los linfocitos T y las células NK restringidas al MHC de clase II no se ven afectados por  $\alpha$ GalCer; por lo tanto, la estimulación con  $\alpha$ GalCer representa un modo para evaluar la activación de células NKT en mezclas de células no separadas. Como se muestra en la Figura 6, cuando se estimularon con  $\alpha$ GalCer las LPMC o los SPC de ratones, con colitis inducida con oxazolona, estos produjeron grandes cantidades de citocinas Th2, incluyendo cantidades muy elevadas de IL-13. Además, células CD4 positivas aisladas por MACS de LPMC o SPC también respondieron a  $\alpha$ GalCer con una producción muy elevada de IL-13, lo que indica que la mayoría de las células CD4+ en las poblaciones de células de ratones con colitis inducida con oxazolona son células NKT restringidas a CD1

En estudios de comparación de pacientes con enfermedad de Crohn con pacientes con colitis ulcerosa, se observó la producción de IL-13 aumentada en células de la lámina propia de pacientes con colitis ulcerosa en comparación con pacientes con enfermedad de Crohn. Los datos de FACS que comparan los dos grupos también muestran un número aumentado de células NKT en la sangre periférica y en la lámina propia de pacientes con colitis ulcerosa en comparación con pacientes con enfermedad de Crohn.

### Ejemplo 2: Uso de IL-13 modificada para inhibir la colitis ulcerosa

Una subpoblación única de células inflamatorias (células T asesinas naturales o células NKT) producen niveles altos de IL-13 en un modelo de ratón de la enfermedad humana (colitis inducida con oxazolona), así como en pacientes con CU. La IL-13 es necesaria para, o potencia, los efectos tóxicos de las células NKT, incluyendo su capacidad para lisar las células epiteliales de la mucosa.

Como se divulga en el presente documento, la colitis inducida con oxazolona se puede prevenir mediante el tratamiento previo con inhibidores de la IL-13. Estas Observaciones no solo arrojan luz sobre un mecanismo previamente desconocido de esta enfermedad sino que también sugieren la importancia de desarrollar estrategias anti-IL-13 para tratar la CU. En el presente documento se divulga el uso de dos familias de antagonistas de la IL-13 para el tratamiento de la CU. El antagonista de la IL-13 puede ser una IL-13 mutante. Como ejemplo, la IL-13E13K tiene una afinidad mayor por el receptor de la IL-13 que la IL-13 nativa, pero no activa la señalización en el receptor; por tanto, bloquea la función de la IL-13 normal. El antagonista de la IL-13 puede además comprender una IL-13 unida a una molécula efectora. Como ejemplo, la IL-13PE consiste en IL-13 unida a la toxina de *pseudomonas*; por tanto, es capaz de matar células que se unen a la IL-13, incluyendo las células NKT mencionada anteriormente. Por tanto, estas dos familias de moléculas se pueden usar para alterar específicamente los efectos inflamatorios mediados por la IL-13 en la CU.

La Figura 7 muestra un gráfico del peso para los experimentos en relación con el tratamiento de los ratones con colitis inducida con oxazolona tratados con una exotoxina de IL-13 de *pseudomonas* (IL13PE38). En cada grupo se incluyeron 10 ratones. Los grupos consistían en ratones tratados solo con etanol, ratones con colitis inducida con oxazolona, ratones con colitis inducida con oxazolona tratados con IL-13PE38. La colitis se indujo mediante inyección intrarrectal de 6 mg de oxazolona disuelta en 45 % de etanol. Cada ratón recibió 150 ml de esta solución. Los ratones tratados solo con etanol recibieron 150  $\mu$ l de 45 % de etanol. Los ratones que recibieron tratamiento con IL-13PE38 recibieron 5 mg de IL-13PE el día -1 antes de la administración con oxazolona, 5 mg el día 0 y 5 mg el día +1 de la administración de oxazolona. Como se puede ver en las curvas de peso, los ratones tratados con IL-13PE38 mejoraron significativamente en cuanto al peso. El análisis histológico de los colonos también reveló poca o ninguna inflamación el día 3 después de la administración de oxazolona.

Los ratones con colitis inducida con oxazolona tratados con IL-13PE mostraron significativamente menos peso. Además, las células de los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) secretaron marcadamente menos IL-13. Las células MLN ( $10^6$  células) se estimularon con estímulos policlonales con anti-CD3/CD28. Las células MLN de ratones con colitis inducida con oxazolona a los que no se administró IL-13PE38 secretaron 544 pg/ml en respuesta a los estímulos, mientras que las células de ratones con colitis inducida con oxazolona tratados con IL-13PE38 secretaron 7 pg/ml en respuesta a los estímulos.

### Ejemplo 3: IL-13 en colitis inducida por TNBS

Se ha desarrollado un modelo crónico de colitis inducida por TNBS, en el que se administra TNBS por vía rectal a

ratones BALB/c cada semana durante hasta 6-8 semanas. La Figura 8 muestra una curva del peso para ratones durante esta administración. Estos ratones desarrollan una inflamación intestinal crónica marcada por eritema colónico y dilatación a nivel macroscópico e infiltración celular transmural de la lámina propia a nivel microscópico; no obstante, la inflamación tiene menos intensidad que la observada en el modelo agudo de colitis inducida por TNBS y, en consecuencia, los ratones exhiben una pérdida de peso progresiva y sobreviven durante largos periodos de tiempo.

Al principio durante la evolución de esta colitis, las células de la lámina propia de los ratones producen grandes cantidades de IFN- $\gamma$ , lo que indica la presencia de una inflamación mediada por células T Th1 similar a la de la colitis aguda inducida por TNBS y CD (Fig. 10). No obstante, aproximadamente 3-4 semanas tras el inicio de la administración de TNBS, las células colónicas comienzan a producir IL-23 y, de forma concomitante, comienzan a producir menos IFN- $\gamma$  y más IL-17 (Fig. 10). Después, 4-5 semanas después del inicio de la administración de TNBS, las células colónicas comienzan a producir IL-13 y, una semana después, TGF- $\beta$  (Fig. 10). En este punto, se comienza a ver la aparición de fibrosis en las lesiones colónicas. La formación de colágeno, que es un buen indicador de fibrosis, coincide con la aparición de fibrosis (Fig. 9).

No obstante, si se administra a los ratones IL-13R $\alpha$ 2-Fc, una sustancia que bloquea la unión de IL-13 a su receptor, los ratones no producen TGF- $\beta$  (Fig. 12) y no desarrollan fibrosis (Fig. 11).

#### **Ejemplo 4: Expresión de IL-13 por células T circulantes (p. ej., células NKT)**

Como se muestra en la Figura 13 existe un incremento de la expresión de IL-13R $\alpha$ 2 en células intestinales de ratones en las últimas etapas del proceso de enfermedad de la colitis crónica inducida con TNBS. Por el contrario, el IL-13R $\alpha$ 1 se expresa de forma constitutiva en los intestinos de ratones control y enfermos.

El análisis de las células mononucleares de sangre periférica de la población objeto con colitis ulcerosa y control normal revela que hay un incremento del número de células NKT que expresan un receptor de IL-13 (es decir, IL-13R $\alpha$ 2) en sujetos con colitis ulcerosa. Se usó análisis por citometría de flujo con dos canales para identificar las células portadoras de marcadores celulares de NKT (p. ej., CD161) y receptores de IL-13, usando anticuerpos conjugados con los fluorocromos adecuados. En sujetos con colitis ulcerosa, se encontró que el 1,29-6,88 % de las células expresaban este receptor, mientras que en los controles se encontró que el 0,16-0,38 % de las células se expresaban este receptor (Fig. 14).

#### **Ejemplo 5: Expresión de IL-13 por células T (p. ej., células NKT) en el intestino**

Un incremento en el número de células T (p. ej., células NKT) que expresan un receptor de IL-13 (p. ej., IL-13R $\alpha$ 2) durante la inflamación en el intestino durante la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn aguda o crónica se demuestra mediante el procedimiento siguiente. Las células intestinales aisladas de los sujetos control o de sujetos con EEI se analizan mediante análisis por citometría de flujo con dos canales usando anticuerpos específicos de marcadores de células T (p. ej., CD161 para células NKT) y anticuerpos específicos para receptores de IL-13 (p. ej., IL-13R $\alpha$ 2) para detectar células T portadoras de un receptor de IL-13. También se pueden usar otros procedimientos conocidos en la técnica para detectar la coexpresión de proteínas en la superficie celular. Mediante uno o más de estos procedimientos se demuestra que la progresión de la enfermedad EII, por ejemplo colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn aguda o crónica, implica un incremento del número de células T (p. ej., células NKT) que expresan receptor(es) de IL-13 en el intestino afectado. Además, como se divulga en el presente documento, esta expresión de receptores de IL-13 por las células T (p. ej., células NKT) está implicada en la inflamación y/o la fibrosis intestinal durante la EII, que se puede inhibir con las composiciones y procedimientos proporcionados en el presente documento.

#### **REFERENCIAS**

Balk, S. P., Bleicher, P. A., and Terhorst, C. (1989). Isolation and characterization of a cDNA and gene coding for a fourth CD1 molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 252-256.

Bendelac, A. (1995). Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. *J Exp Med* 182, 2091-2096.

Bleicher, P. A., Balk, S. P., Hagen, S. J., Blumberg, R. S., Flotte, T. J., and Terhorst, C. (1990). Expression of murine CD1 on gastrointestinal epithelium. *Science* 250, 679-682.

Blumberg, R. S., Terhorst, C., Bleicher, P., McDermott, F. V., Allan, C. H., Landau, S. B., Trier, J. S., and Balk, S. P. (1991). Expression of a nonpolymorphic MHC class I-like molecule, CD1D, by human intestinal epithelial cells. *J Immunol* 147, 2518-2524.

Boirivant, M., Fuss, I. J., Chu, A., and Strober, W. (1998). Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *J Exp Med* 188, 1929-1939.

Brown, M. A., and Hural, J. (1997). Functions of IL-4 and control of its expression. *Crit Rev Immunol* 17, 1-32.  
Ceponis, P. J., Botelho, F., Richards, C. D., and McKay, D. M. (2000). Interleukins 4 and 13 increase intestinal

- epithelial permeability by a phosphatidylinositol 3-kinase pathway. Lack of evidence for STAT 6 involvement. *J Biol Chem* 275, 29132-29137.
- Chen, H., and Paul, W. E. (1997). Cultured NK1.1+ CD4+ T cells produce large amounts of IL-4 and IFN-gamma upon activation by anti-CD3 or CD1. *J Immunol* 159, 2240-2249.
- 5 Cui, J., Shin, T., Kawano, T., Sato, H., Kondo, E., Toura, I., Kaneko, Y., Koseki, H., Kanno, M., and Taniguchi, M. (1997). Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* 278, 1623-1626.
- Donaldson, D. D., Whitters, M. J., Fitz, L. J., Neben, T. Y., Finnerty, H., Henderson, S. L., O'Hara, R. M., Jr., Beier, D. R., Turner, K. J., Wood, C. R., and Collins, M. (1998). The murine IL-13 receptor alpha 2: molecular cloning, characterization, and comparison with murine IL-13 receptor alpha 1. *J Immunol* 161, 2317-2324.
- 10 Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T. R., Howard, M., Moore, K. W., and O'Garra, A. (1991). IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 146, 3444-3451.
- Fort, M. M., Cheung, J., Yen, D., Li, J., Zurawski, S. M., Lo, S., Menon, S., Clifford, T., Hunte, B., Lesley, R., et al. (2001). IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity* 15, 985-995.
- 15 Fuss, I. J., Neurath, M., Boirivant, M., Klein, J. S., de la Motte, C., Strong, S. A., Fiocchi, C., and Strober, W. (1996). Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* 157, 1261-1270.
- Gumperz, J. E., Roy, C., Makowska, A., Lum, D., Sugita, M., Podrebarac, T., Koezuka, Y., Porcelli, S. A., Cardell, S., Brenner, M. B., and Behar, S. M. (2000). Murine CD1d-restricted T cell recognition of cellular lipids. *Immunity* 12, 211-221.
- Hayakawa, K., Lin, B. T., and Hardy, R. R. (1992). Murine thymic CD4+ T cell subsets: a subset (Thy0) that secretes diverse cytokines and overexpresses the V beta 8 T cell receptor gene family. *J Exp Med* 176, 269-274.
- 25 Ishikawa, H., Hisaeda, H., Taniguchi, M., Nakayama, T., Sakai, T., Maekawa, Y., Nakano, Y., Zhang, M., Zhang, T., Nishitani, M., et al. (2000). CD4(+) v(alpha)14 NKT cells play a crucial role in an early stage of protective immunity against infection with *Leishmania major*. *Int Immunol* 12, 1267-1274.
- Kaneko, Y., Harada, M., Kawano, T., Yamashita, M., Shibata, Y., Gejyo, F., Nakayama, T., and Taniguchi, M. (2000). Augmentation of Valpha14 NKT cell-mediated cytotoxicity by interleukin 4 in an autocrine mechanism resulting in the development of concanavalin A-induced hepatitis. *J Exp Med* 191, 105-114.
- 30 Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Motoki, K., Ueno, H., Nakagawa, R., Sato, H., Kondo, E., et al. (1997). CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278, 1626-1629.
- Koyasu, S. (1994). CD3+CD16+NK1.1+B220+ large granular lymphocytes arise from both alpha-beta TCR+CD4-CD8- and gamma-delta TCR+CD4-CD8-cells. *J Exp Med* 179, 1957-1972.
- 35 Kumar, H., Belperron, A., Barthold, S. W., and Bockenstedt, L. K. (2000). Cutting edge: CD1d deficiency impairs murine host defense against the spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *J Immunol* 165, 4797-4801.
- Lantz, O., and Bendelac, A. (1994). An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8-T cells in mice and humans. *J Exp Med* 180, 1097-1106.
- 40 Lee, P. T., Benlagha, K., Teyton, L., and Bendelac, A. (2002). Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells. *J Exp Med* 195, 637-641.
- Minty, A., Asselin, S., Bensussan, A., Shire, D., Vita, N., Vyakarnam, A., Wijdenes, J., Ferrara, P., and Caput, D. (1997). The related cytokines interleukin-13 and interleukin-4 are distinguished by differential production and differential effects on T lymphocytes. *Eur Cytokine Netw* 8, 203-213.
- 45 Madhankumar AB, Mintz A, Debinski W. Alanine-scanning mutagenesis of alpha-helix D segment of interleukin-13 reveals new functionally important residues of the cytokine. *J Biol Chem*. 2002 Nov 8;277(45):43194-205.
- Miyamoto, K., Miyake, S., and Yamamura, T. (2001). A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature* 413, 531-534.
- 50

- Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., and Bhan, A. K. (1999). The critical role of interleukin 4 but not interferon gamma in the pathogenesis of colitis in T-cell receptor alpha mutant mice. *Gastroenterology* 116, 320-326.
- Moore, K. W., O'Garra, A., de Waal Malefyt, R., Vieira, P., and Mosmann, T. R. (1993). Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 11, 165-190.
- 5 Neurath, M. F., Fuss, L., Kelsall, B. L., Stuber, E., and Strober, W. (1995). Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med* 182, 1281-1290.
- Oshima, Y., Puri, R.K. (2001) Characterization of a powerful high affinity antagonist that inhibits biological activities of human interleukin-13. *J. Biol. Chem.* 276: 15185-15191.
- 10 Oshima Y, Puri RK. A novel interleukin 13 (IL-13) antagonist that blocks the biological activity of human IL-13 in immune and nonimmune cells. *FASEB J.* 2001 Jun;15(8):1469-71.
- Oshima Y, Joshi BH, Puri RK. Conversion of interleukin-13 into a high affinity agonist by a single amino acid substitution. *J Biol Chem.* 2000 May 12;275(19):14375-80
- Park, S. H., Roark, J. H., and Bendelac, A. (1998). Tissue-specific recognition of mouse CD1 molecules. *J Immunol* 160, 3128-3134.
- 15 Parronchi, P., Romagnani, P., Annunziato, F., Sampognaro, S., Becchio, A., Giannarini, L., Maggi, E., Pupilli, C., Tonelli, F., and Romagnani, S. (1997). Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol* 150, 823-832.
- Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* 2002;347:417-429.
- 20 Puri, R.K., Leland, P., Obiri, N.1., Husain, S.R., Kreitman, R.J., Haas, G.P., Pastan, I., Debinski, W. (1996). Targeting of interleukin-13 receptor on human renal cell carcinoma cells by a recombinant chimeric protein composed of interleukin-13 and a truncated form of *Pseudomonas* exotoxin A (PE38QQR). *Blood*: 4333-4339.
- Roark, J. H., Park, S. H., Jayawardena, J., Kavita, U., Shannon, M., and Bendelac, A. (1998). CDR1.1 expression by mouse antigen-presenting cells and marginal zone B cells. *J Immunol* 160,3121-3127.
- 25 Sartor, R. B. (1995). Current concepts of the etiology and pathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterol Clin North Am* 24, 475-507.
- Saubermann, L. J., Beck, P., De Jong, Y. P., Pitman, R. S., Ryan, M. S., Kim, H. S., Exley, M., Snapper, S., Balk, S. P., Hagen, S. J., et al. (2000). Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide in the presence of CD1d provides protection against colitis in mice. *Gastroenterology* 119, 119-128.
- Scheiffele, F., Fuss, I. (2002). Induction of TNBS colitis in mice, *Viol* 15.19, John Wiley & Sons, Inc.).
- 30 Smiley, S. T., Kaplan, M. H., and Grusby, M. J. (1997). Immunoglobulin E production in the absence of interleukin-4 secreting CD1-dependent cells. *Science* 275, 977-979.
- Sonoda, K. H., Exley, M., Snapper, S., Balk, S. P., and Stein-Streilein, J. (1999). CD1-reactive natural killer T cells are required for development of systemic tolerance through an immune-privileged site. *J Exp Med* 190, 1215-1226.
- 35 Spada, F. M., Koezuka, Y., and Porcelli, S. A. (1998). CD1d-restricted recognition of synthetic glycolipid antigens by human natural killer T cells. *J Exp Med* 188, 1529-1534.
- Strober, S., Cheng, L., Zeng, D., Palathumpat, R., Dejbakhsh-Jones, S., Huie, P., and Sibley, R. (1996). Double negative (CD4-CD8-alpha beta+) T cells which promote tolerance induction and regulate autoimmunity. *Immunol Rev* 149,217-230.
- 40 Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* 2002;20:495-549.
- Takeda, K., Hayakawa, Y., Van Kaer, L., Matsuda, H., Yagita, H., and Okumura, K. (2000). Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5498-5503.
- 45 Terabe, M., Matsui, S., Noben-Trauth, N., Chen, H., Watson, C., Donaldson, D. D., Carbone, D. P., Paul, W. E., and Berzofsky, J. A. (2000). NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R/STAT6 pathway. *Nat Immunol* 1, 515-520.
- Urban, J. F., Jr., Noben-Trauth, N., Donaldson, D. D., Madden, K. B., Morris, S. C., Collins, M., and Finkelman, F. D. (1998). IL-13, IL-4Ralpha, and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunity* 8, 255-264.

Vezys, V., Olson, S., and Lefrancois, L. (2000). Expression of intestine-specific antigen reveals novel pathways of CD8 T cell tolerance induction. *Immunity* 12, 505-514.

Wills-Karp, M., Luyimbazi, J., Xu, X., Schofield, B., Neben, T. Y., Karp, C. L., and Donaldson, D. D. (1998). Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 282, 2258-2261.

5 Yoshimoto, T., and Paul, W. E. (1994). CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. *J Exp Med* 179, 1285-1295.

Zurawski, G., and de Vries, J. E. (1994). Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunol Today* 15, 19-26.

10

**Secuencias**

SEC ID N° 1 (proteína IL-13 humana [secuencia señal (subrayada) y madura])

MALLLTTVIALTCLGGFASPGVPVPPSTALRELIEELVNITQNKQAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALESLIN  
VSGCSAIEKTQRMLSGFPCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLLHLKFLFREGRFN

15

SEC ID N° 2 (ADNc de IL-13 humana)

```

1  ttccggcatcc  gctcctcaat  cctctcctgt  tggcactggg  cctcatggcg  cttttgttga
61  ccacggtcac  tgctctcact  tgcttggcg  gctttgcctc  cccaggccct  gtgcctccct
121 ctacagccct  cagggagctc  attgaggagc  tgggtcaacat  caccagaac  cagaaggctc
181 cgctctgcaa  tggcagcatg  gtatggagca  tcaacctgac  agctggcatg  tactgtgcag
241 ccctggaate  cctgatcaac  gtgtcaggct  gcagtgccat  cgagaagacc  cagaggatgc
301 tgagcggatt  ctgcccgcac  aaggtctcag  ctgggcagtt  ttccagcttg  catgtccgag
361 acaccaaaat  cgaggtggcc  cagtttgtaa  aggacctgct  cttacattta  aagaaacttt
421 ttccgagagg  acggttcaac  tgaaacttcg  aaagcatcat  tatttgacaga  gacaggacct
481 gactattgaa  gttgcagatt  ctttttctt  tctgatgtca  aaaatgtctt  gggtagggcg
541 gaaggagggt  tagggagggt  taaaattcct  tagcttagac  ctcagcctgt  gctgcccgtc
601 ttcagcctag  ccgacctcag  ccttcccctt  gccagggtct  cagcctgggt  ggctcctct
661 gtccagggcc  ctgagctcgg  tggaccagg  gatgacatgt  ccctacacce  ctcccctgcc
721 ctagagcaca  ctgtagcatt  acagtgggtg  cccccttgc  cagacatgtg  gtgggacagg
781 gaccacttc  acacacaggc  aactgaggca  gacagcagct  caggcacact  tcttcttgg
841 cttatttatt  attgtgtgtt  atttaaata  gtgtgtttgt  caccgttggg  gattggggaa
901 gactgtggct  gctggcactt  ggagccaagg  gttcagagac  tcaggggccc  agcactaaag
961 cagtggaccc  caggagtccc  tggttaata  tactgtgtac  agaattctgc  tacctcactg
1021 gggctcctgg  gcctcggagc  ctcatccgag  gcagggtcag  gagaggggca  gaacagccgc
1081 tcctgtctgc  cagccagcag  ccagctctca  gccaacgagt  aatttattgt  ttttctcgt
1141 atttaaatat  taaatatgtt  agcaaagagt  taatatatag  aagggtacct  tgaacactgg
1201 gggaggggac  attgaacaag  ttgtttcatt  gactatcaaa  ctgaagccag  aaataaagtt
1261 ggtgacagat
    
```

SEC ID N° 3 (exotoxina A de *Pseudomonas* (PE))

```

MHLIPHWIPLVASLGLLAGSSASAAEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRSRMSVDPAIADTNGQGVLYHSM
VLEGGNDALKLAIDNALSITSDGLTIRLEGGVEPNKPVRYSTRQARGSWSLNWLVPIGHEKPSNIKVFIEH
LNAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFVRAHESNEMQPTLAI SHAGVSVVMAQTQPRREKRWSEWA
SGKVLCLLDPLDGVYNYLAQQRCLDDTWEKGIYRVLAGNPAKHDLDIKPTVISHRLHFPEGGLAALTAHQ
ACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQ
ARLALTLAAAESERFVRQGTGNDEAGANADVSLTCPVAAGECAGPADSGDALLERNYPTGAEFLGDGGDV
SFSTRGTQNWTVRLLQAHRLQLEERGYVFGYHGTFLAAQSI VFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAY
GYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRSSLPGFYRTSLTLAAPEAAGEVERLI GHPLPLRLDAITGPEEEGGR
LETILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLK
    
```

20

SEC ID Nº 4

KDEL

SEC ID Nº 5

5 REDLK

SEC ID Nº 6

REDL

10 SEC ID Nº 7

RDEL

SEC ID Nº 8 (proteína IL-13 humana [madura])

SPGPFVPPSTALRELI EELVNI TQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALES LINVSGCSAIEKTQMLSGFC  
PHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLLHLKCLFREGRFN

15

LISTADO DE SECUENCIAS

- 20 <110> El Gobierno de EE.UU., representado por el Secretario, Departamento de Salud y Servicios Humanos, Warren Fuss, Ivan Mannon, Peter Preiss, Jan Puri, Raj Kawakami, Koji Fichtner-Feigl, Stefan Kitani, Atsushi
- <120> PROCEDIMIENTOS DE TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DE LA ENFERMEDAD INTESTINAL INFLAMATORIA QUE IMPLICA IL-13 Y CÉLULAS NKT
- 25 <130> 14014.0410P2
- <150> 60/671,624
- <151> 2005-04-15
- 30 <160> 8
- <170> FastSEQ para la versión 4.0 de Windows
- <210> 1
- <211> 132
- 35 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

ES 2 412 005 T3

```

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

```

<210> 2  
 <211> 1270  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

```

      ttggcatcc gctcctcaat cctctcctgt tggcactggg cctcatggcg cttttgttga      60
      ccacggatcat tgctctcact tgccttggcg gctttgcctc cccagggcct gtgocctcct      120
      ctadagccct cagggagctc attgaggagc tgggtcaacat caccagaac cagaaggctc      180
10      cgctctgcaa tggcagcatg gtatggagca tcaacctgac agctggcatg tactgtgcag      240
      ccctggaatc cctgatcaac gtgtcaggct gcagtgcctat cgagaagacc cagaggatgc      300
      tgagcggatt ctgcccgcac aaggtctcag ctgggcagtt ttccagcttg catgtccgag      360
      acacaaaaat cgaggtggcc cagtttgtaa aggacctgct cttacattta aagaaacttt      420
      ttgcgagggg acggttcaac tgaacttcg aaagcatcat tatttgaga gacaggacct      480
      gactattgaa gttgcagatt ctttttctt tctgatgtca aaaatgtctt gggtagggcg      540
      gaaggagggg tagggagggg taaaattcct tagcttagac ctcagcctgt gctgcccgtc      600
      ttcagcctag ccgacctcag ccttcccctt gccagggct cagcctgggtg ggcctcctct      660
      gtccagggcc ctgagctcgg tggaccagg gatgacatgt ccctacacc cccccctgcc      720
      ctagagcaca ctgtagcatt acagtgggtg cccccctgc cagacatgtg gtgggacagg      780
      gaccacttc acacacaggc aactgaggca gacagcagc caggcacact tcttcttggt      840
      cttatttatt attgtgtgtt atttaaatga gtgtgtttgt caccgttggg gattggggaa      900
      gactgtggct gctggcactt ggagccaagg gttcagagac tcagggcccc agcactaaag      960
      cagtggaccc caggagtccc tggtaataag tactgtgtac agaattctgc tacctcactg      1020
      gggctcctggg gctcgggagc ctcatccgag gcagggtcag gagaggggca gaacagccgc      1080
      tcctgtctgc cagccagcag ccagctctca gccaacgagt aatttattgt ttttctcctg      1140
      atttaaatat taaatatgtt agcaaagagt taatatatag aagggtacct tgaacactgg      1200
      gggagggggac attgaacaag ttgtttcatt gactatcaaa ctgaagccag aaataaagtt      1260
      ggtgacagat

```

<210> 3  
 <211> 638  
 15 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Nota= constructo sintético

<400> 3

ES 2 412 005 T3

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



Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys Ile Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn  
 245 250 255  
 Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile Lys Pro Thr Val Ile Ser His Arg  
 260 265 270  
 Leu His Phe Pro Glu Gly Gly Ser Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln  
 275 280 285  
 Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg  
 290 295 300  
 Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val  
 305 310 315 320  
 Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val  
 325 330 335  
 Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu  
 340 345 350  
 Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala  
 355 360 365  
 Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu  
 370 375 380  
 Ala Gly Ala Ala Asn Ala Asp Val Val Ser Leu Thr Cys Pro Val Ala  
 385 390 395 400  
 Ala Gly Glu Cys Ala Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu  
 405 410 415  
 Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val  
 420 425 430  
 Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu  
 435 440 445  
 Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr  
 450 455 460  
 His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val  
 465 470 475 480  
 Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile  
 485 490 495  
 Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro  
 500 505 510  
 Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val  
 515 520 525  
 Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala  
 530 535 540  
 Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu  
 545 550 555 560  
 Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg  
 565 570 575  
 Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile  
 580 585 590  
 Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp  
 595 600 605  
 Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp  
 610 615 620  
 Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys  
 625 630 635

<210> 4

<211> 4

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Nota= constructo sintético

10

<400> 4

ES 2 412 005 T3

Lys Asp Glu Leu  
1

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

<220>  
10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Nota= constructo sintético  
<400> 5

Arg Glu Asp Leu Lys  
1 5

15 <210> 6  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Nota= constructo sintético  
<400> 6

25 <210> 7  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Nota= constructo sintético  
<400> 7

Arg Asp Glu Leu  
1

40 <210> 8  
<211> 114  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

45 <400> 8

ES 2 412 005 T3

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

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una sustancia que inhibe la unión de la IL-13 a los receptores de IL-13 sobre células NKT para usar en el tratamiento o la prevención de la respuesta inflamatoria en la enfermedad intestinal inflamatoria, en donde la enfermedad intestinal inflamatoria comprende enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, o en donde la enfermedad intestinal inflamatoria produce fibrosis en un sujeto, en donde la sustancia comprende una IL-13 mutante o un ácido nucleico aislado que codifica una IL-13 mutante, en donde la una IL-13 mutante comprende una mutación que consiste en la sustitución de un residuo de ácido glutámico en la posición 13 de la IL-13 por un residuo de aminoácido cargado positivamente o neutro, y en donde la IL-13 mutante está unida a una molécula efectora, en donde la molécula efectora es una citotóxica o un radionúclido.
- 10 2. La sustancia que inhibe la unión de IL-13 a los receptores de IL-13 en células NKT para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la IL-13 mutante es una IL-13 humana mutante que se une al receptor de IL-13 pero que tiene una capacidad reducida para activar la señalización en dicho receptor-
- 15 3. La sustancia que inhibe la unión de IL-13 a los receptores de IL-13 en células NKT para usar de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la IL-13 mutante tiene una mayor afinidad por el receptor de IL-13 que la IL-13 humana.
4. La sustancia que inhibe la unión de IL-13 a los receptores de IL-13 en células NKT para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el residuo cargado negativamente en la posición 13 de la IL-13 está sustituido por un residuo seleccionado de lisina y arginina.
- 20 5. La sustancia que inhibe la unión de IL-13 a los receptores de IL-13 en células NKT para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la IL-13 mutante comprende la mutación hIL-13E13K de la SEC ID N° 8.
6. La sustancia que inhibe la unión de IL-13 a los receptores de IL-13 en células NKT para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la IL-13 unida a una molécula efectora es una proteína de fusión.
7. La sustancia que inhibe la unión de IL-13 a los receptores de IL-13 en células NKT para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la molécula efectora está conjugada con la IL-13 mutante.
- 25 8. La sustancia que inhibe la unión de IL-13 a los receptores de IL-13 en células NKT para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la citotoxina se selecciona de exotoxina de *Pseudomonas* o una subunidad citotóxica o mutante de la misma, la toxina diftérica o una subunidad citotóxica o mutante de la misma, ricina, saporina, gelonina, caliqueamicina, doxorubicina, ribotoxina, proteína inactivadora del ribosoma y abrina.
- 30 9. La sustancia que inhibe la unión de IL-13 a los receptores de IL-13 en células NKT para usar de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la exotoxina de *Pseudomonas* se selecciona de PE35, PE38, PE38KDEL, PE40, PE4E y PE38QQR.
10. La sustancia que inhibe la unión de IL-13 a los receptores de IL-13 en células NKT para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el ácido nucleico es un vector.
- 35 11. Uso de una sustancia que inhibe la unión de la IL-13 a los receptores de IL-13 sobre células NKT para preparar un medicamento para el tratamiento o la prevención de la respuesta inflamatoria en la enfermedad intestinal inflamatoria, en donde la enfermedad intestinal inflamatoria comprende enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, o en donde la enfermedad intestinal inflamatoria produce fibrosis en un sujeto, en donde el compuesto comprende una IL-13 mutante o un ácido nucleico aislado que codifica una IL-13 mutante, en donde la IL-13 mutante comprende una mutación que consiste en la sustitución de un residuo de ácido glutámico en la posición 13 de la IL-13 por un residuo de aminoácido cargado positivamente o neutro, y en donde la IL-13 mutante está unida a una molécula efectora, en donde la molécula efectora es una citotoxina o un radionúclido.
- 40 12. El uso de la reivindicación 11, en el que la IL-13 mutante es una IL-13 mutante humana que se une al receptor de IL-13 pero que tiene menor capacidad para activar la señalización en dicho receptor.
- 45 13. El uso de la reivindicación 11, en el que la IL-13 mutante tiene una afinidad mayor por el receptor de IL-13 que la IL-13 humana.
14. El uso de la reivindicación 11, en el que el residuo cargado negativamente en la posición 13 de la IL-13 está sustituido por un residuo seleccionado de lisina y arginina.
15. El uso de la reivindicación 11, en el que la IL-13 mutante comprende la mutación hIL-13E13K de la SEC ID N° 8.
16. El uso de la reivindicación 11, en el que la IL-13 unida a una molécula efectora es una proteína de fusión.
- 50 17. El uso de la reivindicación 11, en el que la molécula efectora está conjugada a la IL-13 mutante.
18. El uso de la reivindicación 11, en el que la citotoxina se selecciona de exotoxina de *Pseudomonas* o de una subunidad citotóxica o mutante de la misma, toxina diftérica o una subunidad citotóxica o mutante de la misma,

ricina, saporina, gelonina, caliqueamicina, doxorubicina, ribotoxina, proteína inactivadora del ribosoma y abrina.

19. El uso de la reivindicación 18, en el que la exotoxina de *Pseudomonas* se selecciona de PE35, PE38, PE38KDEL, PE40, PE4E y PE38QQR.
20. El uso de la reivindicación 11, en el que el ácido nucleico es un vector.
- 5 21. Un procedimiento ex vivo para proporcionar específicamente una molécula efectora a una célula NKT, que comprende unir la molécula efectora a una molécula de unión al receptor de IL-13 (IL13RBM) y proporcionar a la célula una cantidad eficaz de la molécula efectora unida a IL13RBM.
22. El procedimiento de la reivindicación 21, en el que IL13RBM es una IL-13 humana mutante.
23. El procedimiento de la reivindicación 21, en el que el efector unido a IL13RBM es una proteína de fusión.
- 10 24. El procedimiento de la reivindicación 21, en el que la molécula efectora está conjugada a IL13RBM.
25. El procedimiento de la reivindicación 21, en el que la molécula efectora inhibe la actividad de la célula NKT.
26. El procedimiento de la reivindicación 25, en el que la molécula efectora se selecciona de una citotoxina, un marcador, un radionúclidos, un fármaco, un liposoma y un anticuerpo.
27. El procedimiento de la reivindicación 25, en el que la molécula efectora es una citotoxina.
- 15 28. El uso de la reivindicación 27, en el que la citotoxina se selecciona de exotoxinas de *Pseudomonas* o una subunidad citotóxica o mutante de la misma, toxina diftérica o una subunidad citotóxica o mutante de la misma, ricina, saporina, gelonina, caliqueamicina, doxorubicina, ribotoxina, proteína inactivadora del ribosoma y abrina.
29. El procedimiento de la reivindicación 28, en el que la exotoxina de *Pseudomonas* se selecciona de PE35, PE38, PE38KDEL, PE40, PE4E y PE38QQR.

20

Fig. 1

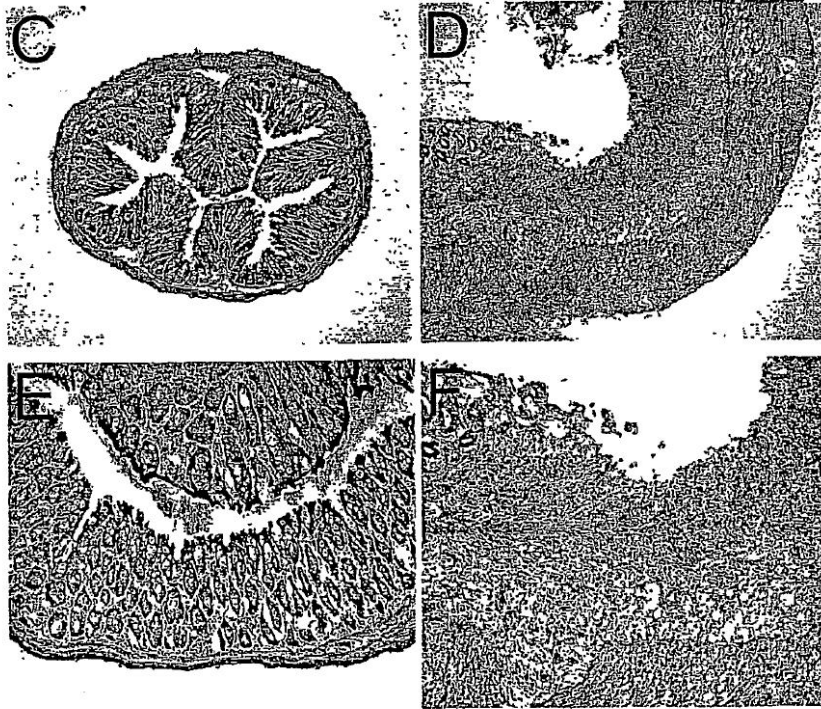
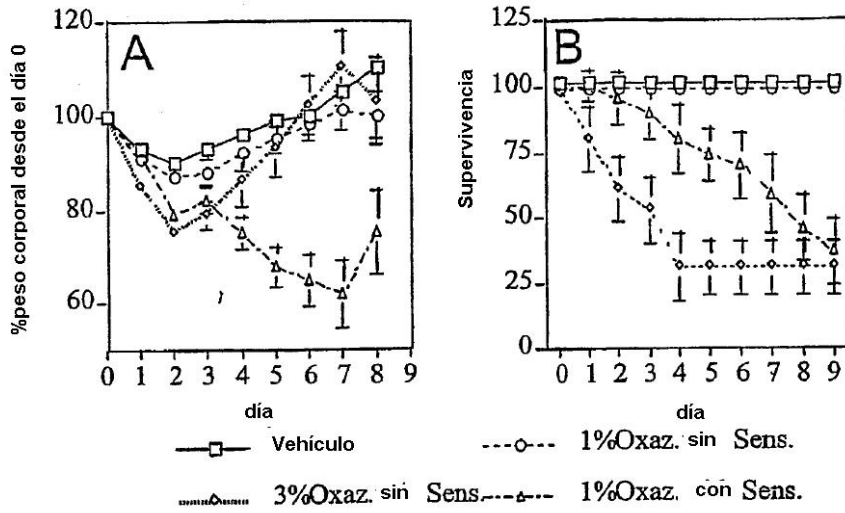


Fig. 2

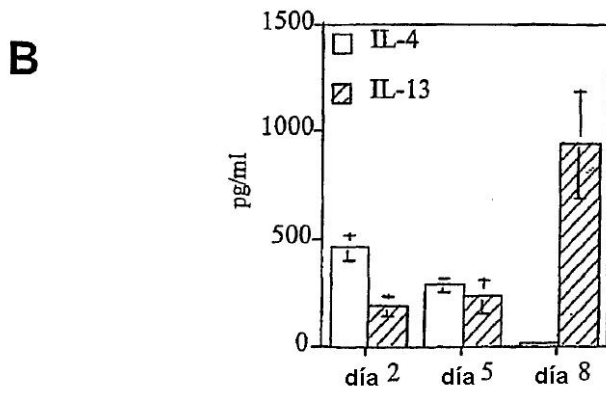
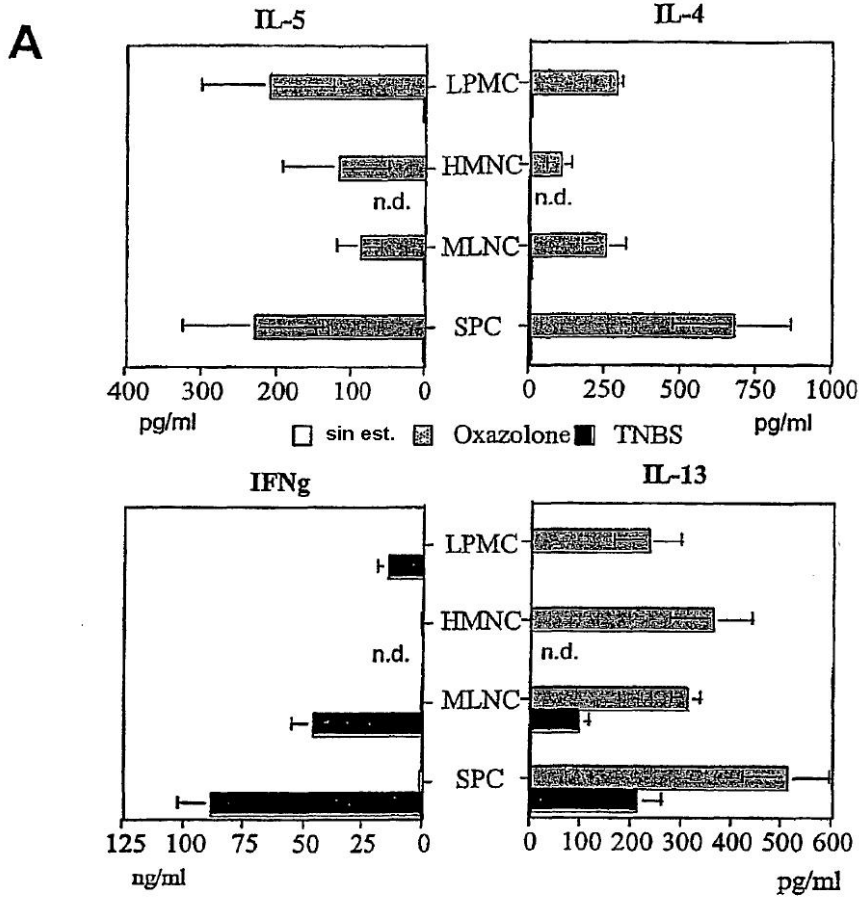


Fig. 3

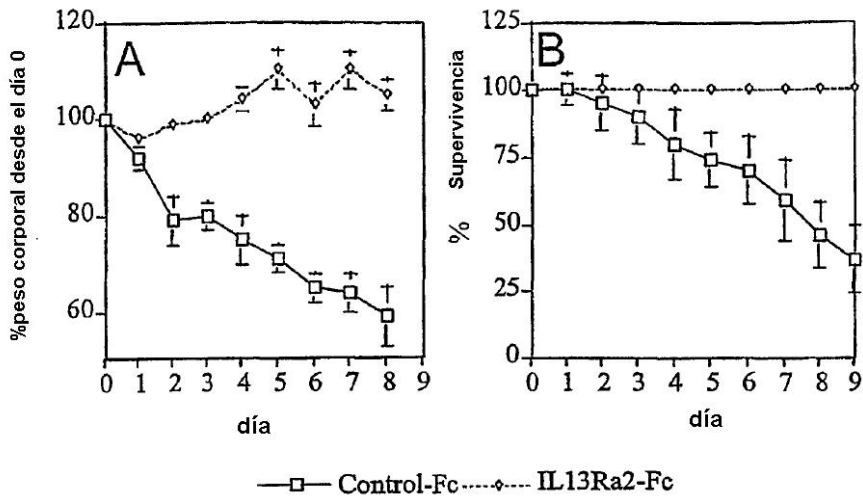




Fig. 4

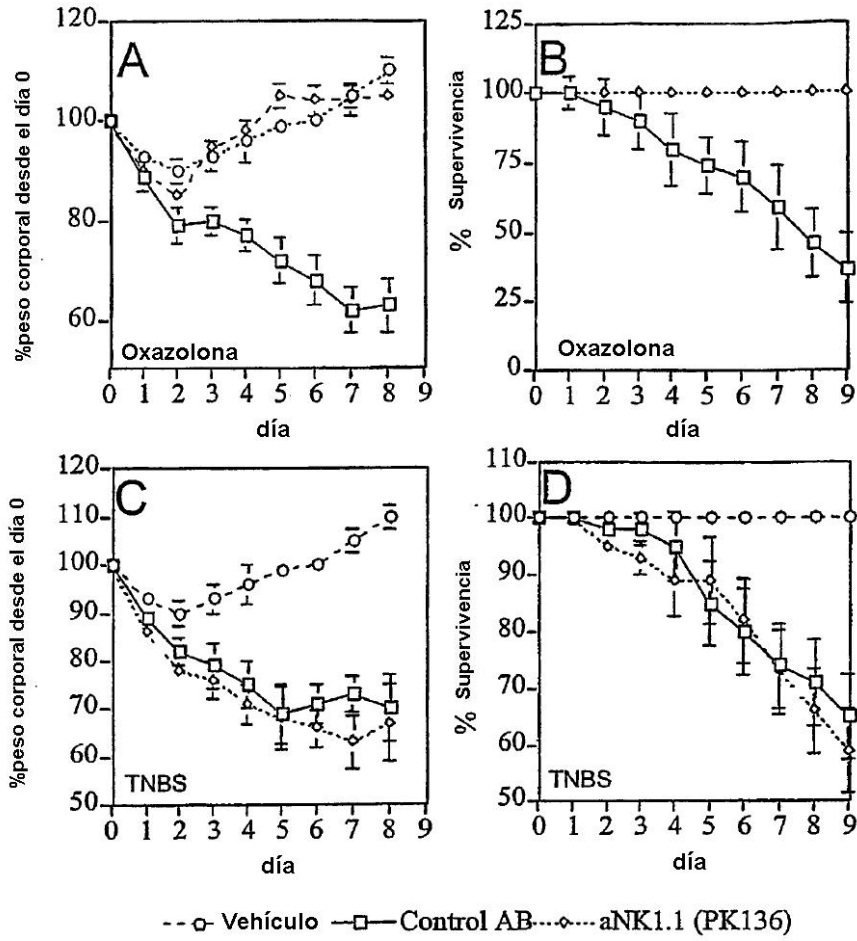


Fig. 5

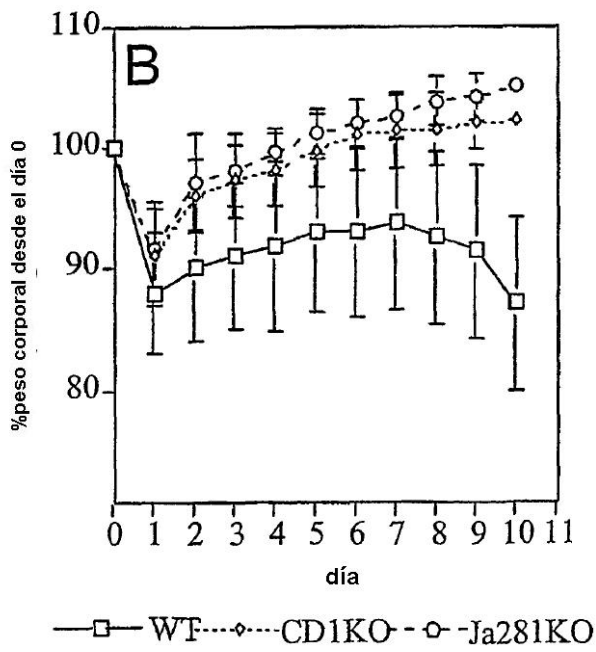
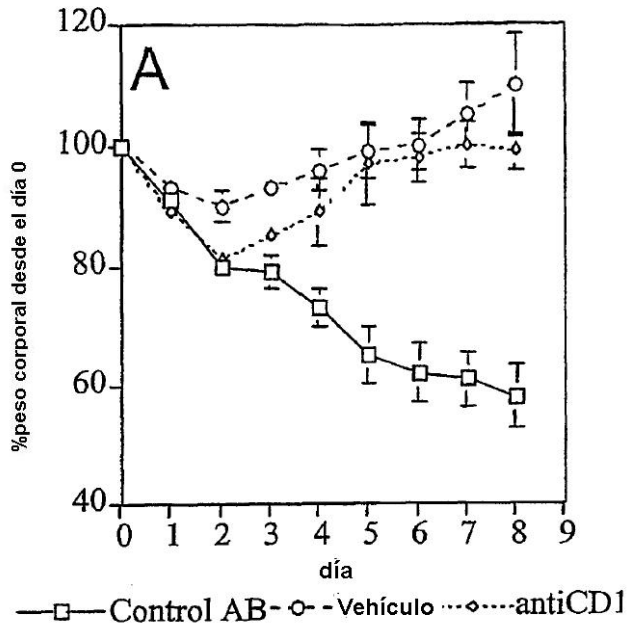


Fig. 6

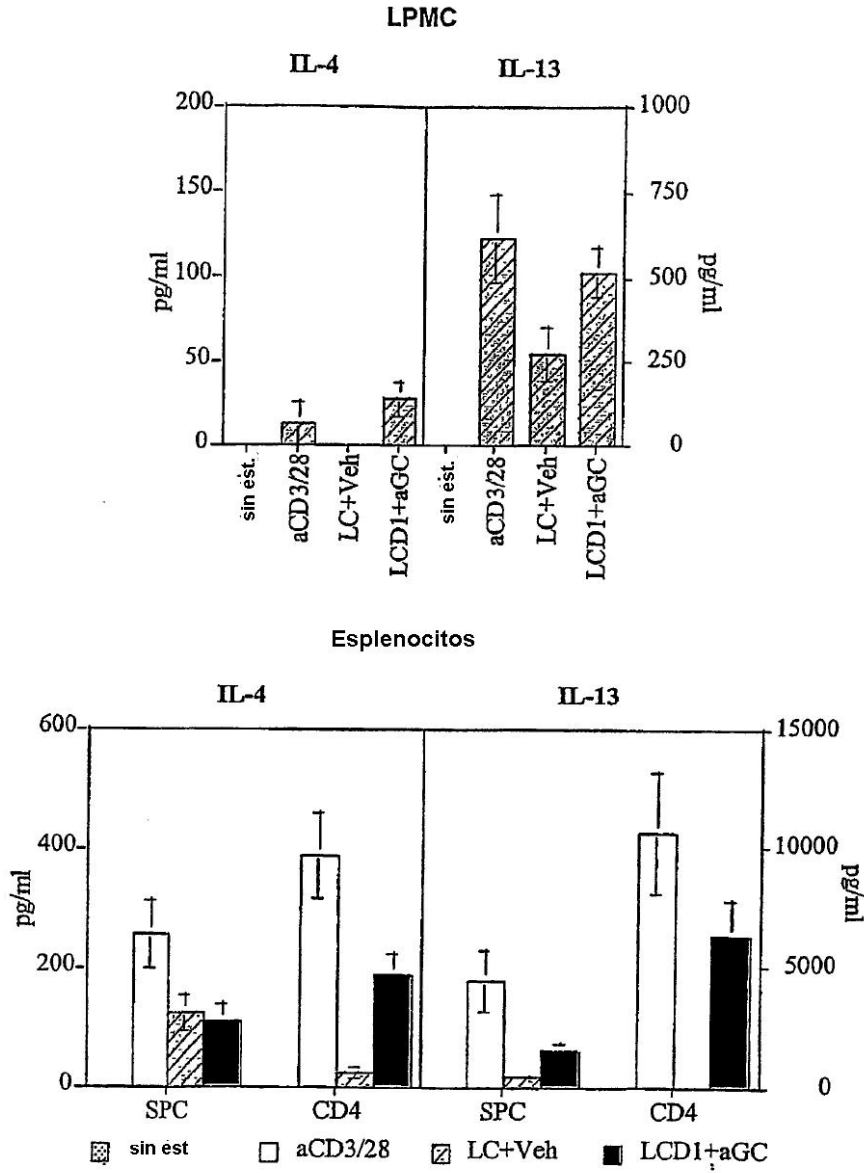


Fig. 7

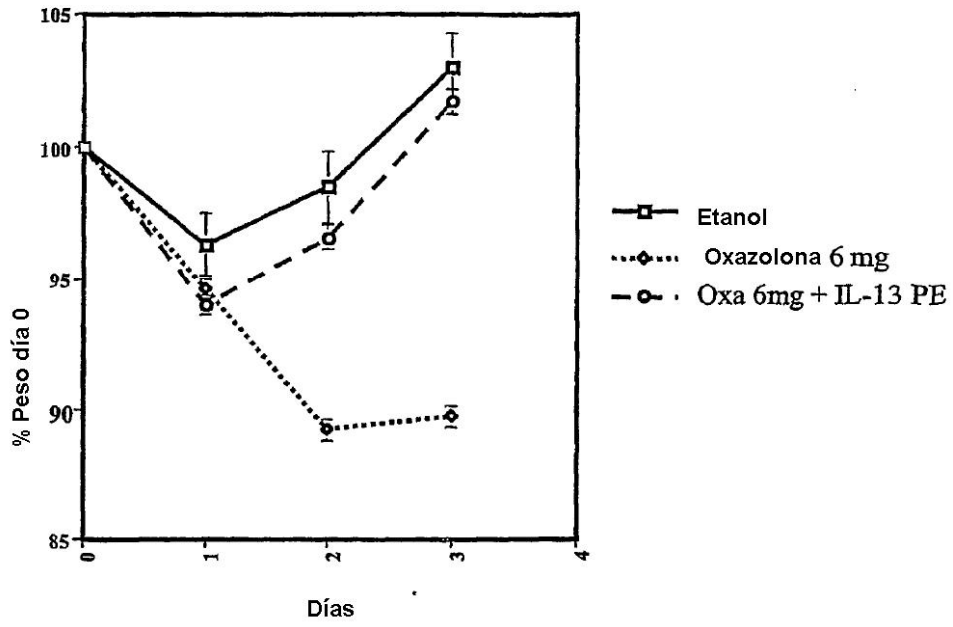


Fig. 8

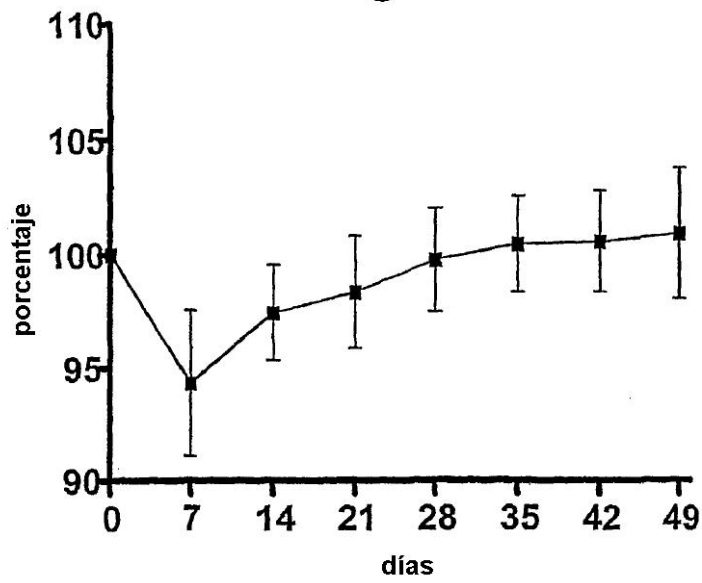


Fig. 9

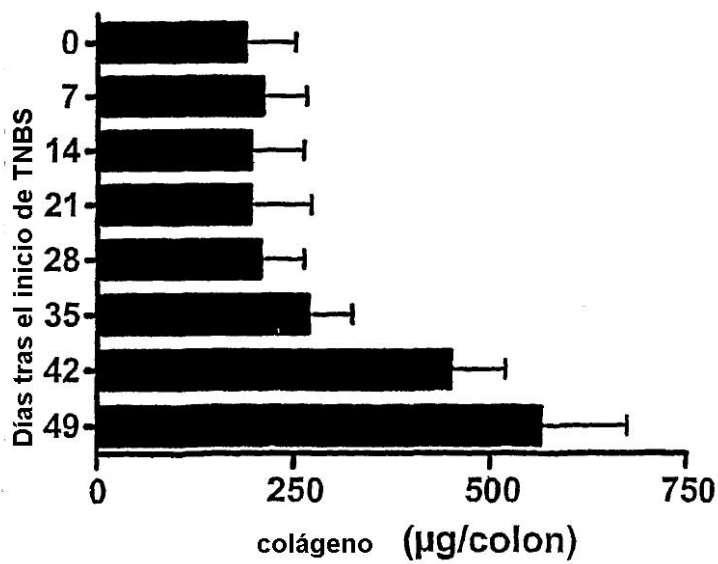


Fig. 10

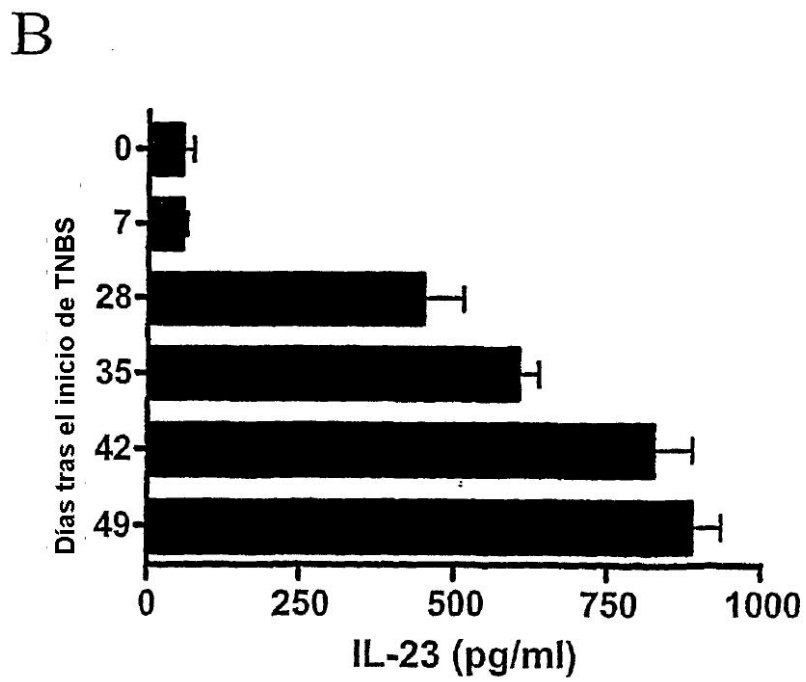
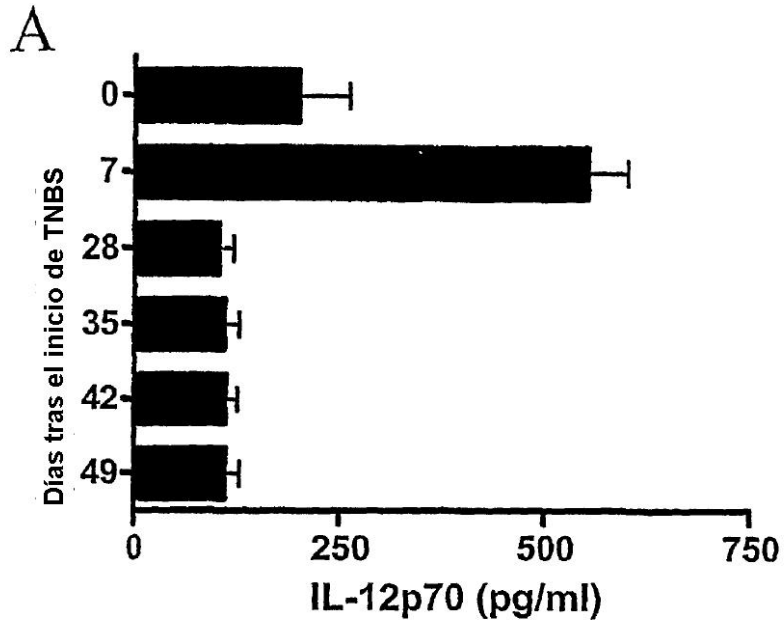
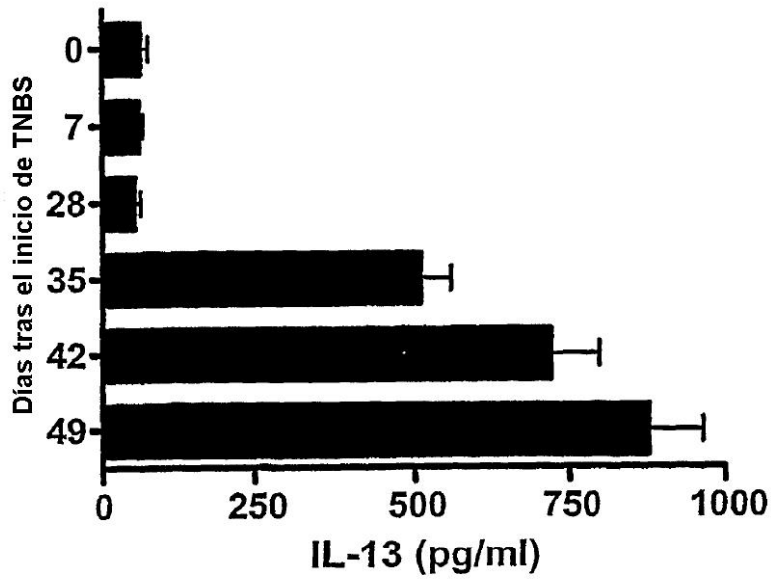


Fig. 10 cont

C



D

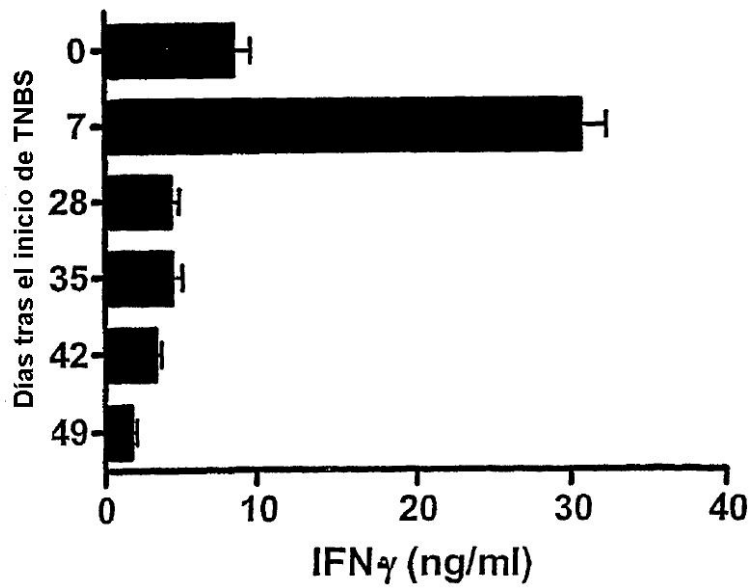
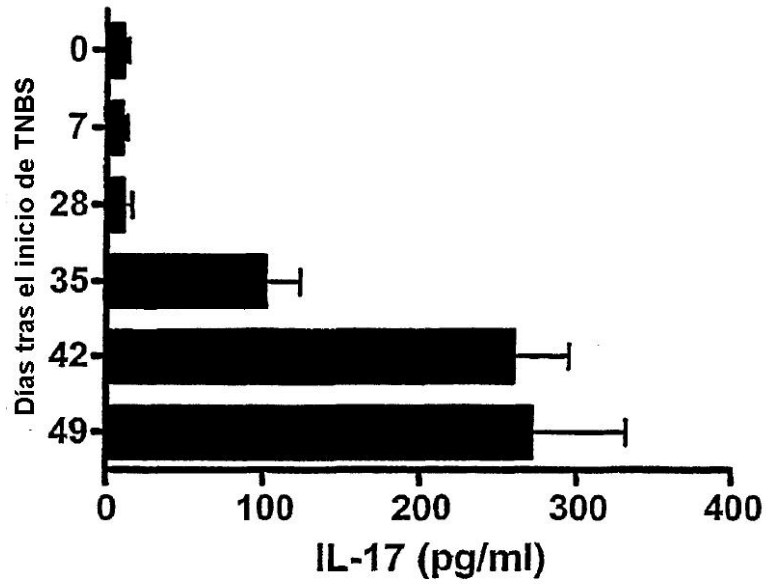


Fig. 10 cont

E



F

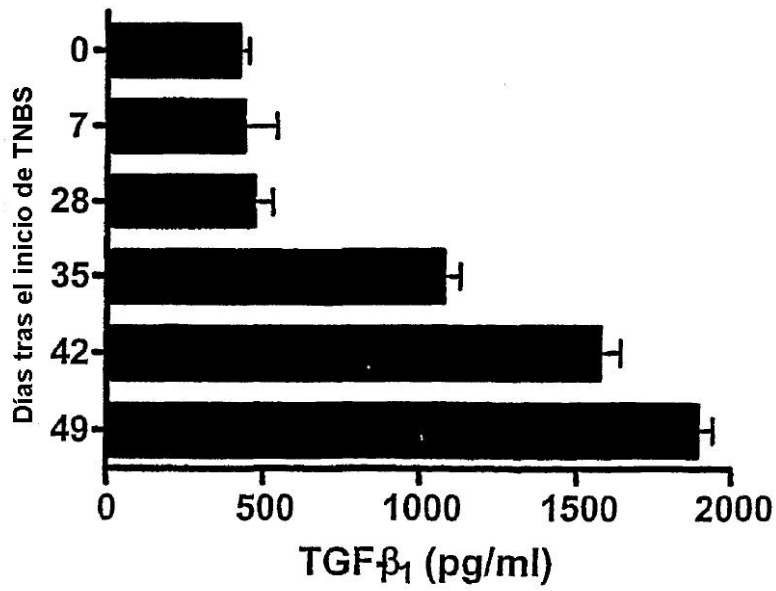




Fig. 10 cont

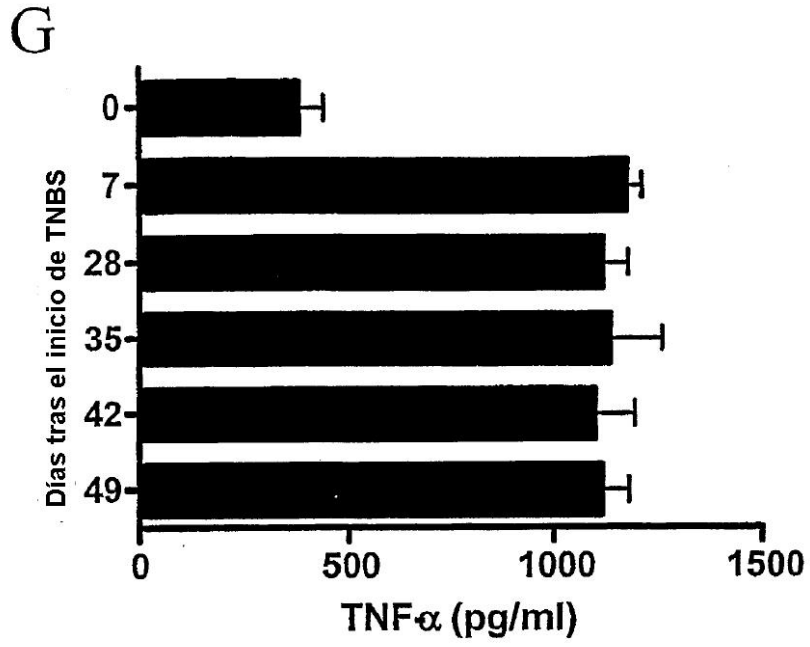


Fig. 11

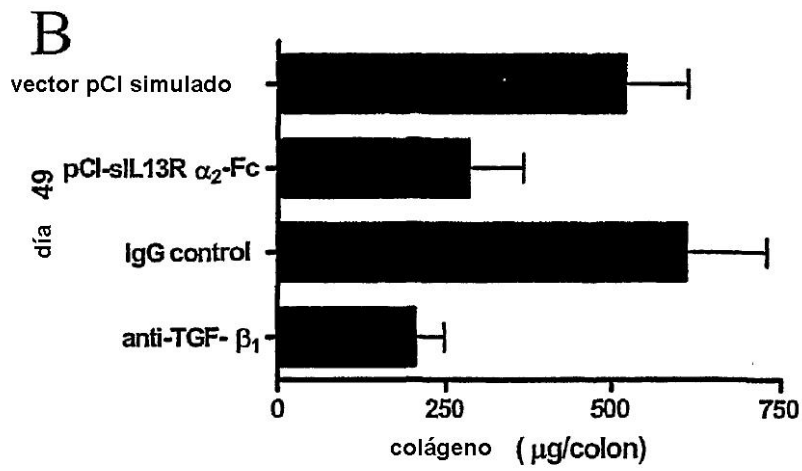
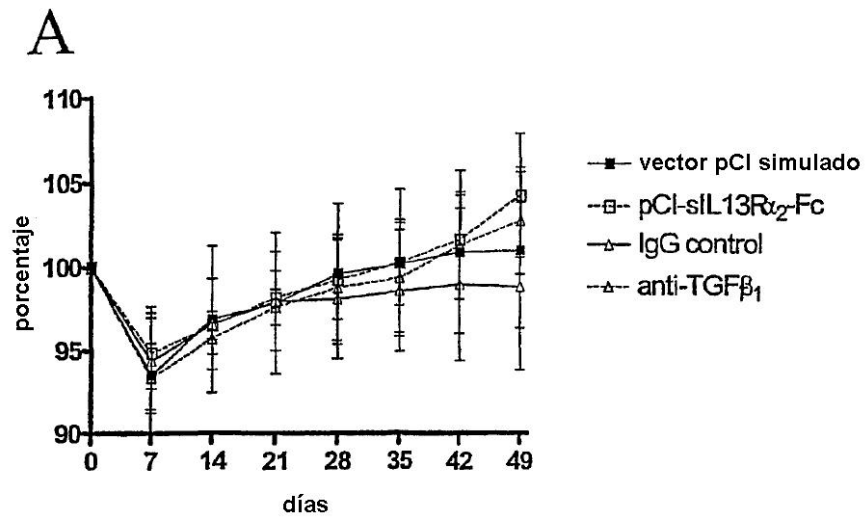
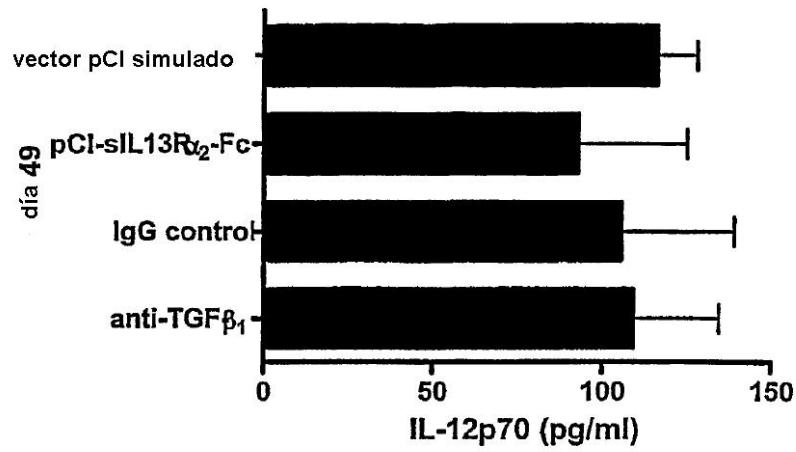


Fig. 12

A



B

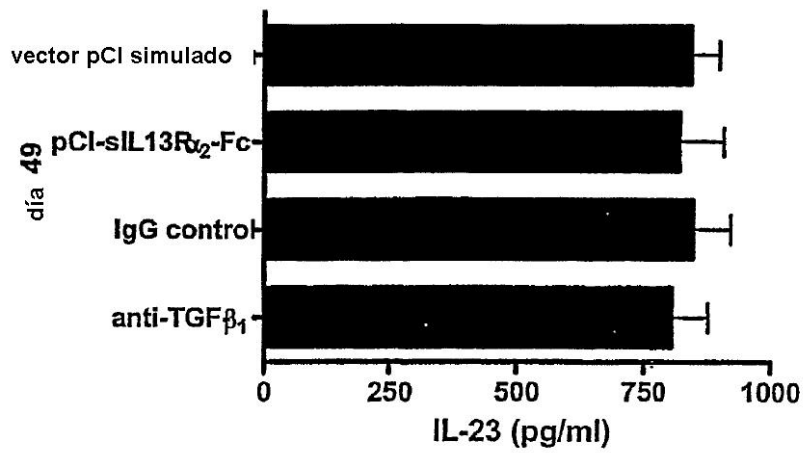
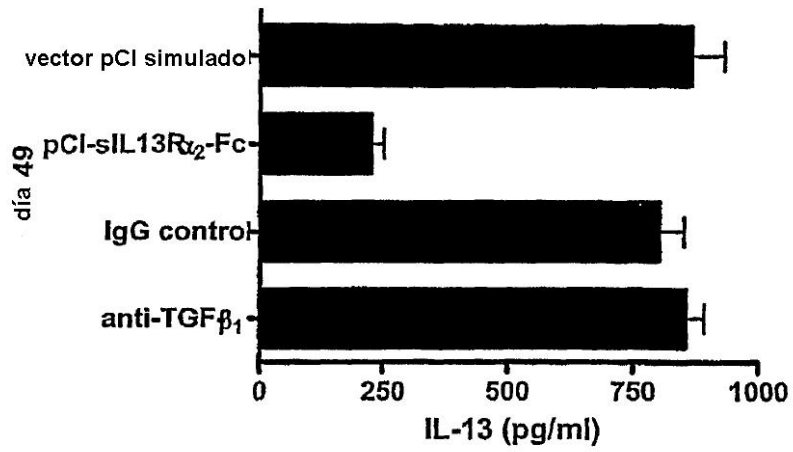


Fig. 12 cont.

C



D

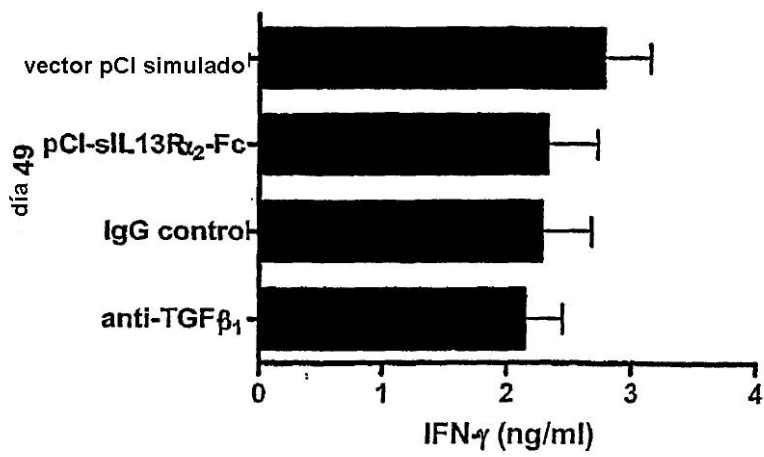
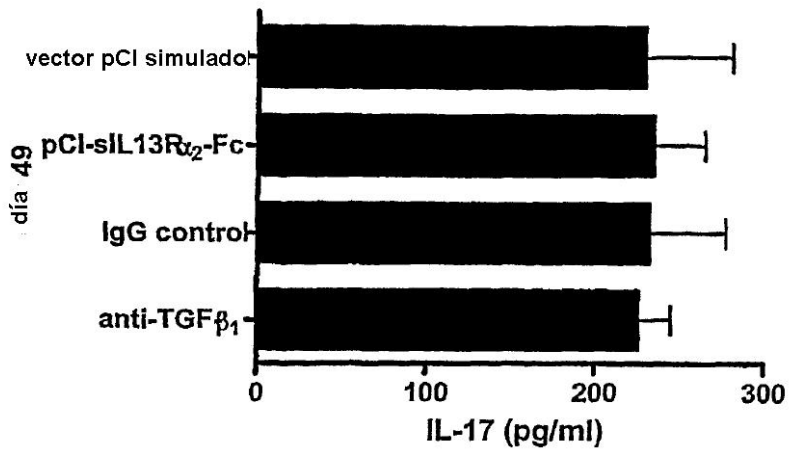


Fig. 12 cont.

E



F

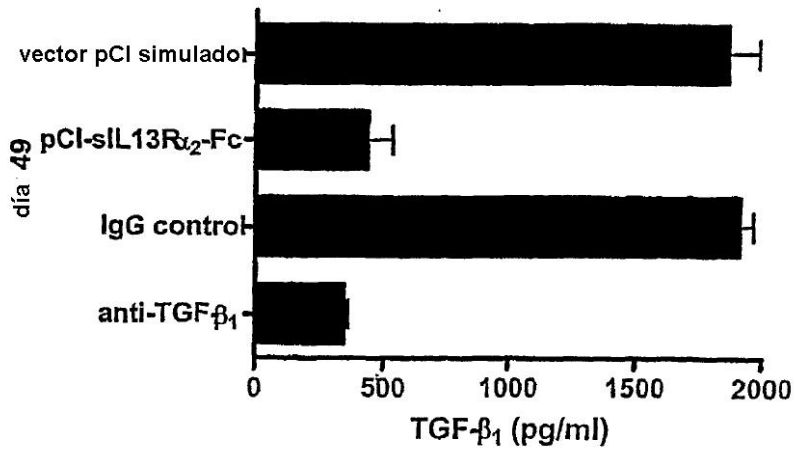


Fig. 12 cont.

G

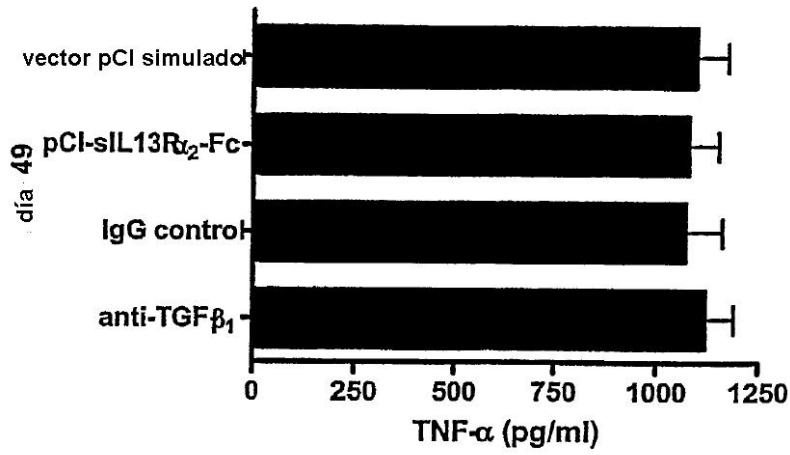


Fig. 13

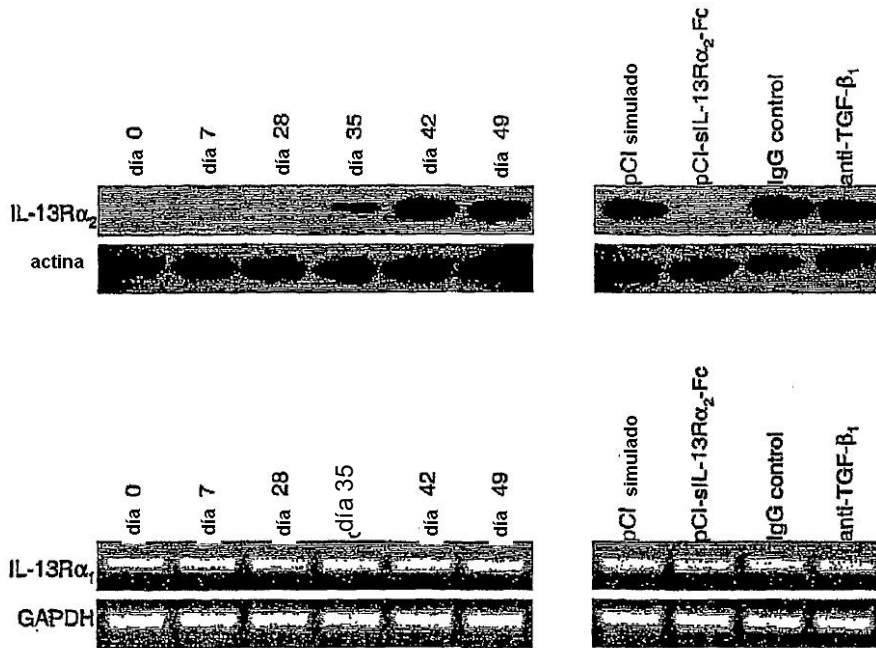
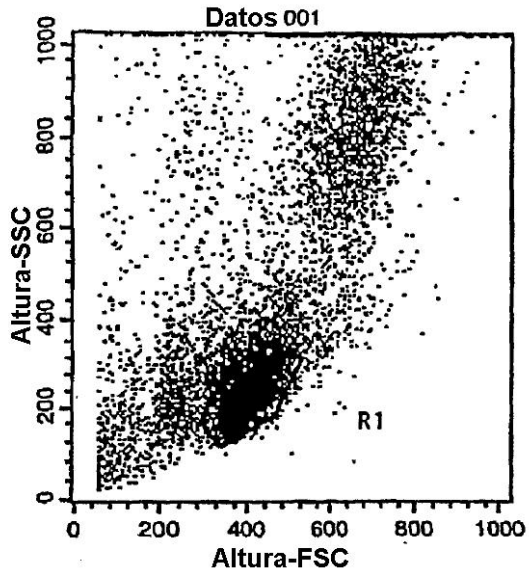


Fig. 14

A



B

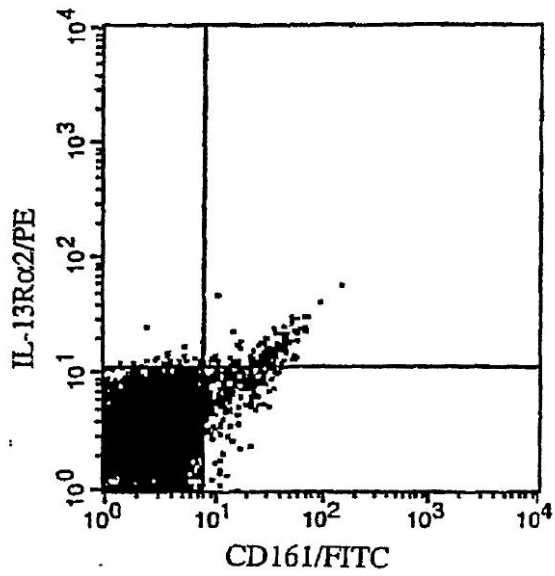


Fig. 15

Prevención de la colitis inducida con oxazolona mediante la administración del mAb anti-IL-13

