

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 226**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2009 E 09795802 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2344538**

54 Título: **Anticuerpos contra IL-25**

30 Prioridad:

30.09.2008 GB 0817891

30.09.2008 US 101293 P

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

03.06.2015

73 Titular/es:

MEDICAL RESEARCH COUNCIL (100.0%)
2nd Floor, David Phillips Building Polaris House
North Star Avenue
Swindon SN2 1FL, GB

72 Inventor/es:

MATTHEWS, DAVID, JOHN;
BARLOW, JILLIAN y
MCKENZIE, ANDREW, NEIL, JAMES

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 537 226 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra IL-25

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos, que incluyen fragmentos de unión de los mismos, dirigidos a interleucina 25 (IL-25).

10 **Antecedentes de la invención**

Asma

15 El asma es un trastorno inflamatorio crónico común de las vías respiratorias. El número de pacientes ha aumentado espectacularmente durante las últimas décadas y la Organización Mundial de la Salud estima que del orden de 300 millones de personas en el mundo padecen asma. El asma alérgica se caracteriza por hipersensibilidad de las vías respiratorias (HVR) incontrolable inducida por varios estímulos provocativos y está asociada a infiltrados inflamatorios del tipo 2 en los pulmones.

20 Las citocinas de tipo 2 desempeñan una función importante en mediar en la inmunidad protectora a infección parasítica por helmintos, regular funciones efectoras tales como el crecimiento de linfocitos B y secreción de IgE, inducir hiperplasia de células caliciformes y producción de moco asociada, eosinofilia, mastocitosis y fibrosis (1). Es las principales funciones desempeñadas por estas citocinas en la regulación de estas funciones efectoras las que las han hecho dianas terapéuticas clave en el asma. De hecho, los modelos de ratón en los que estas citocinas se expresan en exceso muestran características significativas del asma. Sorprendentemente entonces, los esfuerzos para mejorar el asma experimental bloqueando citocinas de tipo 2 específicas han demostrado ser insatisfactorios, con la excepción de inhibir IL-13.

30 La inhibición de IL-13 suprime tanto HVR como la inflamación de las vías respiratorias, aunque el mecanismo sigue sin estar claro (2, 3). Sin embargo, dada la compleja patofisiología y la poco entendida etiología del asma, es incierto si las rutas individuales que eligen diana demostrarán por último lugar ser terapéuticamente satisfactorias.

35 Recientemente, se ha mostrado que la expresión en exceso de IL-25/IL-17E, un miembro de la familia de citocinas IL-17 estructuralmente relacionada (8), induce respuesta de tipo 2 *in vivo* (4-6) y aumenta la sensibilidad a los agonistas de las vías respiratorias (7). Ratones *Il25^{-/-}* dejaron de expulsar parásitos helmínticos eficazmente; un indicador clave de una respuesta de tipo 2 inefectiva (9, 10). También se ha mostrado que IL-25 se regula por incremento en muestras de pacientes con asma.

Enfermedad inflamatoria del intestino

40 La enfermedad inflamatoria del intestino (EII) es una inflamación crónica que afecta la capa mucosa del intestino grueso o colon, que normalmente comprende una o más condiciones de enfermedad seleccionadas del grupo que consiste en colitis ulcerosa (CU) y enfermedad de Crohn (EC). Se cree que la CU es una enfermedad mediada por Th2, mostrando un modelo de ratón representativo la participación de citocinas de tipo 2 en el desarrollo de inflamación del intestino (16). Se ha observado producción de IL-25 en un modelo de ratón de colitis crónica, en asociación con un cambio de respuesta de tipo Th1 a Th2 (17) y se ha informado de alta expresión de ARNm de IL-25 a lo largo del tubo gastrointestinal en ratones (18). Además, el gen IL-25 está localizado dentro de una región de susceptibilidad a enfermedad de Crohn en el cromosoma 14, aunque queda por investigar su posible asociación con la enfermedad (19). Además, la EII puede comprender una o más condiciones de enfermedad seleccionadas del grupo que consiste en colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis isquémica, colitis por desviación, síndrome de Behçet, colitis infecciosa y colitis indeterminada.

50 Las terapias convencionales para el tratamiento de EII implican tanto antibióticos como fármacos derivados de esteroides; sin embargo, estos no son actualmente satisfactorios en inducir o mantener la remisión clínica en pacientes (20). También está actualmente disponible una terapia que implica agentes anti-TNF- α , a pesar de que muestra mala eficacia (21, 22). Esto muestra que hay una clara necesidad de terapias nuevas y más eficaces en el tratamiento de enfermedades inflamatorias del intestino.

Anticuerpos

60 La estructura básica de un anticuerpo es muy conocida en la técnica. Un anticuerpo que se produce naturalmente normalmente tiene cuatro cadenas de polipéptidos: dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas conectadas por enlaces disulfuro. Las cadenas pesadas (VH) y ligeras (VL) tienen cada una una región constante y una región variable (o dominio). Las regiones variables son principalmente responsables de la unión al antígeno. Dentro de cada región variable, tres subregiones, conocidas como las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), hacen contacto con el antígeno. Las CDR de cada dominio variable se numeran, del

extremo N al extremo C, CDR1, CDR2 y CDR3. Entre el extremo N y C de las CDR están las cuatro denominadas regiones estructurales, que hacen algunos contactos, si los hacen, con el antígeno. Más detalles referentes a las estructuras de anticuerpos se ilustran en muchos de los documentos citados más adelante, que se incorporan en el presente documento por referencia.

5 Hay varias formas en las que pueden producirse los anticuerpos contra un antígeno diana. La generación de anticuerpos monoclonales usando tecnología de hibridomas es un método tal. Los anticuerpos se generan normalmente en ratones u otros roedores. Esto puede ser una forma útil de generar anticuerpos de alta afinidad. Sin embargo, para que tales anticuerpos sean entonces útiles en terapia humana, es normalmente necesario transferir las CDR de los anticuerpos a una región estructural humana. Es decir, intentar evitar una respuesta de anticuerpos humanos anti-ratón en un paciente.

15 El principio general del injerto de CDR lo describieron Jones *et al.* y Riechman *et al.* (11, 12). Es decir, las CDR de un anticuerpo de ratón se trasplantan en las regiones estructurales de un anticuerpo humano receptor. En la práctica, aunque el anticuerpo resultante se unirá al mismo antígeno diana que el anticuerpo de ratón donante original, la afinidad del anticuerpo injertado es normalmente muy reducida.

Además, la termoestabilidad de los anticuerpos injertados puede comprometerse frecuentemente.

20 Se conocen en la técnica diversas formas para intentar recuperar y optimizar las propiedades del anticuerpo original. Por ejemplo, dentro de las regiones estructurales hay ciertos restos "de estructura canónica" Chotia & Lesk (13) que están asociados a ciertas CDR de la línea germinal. Además, Foote & Winter (14) han identificado restos de "zona Vernier" (algunos de los cuales también son restos de estructura canónica) que soportan las conformaciones de bucle de unión al antígeno y sus disposiciones relativas y, por tanto, se ha sugerido que desempeñan una función importante en sintonizar el ajuste de un anticuerpo al antígeno. Además, se cree que restos adicionales dentro de la región estructural estabilizan y mantienen la superficie de separación de VH/VL. Por consiguiente, aquellos expertos en la materia que buscan humanizar un anticuerpo frecuentemente buscan regiones estructurales humanas en las que los restos de la zona de Vernier, canónicos y de la superficie de separación ("VCI") se correspondan tan estrechamente como sea posible con aquellos del anticuerpo donante original.

30 Sin embargo, cada anticuerpo representa un desafío único para aquellos expertos en la materia y no hay certeza en que cualquier metodología generalmente conocida para el injerto de CDR sea directamente aplicable en cada caso.

35 Los presentes inventores y colaboradores (Ballantyne *et al.* (15)) informan de la producción de un anticuerpo monoclonal de ratón, 2C3, que se une a IL-25 e *in vivo* puede bloquear la hipersensibilidad de las vías respiratorias en asma alérgica. Hasta la fecha, la secuencia del anticuerpo no ha estado disponible para el público.

40 El documento PCT/GB2008/001365, publicado el 30 de octubre de 2008 como el documento WO2008/129263, informa de la secuencia del anticuerpo 2C3 y su uso en bloquear la hipersensibilidad de las vías respiratorias.

40 **Divulgación de la invención**

45 La presente invención se refiere a un anticuerpo humanizado (injertado con CDR) que se basa en la secuencia de 2C3. En la producción de este anticuerpo tuvieron que superarse varios retos.

50 Los inventores seleccionaron en primer lugar una cadena de VH de anticuerpo humano receptor con homología máxima por VCI, concretamente 20 de los 22 restos de VCI. Sin embargo, se encontró que el anticuerpo resultante ("RHA") se unió a IL-25 a un grado significativamente menor que el propio 2C3. A pesar de varias modificaciones adicionales al anticuerpo, que incluyen cambios a los aminoácidos designados VCI y restos que pareció que representaban mutaciones somáticas raras, se logró poca mejora de la unión al anticuerpo.

55 En un intento por vencer el fallo del enfoque de homología de VCI con la humanización de anticuerpos, se seleccionó una región estructural de VH humana diferente con una menor coincidencia de restos de VCI (17/22), pero homología global muy ligeramente mayor. El anticuerpo resultante proporcionó mayor unión que el anticuerpo "RHA", aunque esto no fue todavía tan grande como el anticuerpo 2C3 parental.

60 Con el fin de maximizar la unión y minimizar los restos no humanos que tienen el riesgo de provocar una respuesta de anticuerpos, se hicieron cambios en la región estructural y CDR adicionales. Se encontró que el anticuerpo resultante tenía unión potenciada en comparación con 2C3 y en una prueba *in vivo* de inhibición de la hipersensibilidad de las vías respiratorias se encontró que era significativamente más potente que 2C3. El anticuerpo también presentó buena termoestabilidad.

65 El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones y cualquier información que no se encuentre dentro de las reivindicaciones se proporciona para información solo.

La presente invención se refiere a la cadena de VH humanizada derivada de 2C3 para un anticuerpo que comprende

esta cadena. El anticuerpo puede comprender una cadena de VL humanizada que comprende las CDR VL de 2C3.

Así, en un aspecto, la invención proporciona un dominio VH de anticuerpo que comprende SEC ID N°: 1:

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
 Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser
 Phe Xa1 Xa2 Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 Gln Arg Leu Glu Trp Xa3 Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly
 Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu
 Thr Xa4 Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Asn
 Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 Glu Xa5 Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp
 5 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

en la que:

- 10 Xa1 es Ser o Thr;
 Xa2 es Gly, Asp, Ala, Ser, Val, Asn, Lys, Tyr o Met;
 Xa3 es Met o Ile;
 Xa4 es Val o Arg; y
 Xa5 es Asp, Asn o Gly, combinado con una cadena de VL que comprende las CDR VL de 2C3.

- 15 En un aspecto, los restos Xa1 - Xa5 pueden seleccionarse de las siguientes combinaciones:

- 20 Xa1 es Ser o Thr;
 Xa2 es Gly o Asp;
 Xa3 es Met o Ile;
 Xa4 es Val o Arg; y
 Xa5 es Asp, Asn o Gly.

En algunas realizaciones, Xa2 es Gly y Xa5 es Asp o Asn, preferentemente Asp.

- 25 En algunas realizaciones (incluyendo aquellas en las que Xa2 es Gly y Xa5 es Asp o Asn, preferentemente Asp), Xa1 es Ser.

- 30 En algunas realizaciones (incluyendo aquellas en las que Xa2 es Gly y Xa5 es Asp o Asn, preferentemente Asp), Xa1 es Thr.

- En algunas realizaciones, que incluyen todas las combinaciones anteriormente descritas de Xa2, Xa5 y Xa1, Xa3 es Met.

- 35 En algunas realizaciones, que incluyen todas las combinaciones anteriormente descritas de Xa2, Xa5 y Xa1, Xa3 es Ile.

Todas las realizaciones anteriormente descritas pueden combinarse con cualquiera de los valores de Xa4, es decir, Val o Arg.

- 40 Combinaciones particulares de los restos anteriores se exponen en la siguiente tabla. Por comodidad del lector experto y por coherencia con los ejemplos adjuntos, la tabla enumera la numeración de Kabat de los restos. En algunos casos, ésta se diferencia de la numeración del listado de secuencias.

Res de Kabat:	30	31	48	71	96
Posición en SEC ID N°: 1:	30	31	48	72	100
Res de la lista de sec:	Xa1	Xa2	Xa3	Xa4	Xa5
SEC ID N°: 2	Ser	Gly	Met	Val	Asp
SEC ID N°: 3	Thr	Gly	Met	Arg	Asp
SEC ID N°: 4	Ser	Gly	Met	Arg	Asp
SEC ID N°: 5	Thr	Gly	Met	Val	Asp
SEC ID N°: 6	Ser	Asp	Met	Val	Asp

SEC ID Nº: 7	Thr	Asp	Met	Arg	Asp
SEC ID Nº: 8	Thr	Asp	Met	Val	Asp
SEC ID Nº: 9	Ser	Gly	Ile	Val	Asp
SEC ID Nº: 10	Thr	Gly	Ile	Arg	Asp
SEC ID Nº: 11	Thr	Gly	Ile	Val	Asp
SEC ID Nº: 12	Ser	Asp	Ile	Val	Asp
SEC ID Nº: 13	Thr	Asp	Ile	Arg	Asp
SEC ID Nº: 14	Thr	Asp	Ile	Val	Asp

El dominio VH puede combinarse con un dominio variable de la cadena ligera para proporcionar un miembro de unión a diana específico que se une a IL-25.

5 Un dominio de la cadena ligera adecuado es uno que comprende los restos de CDR del anticuerpo 2C3. Preferentemente, la cadena ligera es una cadena ligera humanizada, es decir, comprende secuencias de la región estructural humana y las regiones CDR de 2C3. El dominio de la cadena ligera de 2C3 se muestra como SEC ID Nº: 15. Las regiones CDR 1-3 pueden comprender restos 30-34, por ejemplo, pueden comprender restos 24-34 (SEC ID Nº: 29); 50-56 (SEC ID Nº: 30) y 89-97 (SEC ID Nº: 31), respectivamente.

10 Los restos de CDR pueden estar en la cadena ligera del anticuerpo 2C3 nativo o pueden transferirse a una molécula de cadena ligera humanizada.

15 Los restos 35-38, aunque no comprenden la CDR, están muy conservados entre secuencias de cadena ligera de ratón y humana y también pueden transferirse.

20 Un ejemplo de una cadena de VL humanizada comprende los restos 21-127 de SEC ID Nº: 25. Sin embargo, también pueden usarse otras regiones estructurales humanas que comprenden las tres regiones CDR de la SEC ID Nº: 15. Además, como se indica más adelante, pueden usarse secuencias conductoras de anticuerpos diferentes a la secuencia conductora de anticuerpo no nativo de una cadena de VL. Por tanto, en una realización, la cadena de VL comprende la SEC ID Nº: 25. En otra realización, la cadena de VL puede comprender una secuencia conductora de anticuerpo tal como la descrita en el presente documento más adelante fusionada a los restos 21-127 de la SEC ID Nº: 25.

25 La invención proporciona además el uso de miembros de unión a diana de la invención, por ejemplo, en forma de una composición farmacéutica, para el tratamiento de enfermedades, incluyendo afecciones inflamatorias tales como asma (incluyendo asma alérgica), enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.

30 Estos y otros aspectos adicionales de la invención se describen con mayor detalle más adelante y con referencia a los ejemplos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

35 La Figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera kappa (SEC ID Nº: 16) y de aminoácidos (SEC ID Nº: 15) del anticuerpo de ratón 2c3. El sombreado indica las CDR.

La Figura 2 muestra la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada (SEC ID Nº: 18) y de aminoácidos (SEC ID Nº: 17) del anticuerpo de ratón 2c3. El sombreado indica las CDR.

La Figura 3 muestra la secuencia de ADN (SEC ID Nº: 20) y de aminoácidos (SEC ID Nº: 19) de AY393094.

40 La Figura 4 muestra la secuencia de ADN (SEC ID Nº: 22) y de aminoácidos (SEC ID Nº: 21) de RHA de 2c3 humanizado.

La Figura 5 muestra la secuencia de ADN (SEC ID Nº: 24) y de aminoácidos (SEC ID Nº: 23) de AY510106.

La Figura 6 muestra la secuencia de ADN (SEC ID Nº: 26) y de aminoácidos (SEC ID Nº: 25) de la cadena ligera kappa humanizada de RKA de 2c3.

45 Las Figuras 7A-C muestran una comparación de la actividad de unión del anticuerpo humanizado RHA/RKA 2c3 y variantes con 2c3 quimérico.

La Figura 8 muestra la secuencia de ADN (SEC ID Nº: 28) y de aminoácidos (SEC ID Nº: 27) de la región estructural AJ399823 usada en el diseño de 2c3-RH2 humanizado.

Las Figuras 9A y B muestran el efecto de mutaciones de CDR específicas a RH2bcdef de 2c3 que se une a IL-25.

50 La Figura 10 muestra el efecto de la unión de IL-25 combinando mutaciones de CDR D31G y G96D.

La Figura 11 muestra la comparación de la unión de RH2.5_S30T de 2c3 y RH2.5_R71V de 2c3 a IL-25.

La Figura 12 es el protocolo para el modelo de ratón *in vivo* de HVR.

Las Figuras 13A y B muestran el efecto de administrar RH2.5_R71V de 2c3 sobre la resistencia pulmonar en respuesta a metacolina.

55 Las Figuras 14A y B muestran la longitud del colon y peso corporal de ratones en un modelo de colitis.

Descripción detallada de la invención

Miembro de unión a diana

5 Éste describe un miembro de un par de moléculas que tienen especificidad de unión entre sí. Los miembros de un par de unión específico pueden derivarse naturalmente o producirse sintéticamente completa o parcialmente. Un miembro del par de moléculas tiene una zona sobre su superficie, o una cavidad, que se une específicamente a y, por tanto, es complementaria a una organización espacial y polar particular del otro miembro del par de moléculas. Por tanto, los miembros del par tienen la propiedad de unirse específicamente entre sí. Ejemplos de tipos de pares de unión específicos son antígeno-anticuerpo, biotina-avidina, hormona-receptor de hormona, receptor-ligando y enzima-sustrato.

15 La presente solicitud se refiere a las reacciones de tipo antígeno-anticuerpo. Por consiguiente, un miembro de unión a diana de la invención comprenderá al menos una parte de una molécula de anticuerpo, más particularmente al menos una parte del dominio de unión al antígeno de una molécula tal.

En general, la región variable de la cadena pesada (dominio VH) de un anticuerpo desempeña una función significativa en la unión de un anticuerpo a un antígeno. Por tanto, los miembros de unión a diana de la invención se basan, por lo tanto, en aquellos que comprenden el dominio VH que incluye SEC ID N°: 1.

20 Para preparar los dominios de VH de la presente invención, se encontró que las regiones CDR del anticuerpo 2C3 mejoraban alterando las secuencias de CDR1 y CDR3. Por consiguiente, aunque las realizaciones preferidas de la invención descritas en el presente documento contemplan dominios de VH de la SEC ID N°: 1 en los que Xa2 es Gly y Xa5 es Asp, la invención también contempla dominios de VH humanizados que tienen regiones estructurales humanas que incluyen las regiones CDR1-3 de SEC ID N°: 34, SEC ID N°: 35 y SEC ID N°: 36 respectivamente.

25 Así, en otros aspectos adicionales, la invención proporciona un miembro de unión a diana que se une a IL-25 en la que la región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada H1 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 34. En otro aspecto, la invención proporciona un miembro de unión a diana que se une a IL-25 en la que la región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada H2 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 35. En otro aspecto, la invención proporciona un miembro de unión a diana que se une a IL-25 en la que la región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada H3 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 36.

30 En un aspecto adicional, la invención proporciona un miembro de unión a diana que se une a IL-25 en la que la región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena ligera L1 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 29. En otro aspecto, la invención proporciona un miembro de unión a diana que se une a IL-25 en la que la región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena ligera L2 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 30. En otro aspecto, la invención proporciona un miembro de unión a diana que se une a IL-25 en la que la región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena ligera L3 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 31.

35 En un aspecto adicional, la invención proporciona un miembro de unión a diana que se une a IL-25 en la que la región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada H1 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 34, la CDR de la cadena pesada H2 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 35 y la CDR de la cadena pesada H3 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 36. En una realización, un miembro de unión a diana tal tiene una CDR de la cadena ligera L1 con una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 29, una CDR de la cadena ligera L2 de SEC ID N°: 30 y una CDR de la cadena ligera L3 de SEC ID N°: 31.

40 La región estructural de tales miembros de unión a diana puede ser únicamente humana, únicamente murina o, según la presente invención, una región estructural que es principalmente humana, pero que retiene uno o más restos murinos de manera que se potencie la afinidad de unión.

45 Así, los miembros de unión a diana que comprenden dichas CDR forman un aspecto adicional de la invención y pueden usarse como se describe en el presente documento para miembros de unión a diana con un dominio VH que comprende SEC ID N°: 1.

50 Generalmente, un miembro de unión a diana comprende un dominio VH emparejado con un dominio VL para proporcionar un dominio de unión anticuerpo-antígeno. En una realización, el dominio VH está emparejado con un dominio VL cuyas CDR y, opcionalmente cualquier resto de la región estructural conservado entre humano y ratón, son los del anticuerpo 2C3.

55 Sin embargo, la promiscuidad de la cadena ligera está bien establecida en la técnica, como se ha descrito adicionalmente en el presente documento y, por tanto, VH puede emparejarse con un dominio VL diferente al VL derivado de 2C3. Un VL tal puede seleccionarse como se trata más adelante en el presente documento.

60 Las estructuras y localizaciones de los dominios variables de inmunoglobulina pueden determinarse por referencia a

Kabat, E.A. et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest. 4ª edición. US Department of Health and Human Services. 1987, y actualizaciones de la misma. En línea se dispone de varias fuentes académicas y comerciales para consultar esta base de datos. Por ejemplo, véase A.C.R. Accessing the Kabat Antibody Sequence Database by Computer PROTEINS: Structure, Function and Genetics, 25 (1996), 130-133.

5 Un miembro de unión a diana según la presente invención puede unirse a IL-25 con una afinidad sustancialmente similar a la del anticuerpo RHA2.5 R71V2 descrito más adelante, por ejemplo + 10 %. Un miembro de unión a diana generalmente será específico para IL-25. Por tanto, el miembro de unión a diana no mostrará ninguna unión significativa a moléculas distintas de su(s) componente(s) de unión específica. Por ejemplo, se ha encontrado que el
10 anticuerpo 2C3, del cual se derivan los anticuerpos de la invención, no reacciona de manera cruzada con IL-4, IL-5 e IL-13 y, por tanto, la anulación de tal reactividad cruzada con otras citocinas implicadas en el asma y procesos similares es una característica deseable de los miembros de unión a diana de la invención.

15 Normalmente, la especificidad puede determinarse mediante un ensayo de unión tal como ELISA que emplea un panel de antígenos. Un miembro de unión a diana según la presente invención puede reconocer IL-25 y ningún otro miembro de la familia IL-17, particularmente ninguno de IL-17A, IL-17B e IL-17C; más preferentemente los tres IL-17A, IL-17B e IL-17C. La unión de un miembro de unión a diana según la invención con IL-25 puede anularse por competición con IL-25 recombinante.

20 La afinidad de unión y la fuerza de neutralización de diferentes miembros de unión a diana pueden compararse en condiciones apropiadas.

Molécula de anticuerpo

25 Éste describe una inmunoglobulina tanto natural como producida parcial o completamente sintética. Se ha mostrado que los fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de antígenos de unión. Por tanto, la referencia a un anticuerpo también engloba cualquier polipéptido o proteína que comprenda un fragmento de unión a anticuerpo.

30 Ejemplos de fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un anticuerpo único; (iv) el fragmento dAb (Ward, E.S. et al., Nature 341, 544-546 (1989)) que consiste en un dominio VH; (v) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos; (vi)
35 moléculas Fv monocatenarias (scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL están unidos por un conector de péptidos que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a antígeno (Bird et al, Science, 242, 423-426, 1988; Huston et al, PNAS USA, 85, 5879-5883, 1988); (vii) dímeros Fv monocatenarios biespecíficos (documento PCT/US92/09965) y (viii) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por fusión génica (documento WO94/13804; P. Holliger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448, 1993). Las moléculas de Fv, scFv o diacuerpo pueden establecerse por la incorporación de puentes disulfuro que unen los
40 dominios VH y VL (Y. Reiter et al, Nature Biotech, 14, 1239-1245, 1996). También pueden prepararse minicuerpos que comprenden un scFv unido a un dominio CH3 (S. Hu et al, Cancer Res., 56, 3055-3061, 1996).

45 Cuando se usan anticuerpos biespecíficos, éstos pueden ser anticuerpos biespecíficos convencionales, que pueden prepararse de diversas maneras (Holliger, P. y Winter G. Current Opinion Biotechnol. 4, 446-449 (1993)), por ejemplo, prepararse químicamente o a partir de hibridomas híbridos o pueden ser cualquiera de los fragmentos de anticuerpo biespecíficos mencionados anteriormente. Los diacuerpos y scFv pueden construirse sin ninguna región Fc, usando únicamente dominios variables, reduciendo posiblemente los efectos de reacción anti-idiotípica.

50 Los diacuerpos biespecíficos, a diferencia de los anticuerpos completos biespecíficos, también pueden ser particularmente útiles debido a que pueden construirse fácilmente y expresarse en *E. coli*. Los diacuerpos (y muchos otros polipéptidos tales como fragmentos de anticuerpos) de especificidades de unión apropiadas pueden seleccionarse fácilmente usando expresión en fago (documento WO94/13804) a partir de bibliotecas. Si un brazo del anticuerpo se mantiene constante, por ejemplo, con una especificidad dirigida contra IL-25, entonces puede prepararse una biblioteca en la que se varía el otro brazo y se selecciona un anticuerpo de especificidad apropiada.
55 Pueden prepararse anticuerpos completos biespecíficos por ingeniería de botón en ojal (J. B. B. Ridgeway et al, Protein Eng., 9, 616-621, 1996).

60 Es posible tomar anticuerpos monoclonales y otros y usar técnicas de tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que retienen la especificidad del anticuerpo original. Tales técnicas pueden implicar introducir ADN que codifica la región variable de inmunoglobulina, o las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), de un anticuerpo en las regiones constantes o regiones constantes más regiones estructurales, de una inmunoglobulina diferente. Véanse, por ejemplo, los documentos EP-A-184187, GB 2188638A o EP-A-239400.

65 Preferentemente, las regiones CDR de la cadena de VL de 2C3 se injertan en una región estructural humana. La región estructural humana puede seleccionarse por diversos métodos, por ejemplo, comparando las secuencias de

la región estructural de ratón o de la región VL de ratón con secuencias de la región estructural humana o de la región VL conocidas y seleccionando una región estructural humana que tenga el mayor grado de similitud o de identidad de aminoácidos o uno de los mayores. Pueden hacerse modificaciones en las regiones estructurales de secuencias humanas nativas con el fin de optimizar adicionalmente los anticuerpos con CDR injertada resultantes.

5 Aunque en un aspecto preferido de la invención se prefieren moléculas de anticuerpo que comprendan un par de dominios VH y VL, los dominios de unión únicos basados en secuencias de dominio VH o VL forman aspectos adicionales de la invención. Se sabe que los dominios de inmunoglobulina únicos, especialmente dominios VH, pueden unir antígenos diana de una manera específica.

10 En el caso de cualquiera de los dominios de unión de cadena única, estos dominios pueden usarse para cribar dominios complementarios capaces de formar un miembro de unión a diana de dos dominios capaz de unirse a IL-25, como se trata adicionalmente en el presente documento más adelante.

15 Las moléculas de anticuerpo de la presente invención pueden comprender adicionalmente regiones constantes de anticuerpo o partes de las mismas. Por ejemplo, un dominio VL puede unirse en su extremo C a los dominios constantes de la cadena ligera de anticuerpo incluyendo cadenas C κ o C λ humanas, preferentemente C κ . Similarmente, un miembro de unión a diana basado en un dominio VH puede unirse en su extremo C a toda o parte de una cadena pesada de inmunoglobulina derivada de cualquier isotipo de anticuerpo, por ejemplo, IgG, IgA, IgE e IgM y cualquiera de las subclases de isotipo, particularmente IgG1 e IgG4. Se prefiere IgG4. Pueden emplearse regiones Fc tales como Δ nab y Δ nac, como se desvela en el documento WO99/58572.

20 Por tanto, se incluyen moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión a diana, o equivalente, fusionado a otro polipéptido. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describen en los documentos EP-A-0120694 y EP-A-0125023.

25 Las regiones estructurales de las moléculas de anticuerpo de la invención también pueden incluir secuencias de glucosilación que incluyen uno o más sitios de glucosilación. Dependiendo de la célula huésped en la que se expresa el miembro de unión a diana, puede variar el patrón de glucosilación. Por tanto, las construcciones de ácido nucleico que codifican sitios de glucosilación pueden modificarse para eliminar el sitio o alternativamente tales sitios pueden introducirse en la proteína. Por ejemplo, los sitios de N-glucosilación en proteínas eucariotas se caracterizan por un triplete de aminoácidos Asn-X-Y, en el que X es cualquier aminoácido, excepto Pro e Y es Ser o Thr. Sustituciones, adiciones o deleciones apropiadas de la secuencia de nucleótidos que codifica estos tripletes dará como resultado la prevención de la unión de restos de hidratos de carbono en la cadena lateral de Asn. La alteración de un único nucleótido, seleccionado de manera que Asn se sustituya con un aminoácido diferente, por ejemplo, es suficiente para inactivar un sitio de N-glucosilación. Procedimientos conocidos para inactivar sitios de N-glucosilación en proteínas incluyen aquellos descritos en la patente de EE.UU. nº 5.071.972 y en el documento EP 276.846.

40 Dominio de unión a antígeno.

Ésta describe la parte de una molécula de anticuerpo que comprende el área que se une específicamente a y es complementaria a parte o todo un antígeno. Cuando el antígeno es grande, un anticuerpo puede unirse únicamente a una parte particular del antígeno, parte que se denomina un epítotope. Puede proporcionarse un dominio de unión a antígeno mediante uno o más dominios variables de anticuerpo (por ejemplo, un fragmento de anticuerpo denominado Fd que consiste en un dominio VH). Preferentemente, un dominio de unión a antígeno comprende al menos una porción sustancial de una región variable de la cadena ligera de anticuerpo (VL) y al menos una porción sustancial de una región variable de la cadena pesada de anticuerpo (VH).

50 Una porción sustancial de un dominio variable de inmunoglobulina comprenderá al menos las tres regiones CDR, junto con sus regiones estructurales intermedias. Preferentemente, la porción también incluirá al menos aproximadamente el 50 % de una o ambas de las primera y cuarta regiones estructurales, siendo el 50 % el 50 % del extremo C de la primera región estructural y el 50 % del extremo N de la cuarta región estructural. Restos adicionales en el extremo N o C de la parte sustancial del dominio variable pueden ser aquellos que no están normalmente asociados con regiones de dominio variable que se producen naturalmente. Por ejemplo, la construcción de miembros de unión a diana de la presente invención preparados mediante técnicas de ADN recombinante puede dar como resultado la introducción de restos del extremo N o C codificados por conectores introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación. Otras etapas de manipulación incluyen la introducción de conectores para unir dominios variables de la invención a secuencias de proteínas adicionales que incluyen cadenas pesadas de inmunoglobulina, otros dominios variables (por ejemplo, en la producción de diacuerpos) o marcadores de proteína como se trata con más detalle más adelante.

Comprende

65 Éste se usa generalmente en el sentido de incluir, es decir, permitir la presencia de una o más características o componentes.

Aislado

5 Éste se refiere al estado en el que los dominios VH, miembros de unión a diana de la invención o ácidos nucleicos que codifican tales miembros de unión, estarán generalmente según la presente invención. Los miembros y ácido nucleico estarán libres o sustancialmente libres de material con el que están naturalmente asociados tales como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los que se encuentran en su entorno natural o el entorno en el que se preparan (por ejemplo, cultivo celular) cuando tal preparación es por tecnología de ADN recombinante realizada *in vitro* o *in vivo*.

10 Los miembros de unión a diana y ácido nucleico pueden formularse con diluyentes o adyuvantes y aún aislarse con fines prácticos - por ejemplo, los miembros se mezclarán normalmente con gelatina u otros vehículos si se usan para recubrir placas de microtitulación para uso en inmunoensayos o se mezclarán con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables cuando se usen en diagnóstico o terapia. Los miembros de unión a diana pueden estar glucosilados, tanto naturalmente como mediante sistemas de células eucariotas heterólogas (por ejemplo, 15 células CHO o NS0 (ECACC 85110503) o pueden estar sin glucosilar (por ejemplo, si se producen por expresión en una célula procariota).

Características adicionales de miembros de unión a diana.

20 Además de las secuencias de anticuerpos, un miembro de unión a diana según la presente invención puede comprender otros aminoácidos, por ejemplo, formando un péptido o polipéptido, tal como un dominio plegado o para impartir a la molécula otra característica funcional adicional a la capacidad de unirse a antígeno. Los miembros de unión a diana de la invención pueden llevar un marcador detectable o pueden conjugarse con una toxina o enzima (por ejemplo, mediante un enlace o conector peptídico).

25 Marcadores detectables incluyen radiomarcadores tales como ¹³¹I o ⁹⁹Tc, que pueden unirse a los anticuerpos de la invención usando química convencional conocida en la técnica de obtención de imágenes de anticuerpos. Los marcadores también incluyen marcadores enzimáticos tales como peroxidasa de rábano picante. Los marcadores también incluyen restos químicos tales como biotina que pueden detectarse a través de la unión a un resto 30 detectable análogo específico, por ejemplo, avidina marcada.

35 Cuando la característica adicional es un dominio polipeptídico o marcador, el miembro de unión a diana puede producirse por técnicas recombinantes, es decir, por la expresión de un ácido nucleico que codifica una fusión del miembro de unión a diana y el dominio adicional.

Barajado de cadenas

40 Un aspecto adicional de la invención proporciona un método para obtener un dominio de unión anticuerpo-antígeno para IL-25, comprendiendo el método proporcionar la combinación de un dominio VH de un miembro de unión a diana de la invención con uno o más dominios VL y probar la combinación o combinaciones de VH/VL para el dominio de unión anticuerpo-antígeno para IL-25.

45 Dicho dominio VL puede tener una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente como se ha expuesto en el presente documento.

Puede emplearse un método análogo en el que una o más variantes de secuencia de un dominio VL desvelado en el presente documento se combinan con uno o más dominios VH.

50 Esto puede conseguirse por métodos de cribado por expresión en fago usando el denominado enfoque combinatorio doble jerárquico como se desvela en el documento WO92/01047 en el que se usa una colonia individual que contiene tanto un clon de la cadena H como L para infectar una biblioteca completa de clones que codifican la otra cadena (L o H) y el miembro de unión a diana de dos cadenas resultante se selecciona según técnicas de expresión en fago tales como las descritas en esa referencia.

55 Por tanto, la presente invención proporciona un método para seleccionar una molécula de anticuerpo para IL-25, comprendiendo el método:

- 60 (a) proporcionar un dominio VH que comprende un miembro de unión a diana que se une a IL-25 y que comprende un dominio VH de anticuerpo de la presente invención;
- (b) combinar dicho dominio VH con una pluralidad de dominios VL de anticuerpo para proporcionar moléculas de anticuerpo;
- (c) cribar dichas moléculas de anticuerpo para la unión a IL-25; y
- (d) seleccionar una molécula de anticuerpo que se une a IL-25.

65 En tal método, los dominios VH y VL pueden proporcionarse en forma de proteínas expresadas por ADN recombinante, particularmente mediante un ADN de fago o fagémido.

La pluralidad de dominios VL puede ser cualquiera de 104 dominios individuales hacia arriba, por ejemplo, de 106 a 108 ó 1010 dominios.

5 Las moléculas de anticuerpo, y ácido nucleico que codifica dichas moléculas, pueden formar una parte adicional de la presente invención.

IL-25

10 IL-25, también denominado en la técnica IL-17E, está disponible de fuentes comerciales (por ejemplo R&D Systems, MN, EEUU) o puede clonarse o sintetizarse por referencia a las secuencias de IL-25 disponibles en la técnica. La IL-25 murina (proteína NCBI NP_542767) se describe por Hurst et al, 2002 (Ref. 7 más adelante). La IL-25 humana (proteína NCBI Q9H293) se describe por Fort et al. (Ref. 4 más adelante). Para la producción de anticuerpos o uso en inmunoensayos, pueden usarse fragmentos de IL-25 recombinante, particularmente los truncados en el extremo N. Por ejemplo, la IL-25 humana recombinante comercialmente disponible (IL-17E) comprende la secuencia de
15 proteína madura de Tyr 33 - Gly 177 de nº de acceso Q9H293) y la IL-25 murina comercialmente disponible comprende los restos Val 17 - Ala 169 de IL-17E de ratón (nº de Acceso NP_542767).

Ácidos nucleicos y vectores

20 En aspectos adicionales, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un miembro de unión a diana, un dominio VH o un dominio VL según la presente invención, y métodos para preparar un miembro de unión a diana, un dominio VH o un dominio VL de la invención, que comprende expresar dicho ácido nucleico en condiciones para provocar la producción de dicho miembro de unión a diana, dominio VH o dominio VL y recuperarlo.

25 Los ácidos nucleicos de la invención pueden comprender las secuencias o porciones relevantes de las mismas (por ejemplo, regiones que codifican CDR) de SEC ID Nº: 40 (para cadenas pesadas) o SEC ID Nº: 26 (para cadenas ligeras), o variantes de estas secuencias modificadas mediante, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio para codificar otros dominios VH y VL de la invención. Adicionalmente, puede variarse el uso de codón, por ejemplo, para
30 optimizar la expresión de la secuencia en una célula huésped deseada.

La presente invención proporciona además un ácido nucleico aislado que codifica un miembro de unión a diana de la presente invención. El ácido nucleico incluye ADN y ARN.

35 El ácido nucleico según la presente invención puede comprender ADN o ARN y puede ser completa o parcialmente sintético. Referencia a una secuencia de nucleótidos, como se expone en el presente documento, incluye una molécula de ADN con la secuencia especificada y engloba una molécula de ARN con la secuencia especificada en la que U se sustituye por T, a menos que el contexto requiera otra cosa.

40 La presente invención también proporciona vectores, por ejemplo, en forma de plásmidos, virus, por ejemplo, fago o fagémido, cósmidos, casetes de transcripción o expresión que comprenden al menos un ácido nucleico como antes.

45 Pueden elegirse o construirse vectores adecuados que contengan secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según sea apropiado. Para detalles adicionales véase, por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2ª edición, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

50 Los vectores de la invención también incluyen vectores virales que pueden infectar células humanas *in vivo*, por ejemplo, vectores adenovirales, retrovirales o de virus adeno-asociados. Tales vectores pueden ser útiles para la expresión de un miembro de unión a diana de la invención en las células de un sujeto humano o animal, para proporcionar la producción y administración del miembro de unión a diana a dicho sujeto.

55 Una secuencia de ácido nucleico que codifica un miembro de unión a diana de la invención, en un aspecto, estará operativamente ligada a un promotor para efectuar la expresión del miembro de unión a diana en una célula huésped. La secuencia puede incluir en su extremo 5' una secuencia conductora para facilitar la expresión y/o secreción del miembro de unión a diana en y/o a partir de una célula huésped. Se conocen numerosas secuencias conductoras adecuadas como tales en la técnica y pueden seleccionarse por un experto en la materia teniendo en cuenta la célula huésped.

60 Secuencias conductoras adecuadas incluyen cualquier secuencia conductora de inmunoglobulina humana o de otro mamífero, aunque en su lugar podría usarse una secuencia conductora de mamífero de no inmunoglobulina o una secuencia conductora sintética. Preferentemente para la expresión de una cadena de VH se usa una secuencia conductora VH humana. Preferentemente para la expresión de una cadena de VL se usa una secuencia conductora VL humana.

65 Una secuencia conductora adecuada para la expresión de un dominio VH de la invención es:

MGSTAILGLLLAVLQGVCA (SEC ID N°: 37).

Una secuencia conductora adecuada para la expresión de un dominio VL de la invención es una secuencia conductora VK humana o murina. Una secuencia tal puede ser la secuencia conductora de 2C3:

5 MRVPAQLLGLLLLWLPDTRC (SEC ID N°: 38) o un homólogo humano, tal como
MDMRVPAQLLGLLLLWLPDTRC (SEC ID N°: 39).

10 En los ejemplos adjuntos los presentes inventores han usado construcciones de expresión que incluyen un sitio HindIII y una secuencia de Kozak consenso (AAGCTTGCCGCCACC, SEC ID N°: 41) que precede a la secuencia codificante que comienza con una secuencia conductora de anticuerpo. Esto es adecuado para la expresión de dominios de anticuerpo en células huésped de mamíferos. Sin embargo, pueden usarse otras construcciones dependiendo de la preferencia de quien realiza el experimento y de la célula huésped en la que va a expresarse el dominio de anticuerpo.

15 Muchas técnicas y protocolos conocidos de manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo, en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas, se describen con detalle en *Current Protocols in Molecular Biology*, segunda edición, Ausubel *et al.* eds., John Wiley & Sons, 1992. Las divulgaciones de Sambrook *et al.* y Ausubel *et al.* se incorporan en el presente documento por referencia.

Células huésped y producción de miembros de unión a diana

25 Un aspecto adicional proporciona una célula huésped transformada con un ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico en forma de un vector) de la invención.

30 En una realización, el ácido nucleico de la invención se integra en el genoma (por ejemplo, cromosoma) de la célula huésped. La integración puede promoverse por la inclusión de secuencias que promueven la recombinación con el genoma, según técnicas convencionales.

Otro aspecto adicional proporciona un método de producción de un miembro de unión a diana de la invención, incluyendo el método provocar la expresión del ácido nucleico codificante. Un método tal puede comprender cultivar células huésped en condiciones para la producción de dicho miembro de unión a diana.

35 Tras la producción mediante expresión puede aislarse y/o purificarse un dominio VH o VL o miembros de unión a diana usando cualquier técnica adecuada, usándose entonces según sea apropiado. Un método de producción puede comprender una etapa de aislamiento y/o de purificación del producto.

40 Tras la purificación del producto, el miembro de unión a diana puede modificarse por medios físicos o químicos, por ejemplo, para introducir grupos protectores que alteren, por ejemplo que aumenten, la estabilidad o semivida biológica de la proteína. Por ejemplo, la PEGilación de proteínas para conseguir tales efectos se conoce como tal en la técnica y los miembros de unión a diana de la invención pueden estar en forma PEGilada.

45 Un método de producción puede comprender formular el producto en una composición que incluye al menos un componente adicional, tal como un excipiente farmacéuticamente aceptable.

50 La presente invención también proporciona una célula huésped recombinante que comprende uno o más ácidos nucleicos o vectores como antes. Un ácido nucleico que codifica cualquier CDR, dominio VH o VL o miembro de unión a diana como se proporciona por sí mismo forma un aspecto de la presente invención al igual que un método de producción del producto codificado, cuyo método comprende la expresión a partir de ácido nucleico codificante para esto.

55 Se conocen bien sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en diversas células huésped diferentes. Células huésped adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, levadura y sistemas de baculovirus. Las líneas de células de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster Chino, células HeLa, células de riñón de hámster recién nacido, células de melanoma de ratón NS0, células de mieloma de rata YB2/0 y muchas otras. Un huésped bacteriano preferido común es *E. coli*.

60 La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo en células procariotas tales como *E. coli* está bien establecida en la técnica. Para una revisión véase, por ejemplo, Plückthun, A. *Bio/Technology* 9: 545-551 (1991). La expresión en células eucariotas en cultivo también está disponible para los expertos en la materia como una opción para la producción de un miembro de unión a diana, véanse para revisiones recientes, por ejemplo, Ref, M.E. (1993) *Curr. Opinion Biotech.* 4: 573-576; Trill J.J. et al. (1995) *Curr. Opinion Biotech* 6: 553-560.

65 Composiciones

Así, las composiciones farmacéuticas según la presente invención y para su uso según la presente invención pueden comprender, además del principio activo, un excipiente, vehículo, tampón, estabilizador farmacéuticamente aceptable u otros materiales bien conocidos por los expertos en la materia. Tales materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza exacta del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser oral, o mediante inyección, por ejemplo, intravenosa.

Pueden prepararse formulaciones terapéuticas del miembro de unión a diana para almacenamiento mezclando el miembro de unión a diana, que tiene el grado deseado de pureza, con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables opcionales (véase, por ejemplo, "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20^a Edition, 2000, pub. Lippincott, Williams & Wilkins), en forma de polvo liofilizado o soluciones acuosas. Vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como Tween, Pluronic o polietilenglicol (PEG).

Para usar el miembro de unión a diana para la administración *in vivo* éste debe ser estéril. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles, antes de o tras la liofilización y reconstitución. El miembro de unión a diana normalmente se almacenará en forma liofilizada o en solución.

Las composiciones farmacéuticas para administración por vía oral pueden estar en forma de comprimido, cápsula, polvo o líquido. Un comprimido puede comprender un vehículo sólido tal como gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente comprenden un vehículo líquido tal como agua, vaselina, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Pueden incluirse solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles tales como etilenglicol, polipropilenglicol o polietilenglicol.

Para inyección intravenosa o inyección en el sitio de afección, el principio activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógenos y tiene pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la materia pueden preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro de Sodio, inyección de solución de Ringer e inyección de Ringer con lactato. Pueden incluirse, según se requiera, conservantes, estabilizadores, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos.

Usos terapéuticos de la invención

La presente invención proporciona por primera vez una demostración de que los anticuerpos contra IL-25 son eficaces para prevenir o reducir la hipersensibilidad de las vías respiratorias *in vivo*, un síntoma clave del asma. Así, se desvela un método para prevenir o reducir la hipersensibilidad de las vías respiratorias en un sujeto (por ejemplo, un ser humano) en necesidad de tratamiento que comprende administrar al sujeto un miembro de unión a diana, particularmente una molécula de anticuerpo, que se une a IL-25. Además, se desvela un método para prevenir, reducir o tratar asma en un sujeto en necesidad de tratamiento que comprende administrar al sujeto un miembro de unión a diana, particularmente una molécula de anticuerpo, que se une a IL-25. El asma incluye asma alérgica.

Los métodos anteriores pueden ponerse en práctica con miembros de unión a diana (incluyendo composiciones de los mismos) según la presente invención, que son útiles para unirse a y preferentemente antagonizar la acción de IL-25, con potencial terapéutico en diversas enfermedades y trastornos en los que IL-25 desempeña una función. Además del asma, tales enfermedades incluyen otras afecciones asociadas a la inflamación, tales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. Los métodos también pueden ponerse en práctica con otros miembros de unión a diana (incluyendo composiciones de los mismos) que se unen a IL-25 que pueden obtenerse como se ha descrito más adelante en los ejemplos adjuntos.

Los miembros de unión a diana (incluyendo composiciones de los mismos) según la invención pueden usarse en un método de tratamiento (incluyendo tratamiento profiláctico) o diagnóstico en un sujeto humano o animal. Un método de tratamiento tal o diagnóstico (que puede incluir tratamiento profiláctico) puede comprender administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un miembro de unión a diana de la invención. Enfermedades y trastornos a modo de ejemplo se tratan adicionalmente más adelante.

También se proporciona el uso de un miembro de unión a diana (incluyendo una composición del mismo) de la invención en la fabricación de un medicamento para administración a un sujeto humano o animal.

Las indicaciones clínicas en las que puede usarse un miembro de unión a diana anti-IL25 para proporcionar beneficio terapéutico incluyen cualquier afección en la que IL-25 tenga consecuencias patológicas. Así, en general, el miembro de unión a diana de la invención puede usarse en el tratamiento de cualquier afección asociada a una respuesta Th2 no deseada o respuestas de tipo 2. Por ejemplo, el miembro de unión a diana de la invención puede

usarse para el tratamiento de alergia y asma, particularmente asma.

El tratamiento anti-IL-25 puede administrarse mediante inyección (por ejemplo, intravenosamente) o mediante métodos de administración local. Anti-IL25 puede administrarse mediante tecnologías mediadas por genes.

- 5 Estrategias de formulación alternativas pueden proporcionar preparaciones adecuadas para la vía oral o de supositorio. La vía de administración puede determinarse por las características fisicoquímicas del tratamiento, mediante consideraciones especiales para la enfermedad, para optimizar la eficacia o para minimizar los efectos secundarios.
- 10 Según la presente invención, las composiciones proporcionadas pueden administrarse a individuos. La administración es preferentemente en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo ésta suficiente para mostrar beneficio a un paciente. Tal beneficio puede ser al menos la mejora de al menos un síntoma. La cantidad real administrada y la tasa y el transcurso de tiempo de administración dependerán de la naturaleza y gravedad de lo que se esté tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre la dosificación, etc., está dentro de
- 15 la responsabilidad de los médicos generales y otros doctores en medicina. Las dosis apropiadas de anticuerpo se conocen bien en la técnica; véanse Ledermann J.A. et al. (1991) *Int. J. Cancer* 47: 659-664; Bagshawe K.D. et al. (1991) *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals* 4: 915-922.

- 20 La dosis exacta dependerá de varios factores, incluyendo si el anticuerpo es para diagnóstico o para tratamiento, el tamaño y la localización del área que va a tratarse, la naturaleza exacta del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo completo, fragmento o diacuerpo) y la naturaleza de cualquier marcador detectable u otra molécula unida al anticuerpo. Una dosis de anticuerpo típica estará en el intervalo 0,5 mg - 1,0 g y ésta puede administrarse intravenosamente como un bolo o como una infusión a lo largo de varias horas según sea apropiado para conseguir la dosis necesaria. Otros modos de administración incluyen infusión intravenosa durante varias horas, para
- 25 conseguir una dosis acumulada total similar. Ésta es una dosis para un único tratamiento de un paciente adulto, que puede ajustarse proporcionalmente para niños y lactantes y también ajustarse para otros formatos de anticuerpo en proporción al peso molecular. Los tratamientos pueden repetirse diariamente, dos veces a la semana, semanalmente o a intervalos mensuales, según el criterio del médico.

- 30 Un modo de administración adicional emplea el recubrimiento previo de, o de otra manera, la incorporación en, dispositivos permanentes, para los que la cantidad óptima de anticuerpo se determinará por medio de experimentos apropiados.

- 35 En algunas realizaciones preferidas de la invención, una molécula de anticuerpo es un fragmento monomérico, tal como F(ab) o scFv. Tales fragmentos de anticuerpo pueden tener la ventaja de una semivida relativamente corta y menos riesgo de activación plaquetaria, lo cual puede producirse por la agregación de receptor. La agregación que da lugar a la activación plaquetaria podría ser tanto de moléculas IL-25 como de moléculas IL-25 con FcγRII, por ejemplo.

- 40 Si se usa un anticuerpo completo, éste está preferentemente en una forma que es incapaz de activar y/o destruir plaquetas. El isotipo IgG4 o alternativamente los isotipos de "diseñador" derivados del esqueleto de IgG1 (construcciones génicas de Fc novedosas del documento WO99/58572, Clark, Armour, Williamson) son opciones preferidas. Pueden usarse fragmentos de anticuerpos más pequeños, tales como F(ab')₂. Adicionalmente, pueden usarse anticuerpos completos o fragmentos (por ejemplo, F(ab')₂ o diacuerpos) con doble especificidad epitópica (por
- 45 ejemplo, por los epítopes reconocidos por scFv 2C3). Aunque una realización tal puede promover la agregación de receptor, una alta tasa de asociación con respecto a los receptores individuales puede descartar este problema.

- 50 Los miembros de unión a diana de la presente invención normalmente se administrarán en forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además del miembro de unión a diana.

- Un miembro de unión a diana de la invención puede administrarse solo o en combinación con otros tratamientos, tanto simultáneamente como secuencialmente dependiendo de la afección que va a tratarse. Otros tratamientos pueden incluir la administración de dosis adecuadas de fármacos analgésicos tales como fármacos antiinflamatorios no esteroideos (por ejemplo, aspirina, paracetamol, ibuprofeno o ketoprofeno) u opiáceos tales como morfina; la
- 55 administración de anti-eméticos; o la administración de al menos otro compuesto activo contra el asma, generalmente un agente broncodilatador que produce relajación de las vías respiratorias o potencia la eliminación de moco, por ejemplo, un beta-agonista (por ejemplo, salbutamol, salmeterol), cromoglicato disódico, esteroides o un inhibidor de PDEIV.

- 60 Métodos de ensayo

- La presente invención proporciona un método que comprende provocar o permitir la unión de un miembro de unión a diana como se proporciona en el presente documento a IL-25. Como se ha indicado, tal unión puede tener lugar *in vivo*, por ejemplo, tras la administración de un miembro de unión a diana o ácido nucleico que codifica un miembro
- 65 de unión a diana, o puede tener lugar *in vitro*, por ejemplo, en ELISA, transferencia Western, inmuno-citoquímica, inmunoprecipitación o cromatografía de afinidad.

Puede determinarse la cantidad de unión del miembro de unión a diana a IL-25. La cuantificación puede relacionarse con la cantidad del antígeno en una muestra de ensayo, que puede ser de interés diagnóstico.

5 Pueden determinarse las reactividades de los anticuerpos en una muestra mediante cualquier medio apropiado. El radioinmunoensayo (RIA) es una posibilidad. El antígeno radiactivo marcado se mezcla con antígeno no marcado (la muestra de prueba) y se permite que se una al anticuerpo. El antígeno unido se separa físicamente del antígeno no unido y se determina la cantidad de antígeno radiactivo unido al anticuerpo. Cuanto más antígeno haya en la muestra de prueba, menos antígeno radiactivo se unirá al anticuerpo. También puede usarse un ensayo de unión competitiva con antígeno no radiactivo, usando antígeno o un análogo ligado a una molécula indicadora. La molécula indicadora puede ser un fluorocromo, fósforo o colorante láser con características de absorción o emisión espectralmente aisladas. Fluorocromos adecuados incluyen fluoresceína, rodamina, ficoeritrina y rojo de Texas. Los colorantes cromogénicos adecuados incluyen diaminobencidina.

15 Otros indicadores incluyen partículas coloidales macromoleculares o material particulado tal como perlas de látex que son agentes coloreados, magnéticos o paramagnéticos, y biológica o químicamente activos que pueden provocar directa o indirectamente señales detectables que van a observarse visualmente, detectarse electrónicamente o registrarse de otra manera. Estas moléculas pueden ser enzimas que catalizan reacciones que, por ejemplo, desarrollan o cambian los colores o provocan cambios en las propiedades eléctricas. Pueden ser molecularmente excitables, de forma que las transiciones electrónicas entre los estados de energía produzcan absorciones o emisiones espectrales características. Pueden incluir entidades químicas usadas junto con biosensores. Pueden emplearse sistemas de detección de biotina/avidina o biotina/estreptavidina y de fosfatasa alcalina.

25 Las señales generadas por conjugados individuales de anticuerpo-indicador pueden usarse para derivar datos absolutos o relativos cuantificables de la unión del anticuerpo relevante en muestras (normales y de ensayo).

30 La presente invención también proporciona el uso de un miembro de unión a diana como antes para medir los niveles de antígeno en un ensayo de competición, es decir, un método para medir el nivel de antígeno en una muestra empleando un miembro de unión a diana como se proporciona por la presente invención en un ensayo de competición. Éste puede ser donde no se requiera la separación física de antígeno unido del no unido. Unir una molécula indicadora al miembro de unión a diana de forma que ocurra un cambio físico u óptico a la unión es una posibilidad. La molécula indicadora puede generar directa o indirectamente señales detectables y preferentemente medibles. El enlace de moléculas indicadoras puede ser directa o indirectamente, covalentemente, por ejemplo, a través de un enlace peptídico o no covalentemente. El enlace mediante un enlace peptídico puede ser el resultado de expresión recombinante de una fusión génica que codifica el anticuerpo y la molécula indicadora.

35 La presente invención también proporciona la medición de niveles de antígeno directamente, empleando un miembro de unión a diana según la invención, por ejemplo, en un sistema biosensor.

40 El modo para determinar la unión no es una característica de la presente invención y los expertos en la materia pueden elegir un modo adecuado según su preferencia y conocimiento general.

Ejemplos

45 Los aspectos y realizaciones de la presente invención se ilustrarán ahora a modo de ejemplo con referencia a los siguientes experimentos.

Ejemplo comparativo:

50 Secuencia primaria de 2c3

La secuencia de la cadena ligera kappa excluyendo su secuencia conductora se muestra en la Figura 1 (SEC ID N°: 15) y la secuencia de aminoácidos de los bucles de CDR, como se definen por Kabat, se denominan L1 (SEC ID N°: 29), L2 (SEC ID N°: 30) y L3 (SEC ID N°: 31). Las secuencias L1, L2 y L3 fueron las secuencias donantes para la humanización de la cadena ligera de 2c3. La secuencia de la cadena pesada (SEC ID N°: 17) se muestra en la Figura 2 y de nuevo las CDR se identifican como H1 (SEC ID N°: 32), H2 (SEC ID N°: 35) y H3 (SEC ID N°: 33).

Análisis de cadenas pesadas y ligeras de 2c3

60 Se analizó una base de datos de secuencias de anticuerpos humanos para identificar las secuencias de la región estructural aceptora para 2c3. La base de datos de secuencias de anticuerpos humanos comprende 9597 secuencias de la cadena pesada y 2695 secuencias de la cadena ligera. Las secuenciasceptoras adecuadas se identificaron preliminarmente basándose en primer lugar en la mayor puntuación de VCI, en segundo lugar en la puntuación de región estructural (FR) y en tercer lugar la puntuación de identidad. Finalmente, se descartó cualquier secuencia que no tuvo longitudes de bucle conservadas para H1, H2, L1 y L2. Posteriormente, se comprobaron las 20 primeras secuencias de anticuerpos humanos para eliminar anticuerpos humanizados, anticuerpos con scFv

fuertemente mutados y anticuerpos de ratón. También se eliminaron aquellas secuencias con restos de cisteína o prolina en posiciones atípicas.

Análisis del aceptor de cadena pesada para 2c3

5 Se identificaron las 20 primeras secuencias para la cadena pesada de 2c3. En la Figura 3 se muestra la secuencia AY393094, con la puntuación de VCI superior (SEC ID N°: 19), con únicamente 2 restos de VCI diferentes A67V y L691. Estos dos cambios son conservativos. El análisis del resto de la secuencia de la región estructural muestra que 59 de los 87 restos están conservados. Los restos de la superficie de separación encontrados en 2c3 y
10 AY393094 se conservan en la cadena pesada relacionada (AY510106) para la cadena ligera propuesta por los presentes inventores, AY510106. En conjunto, el análisis hace que AY393094 (SEC ID N°: 19) sea un buen candidato que puede requerir pocas retromutaciones de VCI.

15 Sin embargo, la longitud del bucle H3 de AY393094 es 17 en lugar de los 13 restos encontrados en 2c3, pero esta diferencia en la longitud de H3 no es poco común durante las humanizaciones y se considera menos importante que conservar los restos de VCI.

Construcción humanizada de la cadena pesada de 2c3 (RHA)

20 En la Figura 4 se muestra la construcción de la cadena pesada humanizada y se denominó RHA (SEC ID N°: 21). La secuencia conductora y la secuencia de la región estructural son de AY393094 y los bucles de H1-3, como se definen por Kabat son de 2c3. En el extremo 5' se ha añadido una secuencia consenso de Kozak y un sitio de restricción HindIII mientras que en el extremo 3' se ha añadido un sitio de restricción ApaI. Los sitios de restricción son para ayudar a los vectores de expresión y la secuencia consenso de Kozak tiene por objeto maximizar la
25 expresión de proteínas. Los sitios de glucosilación unidos a N tienen el motivo NX(S/T), no se encontró ninguno en la cadena pesada humanizada. La calidad del sitio de escisión peptídico se evaluó aplicando el programa Signal P a la secuencia de péptidos del extremo amino de RHA. Los resultados confirmaron que la secuencia conductora de VH5a se escindiría entre VCA (el extremo C del péptido señal) y EVR (el extremo N de FR1).

30 Análisis de la región estructural de la cadena ligera

Se identificaron varias regiones estructurales de la cadena ligera humana con las mejores puntuaciones de VCI y de región estructural. Sin embargo, después de considerar las tres secuencias de mayor puntuación, todas se descartaron. La primera porque esta cadena ligera era de un anticuerpo que se había mostrado que se asociaba con
35 la formación de fibrilla amiloide, las dos siguientes ya que las secuencias no tienen restos conservados en las posiciones 1 y 3. La experiencia de humanización previa de los inventores les condujo a creer que estos restos deberían estar conservados.

40 Las siguientes mejores secuencias solo se diferenciaron en dos restos de VCI V44P e Y71F, aunque en un análisis adicional se observó que los candidatos con las mayores puntuaciones de la región estructural fueron muy similares, pero tenían tanto desapareamientos L73F como I83F. La fenilalanina es un cambio relativamente grande y parece estar conservada en estos dos tipos de cadenas ligeras. El análisis adicional de regiones estructurales de la cadena ligera similares a 2c3 encontró un número significativo que tenía una valina en la posición 83 combinada con leucina en la posición 73 y así proporciona una alternativa a aquellas regiones estructurales con una Phe en la posición 83.
45 En vista de esto, los inventores seleccionaron una cadena ligera, AY510106, que es una cadena ligera de V83 con las mismas longitudes de bucle de CDR que 2c3. La secuencia para AY510106 (SEC ID N°: 23) se muestra en la Figura 5.

50 Construcción humanizada de la cadena ligera de 2c3 (RKA)

En la Figura 6 se muestra la construcción de la cadena ligera kappa humanizada y se denominó RKA (SEC ID N°: 25). La secuencia conductora y la secuencia de región estructural son de AY510106 y L1-3 es de 2c3. En el extremo 5' se ha añadido una secuencia de Kozak consenso y un sitio de restricción HindIII mientras que en el extremo 3' se ha añadido un sitio de restricción de BamHI y un sitio de corte y empalme. Los sitios de restricción y los sitios de
55 corte y empalme son necesarios para clonar y expresar la construcción en el vector de expresión pKN100 y la secuencia consenso de Kozak tiene por objeto maximizar la expresión de proteínas. Los sitios de glucosilación unidos a N tienen el motivo NX(S/T), ninguno se encontró en la cadena ligera humanizada. La calidad del sitio de escisión peptídico se evaluó aplicando el programa Signal P a la secuencia de péptidos del extremo amino de RKA de 2c3. Los resultados confirmaron que la secuencia conductora VK1- A20 se escindió entre los restos TRC (en el extremo C del péptido de señal) y DI (en el extremo N de FR1).
60 Comparación de RHA y RKA con 2c3 quimérico

Se sintetizaron los ADNc de RHA de la cadena pesada y RKA de la cadena ligera kappa de 2c3 humanizados (GeneArt AG) y se clonaron en el vector de expresión de cadena pesada de IgG1 pG1D200 y el vector de expresión de cadena ligera pKN100, respectivamente. Inicialmente, se combinaron las construcciones de ADNc de la cadena pesada y ligera de 2c3 quimérico y el anticuerpo humanizado y se usaron para transfectar transitoriamente células

HEK293T. Los sobrenadantes de las células transfectadas se usaron en un ELISA para medir la unión de anticuerpo a IL-25. Los resultados (Figura 7(A)) indicaron que el anticuerpo humanizado, que comprende la cadena ligera de 2c3 quimérico con la cadena pesada humanizada, RHA, se unió significativamente menos a IL-25 que el anticuerpo que comprende cadenas ligeras y pesadas de 2c3 quimérico. Por el contrario, se observó unión equivalente a IL-25 para la cadena ligera humanizada, RKA, o la cadena ligera de 2c3 quimérica asociada a la cadena pesada 2c3 quimérica.

En un intento de recuperar la unión máxima para la cadena pesada humanizada, los restos de VCI A67V e I69L se reemplazaron por mutagénesis. La unión al antígeno del mutante doble RHA_A67V_I69L y RHA_I69L combinados con RKA de cadena ligera se comparó con la del 2c3 quimérico. Se co-transfectaron células HEK 293T con las diversas cadenas pesadas mutagenizadas y RKA y el sobrenadante usado en un ELISA de unión a IL-25. Los resultados mostrados en la Figura 7(B) muestran que la unión de anticuerpo máxima a IL-25 se recuperó solo parcialmente mediante la sustitución de tanto los restos A67V como I69L.

Se realizó mutagénesis adicional en RHA. Se hicieron sustituciones de aminoácidos R3Q, S82aL y se usaron los sobrenadantes de células HEK293T transitoriamente transfectadas en un ELISA de unión a IL-25. Los resultados en la Figura 7(C) muestran que estas sustituciones tuvieron poco o ningún efecto en mejorar la unión de anticuerpo humanizado a IL-25.

Por lo tanto, se llegó a la conclusión de que la humanización de la cadena ligera fue satisfactoria y no requirió modificación adicional mientras que incluso con modificación por ingeniería genética adicional de la cadena pesada la humanización basada en la transferencia de las CDR en una cadena pesada con restos de VCI aparentemente bien conservados no fue satisfactoria.

Ejemplo 1 - Diseño de anticuerpo humanizado de alta afinidad

La región estructural AY393094 dejó de proporcionar un anticuerpo humanizado satisfactorio a pesar de la sustitución de restos de vernier o canónicos, dando regiones estructurales de anticuerpo con una alta prioridad de identidad de secuencia por encima de la puntuación de VCI. Este método identificó una clase diferente de regiones estructurales humanas. De estas, se seleccionó la que tenía la mayor puntuación de VCI. Su secuencia conductora era desconocida de forma que se usó la secuencia conductora de VH5a como sustitución. La secuencia del dominio VH humano seleccionado, AJ399823 (SEC ID N°: 27) se muestra en la Figura 8.

Sus CDR se sustituyeron con aquellas de 2c3 y el segundo anticuerpo humanizado se denominó RH2. La secuencia se muestra como SEC ID N°: 4. RH2 tiene cinco restos de VCI no conservados: Ser 30; Met 48; Val 67; Arg 71 y Thr 73 (numeración de Kabat). Estos restos se denominan más adelante b, c, d, e y f, respectivamente.

La cadena pesada humanizada que contiene todas las sustituciones de VCI se denominó RH2bcdef y se probó junto con la RKA de cadena ligera. Los sobrenadantes de células HEK293T transitoriamente transfectadas se usaron en un ELISA de unión a IL-25. Una comparación entre RHA y RH2bcdef mostró unión mejorada a IL-25 en comparación con RHA, pero dejó de recuperar el 100 % de unión mostrada por el 2c3 quimérico. Por lo tanto, se llegó a la conclusión de que se requería un enfoque alternativo a la humanización sencilla de 2c3.

Ejemplo 2 - Modificación de CDR de RH2bcdef

Se encontró que dos restos de CDR mejoraban la fuerza del anticuerpo humanizado. Se introdujeron las mutaciones D31G y G96D en RH2bcdef y se usaron para transfectar transitoriamente células HEK293T. Los sobrenadantes se usaron en un ELISA de unión a IL-25. Los resultados en la Figura 9(A) muestran que la mutación D31G recupera la fuerza de RH2bcdef hasta los niveles de 2c3. Sin embargo, la mutación G96D, Figura 9(B), aumenta la fuerza de unión a antígeno sustancialmente más allá de la de 2c3.

Para probar si las dos mutaciones eran aditivas se incorporaron ambas en RH2bcdef. Se usaron sobrenadantes de células HEK293T transitoriamente transfectadas en un ELISA de unión a IL-25. Los resultados mostrados en la Figura 10 sugieren que existe un pequeño aumento, pero significativo, en la fuerza de humanización incorporando ambas mutaciones de CDR.

Los datos de los presentes inventores también indican que además de Gly o Asp, la posición 31 también podría seleccionarse de Ala, Ser, Val, Asn, Lys, Tyr o Met para mantener propiedades de unión similares a la del anticuerpo.

Ejemplo 3 - Modificaciones del resto 96 (Kabat)

Con el fin de entender mejor qué aminoácidos pueden tolerarse en el resto 96, la glicina se sustituyó por mutagénesis por selección representativa de aminoácidos. Se hicieron las siguientes mutaciones a RH2bcdef: G96Y, G96N, G96S, G96L, G96K y G96E. Las construcciones de expresión se co-transfectaron con RKA en células HEK293T y los sobrenadantes se usaron en un ELISA de unión a IL-25. Los resultados mostraron que únicamente la

sustitución del aspartato en la posición 96 por asparagina fue de fuerza equivalente, todos los otros restos probados en esta posición tuvieron un efecto perjudicial sobre la unión a IL-25. Sorprendentemente, un efecto perjudicial sobre la fuerza también incluyó la sustitución por glutamato que es un resto con carga negativa, similar al aspartato. Se puede llegar a la conclusión de que la carga negativa no es la contribución principal que el aspartato realiza para el aumento de la fuerza.

Por consiguiente, el resto 96 (Kabat) en un dominio VH de la invención puede ser aspartato o asparagina.

Ejemplo 4 - Determinación del requerimiento mínimo de restos VCI de ratón para RH2

Con el fin de minimizar el posible impacto inmunogénico sobre el anticuerpo humanizado es deseable minimizar el número de sustituciones de la región estructural de aminoácidos murinos. La cadena pesada humanizada RH2bcdef_G96D se denominó RH2.1 y tenía cinco sustituciones de VCI de 2c3. Inicialmente se eliminaron cuatro para identificar qué restos contribuían a la fuerza.

Las mutaciones c, d, e y f se sustituyeron con el resto de la región estructural humana endógeno como mutaciones únicas. Las células HEK 293T se co-transfectaron con las mutaciones de VCI y RKA y los sobrenadantes se probaron en un ELISA de unión a IL-25. Sorprendentemente, se encontró que la reintroducción de los restos humanos V67 o T73 tenía una ligera mejora de la fuerza que era inesperada. El cambio de Met en 48 a Ile murina no tuvo ningún efecto significativo.

Sin embargo, pareció que la presencia del resto de arginina humano en la posición 71 tenía un efecto perjudicial en la unión a IL-25. Por lo tanto, la conclusión fue que únicamente el resto de VCI murino Val 71 era muy deseable en el anticuerpo humanizado. Los otros restos pueden ser tanto de ratón como humanos.

Con el fin de identificar una cadena pesada humanizada final óptima se sintetizó una nueva versión de la cadena pesada denominada RH2.5 (SEC ID N°: 4) que no contenía restos de VCI murinos. Adicionalmente, se hicieron dos versiones modificadas de RH2.5 con tanto las mutaciones de VCI S30T (SEC ID N°: 3) como R71V (SEC ID N°: 2). La unión de estos tres anticuerpos humanizados nuevos a IL-25 se analizó por ELISA. Los resultados se muestran en la Figura 11. Se encontró que en comparación con RH2.5, la adición de S30T o R71V mejoró igualmente la unión a IL-25 humana.

Por lo tanto, en algunas realizaciones de la invención, las posiciones 30 y 71 de la cadena pesada pueden estar modificadas, por separado o en combinación, de S a T y R a V, respectivamente.

Ejemplo 5 - Termoestabilidad del anticuerpo

Se determinó la termoestabilidad de RH2.5_S30T (SEC ID N°: 3) y RH2.5_R71V (SEC ID N°: 2). Los anticuerpos se mantuvieron a diversas temperaturas durante 10 minutos, después se enfriaron rápidamente hasta temperatura ambiente y se midió su capacidad para unirse a IL-25 por ELISA. Se encontró que el anticuerpo quimérico 2c3 (control) retiene mayor termoestabilidad y es activo hasta temperaturas de 75 °C. RH2.5_R71V permaneció activo hasta 65 °C y RH2.5_S30T fue activo hasta 60 °C.

Ejemplo 6 - Bioensayo de linfocitos no B/no T de los anticuerpos humanizados

Existen algunos bioensayos *in vitro* disponibles para medir la actividad de IL-25. Un poderoso ensayo es medir la liberación de IL-13 de linfocitos no B/no T (NB/NT) aislados de los ganglios linfáticos mesentéricos de ratones. En este ensayo, se incubaron células con IL-25 y concentraciones variables de anticuerpo y se midió IL-13 tres días después de la estimulación. Los resultados mostraron que el anticuerpo 2c3 murino inhibió únicamente parcialmente la producción de IL-13. Por el contrario, RH2.5_R71V y S30T cortan ambos la producción de IL-13 y RH2.5 redujo significativamente la producción de IL-13. De forma interesante, tanto RH2.5_R71V como RH2.5_S30T aún mostraron inhibición completa de la producción de IL-13 a concentraciones tan bajas como 0,25 µg/ml, pero pueden encontrarse algunos niveles pequeños de producción de citocinas para RH2.5 en esta concentración. Estos datos coinciden con la idea de que el anticuerpo humanizado es más fuerte que el anticuerpo quimérico 2c3 y que las mutaciones R71V y S30T tienen una fuerza de unión a antígeno mejorada.

Ejemplo 7 - RH2.5-R71V inhibe la hipersensibilidad de las vías respiratorias

En experimentos adicionales, se ensayó el anticuerpo humanizado RH2.5_R71V en un modelo de ratón de hipersensibilidad aguda de las vías respiratorias (HVR). El protocolo experimental se resume en la Figura 12. Los ratones se sensibilizaron inicialmente a albúmina de huevo, luego se expusieron en presencia de los anticuerpos anti-IL-25. Los resultados en la Figura 13(A) muestran que la respuesta de HVR se bloqueó mediante la adición de una dosis de 500 µg de 2c3 por ratón, pero no se bloqueó cuando la dosis se redujo a una dosis de 50 µg por ratón. Por el contrario, HVR se bloqueó usando únicamente una dosis de 50 µg (2,5 mg/Kg) del anticuerpo humanizado RH2.5_R71V como se muestra en la Figura 13(B). Estos datos apoyan adicionalmente el punto de vista de que el anticuerpo humanizado es significativamente más fuerte que el anticuerpo 2c3.

Ejemplo 8 - Tratamiento de colitis

Para sensibilizar previamente ratones BALB/c hembra (10 por grupo) se rasuró un campo de la piel abdominal y se aplicaron 150 µl de una solución al 3 % (p/v) de oxazolona en etanol al 100 %. Los ratones de control se sensibilizaron previamente mediante la aplicación de 150 µl de etanol al 100 %. 7 días después de la sensibilización previa, los ratones se expusieron nuevamente por vía intrarrectal a 150 µl de oxazolona al 3 % en etanol al 50 % o únicamente etanol al 50 % (control), con anestesia con isoflurano. Para asegurar la distribución de la oxazolona dentro de todo el colon y el ciego, los ratones se mantuvieron en una posición vertical durante 1 minuto después de la inyección. Se administró un anticuerpo que es una quimera de la secuencia de 2C3 de ratón en un esqueleto de IgG1 humana (100 µg/dosis) por vía intraperitoneal (i.p.) tanto el día antes de la sensibilización previa como el día antes de la administración intrarrectal (i.r.) de oxazolona. Los ratones de control recibieron IgG4 humana de isotipo de control (100 µg/dosis). Todos los experimentos con animales explicados resumidamente aquí se realizaron con la aprobación del Departamento de Interior del RU.

Se midió la longitud del colon en grupos de ratones tras tres administraciones diarias de tanto etanol al 50 % más control de isotipo IgG4 i.p. (EtOH al 50 % IgG4); etanol al 50 % i.r. más anti-IL-25 i.p. (EtOH al 50 % anti-IL-25); etanol al 50 % con oxazolona al 3 % i.r. más control de isotipo IgG1 i.p. (oxazolona al 3 % IgG4) y etanol al 50% con oxazolona al 3% i.r. más anti-IL-25 i.p. (oxazolona al 3 % anti-IL-25).

Tras el tratamiento, se midieron los pesos de los animales como antes.

La Figura 14A muestra que la administración de oxazolona induce una reducción en la longitud del colon como un indicador de colitis. Los animales tratados con oxazolona y anticuerpo anti-IL-25 derivado de 2C3 muestran una tendencia hacia colonos más largos (un pronóstico mejorado) con respecto a los animales tratados con oxazolona e isotipo de IgG4. El tratamiento con oxazolona también induce pérdida de peso en comparación con el control solo con vehículo (Figura 14B). Los animales tratados con oxazolona y anti-IL-25 también pierden peso aunque muestran una tendencia a volver a ganar peso más rápidamente que el grupo tratado con oxazolona-isotipo IgG4 el día 3.

Materiales y métodos

30	Abreviaturas	
	HVR	Hipersensibilidad de las vías respiratorias
	°C	Grados centígrados
35	pb	Pares de bases
	DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
	DMSO	Sulfóxido de dimetilo
	ADN	Ácido desoxirribonucleico
	ELISA	Enzimoimmunoanálisis de adsorción
40	FCS	Suero fetal de ternero
	FR	Región estructural
	g	Gramos
	HEK293T	Células de riñón embrionario humano que expresan el antígeno T grande del SV40 células HEK 293T)
45	h	Hora
	HRP	Peroxidasa de rábano picante
	IgG	Inmunoglobulina
	mAb	Anticuerpo monoclonal
	min	Minuto
50	NB/NT	Linfocitos no B/no T aislados de ganglios linfáticos mesentéricos de ratón
	NIMR	Instituto Nacional de Investigación Médica (RU)
	nm	Nanómetro
	DO	Densidad óptica
	PBS	Solución salina tamponada con fosfato
55	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
	RH	Cadena pesada recombinante
	RK	Cadena kappa recombinante
	TA	Temperatura ambiente
	s	Segundo
60	UV	Ultravioleta
	VH	Región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina
	VL	Región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina
	VK	Región variable de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina

65 Reactivos de inmunología y biología molecular

Artículo	Proveedor en RU	Número de catálogo	Números de lote
Células de <i>E. coli</i> competentes 10 ⁸	NEB	C3019H	
Agarosa (UltraPure™)	Invitrogen	15510-027	3048948
Albúmina bovina (BSA)	Sigma	A7030	086K1230
Ampicilina	Sigma	A-9518	63H0992
Fosfatasa Antártica	NEB	M0289S	13
Apal	Promega	R636	20381008
Bam HI	Promega	R602	21936309
Tampón carbonato-bicarbonato	Sigma	C3041	076k82206
Reactivo de transfección FuGENE® 6	Roche	11814443001	14069500
Polimerasa verde Go - Taq	Promega		
Anticuerpo anti-IgG humana de cabra (específico del fragmento Fc)	Stratech Scientific	109-005-098	76111
Conjugado de anti-cadena kappa humana de cabra con peroxidasa de rábano picante	Sigma	A7164	116K6101
Hind III	Promega	R604	19453528
Anticuerpo IgG1 humana/kappa	The Binding Site	BP078	247317
IL-25 (murina)	R&D Systems		
IL-25 (humana)	R&D Systems		
Sustrato HRP K-Blue	SkyBio	308176	080129
Kit de extracción en gel MiniElute	Qiagen	28606	124105586
Oligonucleótidos	Sigma	n.a.	
Comprimidos de PBS	Sigma	P4417	017K8212
Kit de mutagénesis dirigida al sitio Phusion™	NEB (Finnzymes)	F-541 S	
Kit QIAGEN Plasmid Maxi (25)	Qiagen	12163	127142067
Kit QIAprep Spin Miniprep	Qiagen	27106	127150290
Kit de ELISA de IL-13 murina Quantikine	R&D Systems	M1300CB	
Kit Quick Ligation	NEB	M2200s	
Kit de mutagénesis dirigida QuikChange® II XL	Stratagene	200522-5	0870486
Solución Red Stop (para K-Blue)	SkyBio Ltd	301475	071114
Perlas Dyna marcadas con estreptavidina	Invitrogen		
Tinción en gel SYBR Safe DNA	Invitrogen	33102	55081A
Kit TOPO-TA Cloning®	Invitrogen	45-0641	1311906
X-Gal	Promega	V394A	20965701

Clonación de genes variables de anticuerpos quiméricos y humanizados

- Se sintetizaron los ADNc de la región variable de la cadena pesada y ligera del 2c3 y los ADNc de la región variable de los anticuerpos humanizados (GeneArt AG). Las regiones V de la cadena pesada se clonaron en pG1D200 mediante los sitios de restricción enzimáticos HindIII y Apal. Similarmente, las regiones V de la cadena ligera se clonaron en pKN100 mediante los sitios HindIII y BamHI. Se preparó el vector pG1D200 para ligamiento digiriendo 5 µg de ADN con 20 unidades de HindIII y Apal en tampón de digestión de restricción multicore (Promega) durante 2 h a 37 °C. Posteriormente, se añadió 1 unidad de fosfatasa alcalina antártica (NEB) al ADN y se incubó entre 15 y 30 minutos siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, la preparación del vector se purificó en una columna Qiaquick (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El vector se eluyó en 50 µl. Similarmente, se preparó el vector pKN100 digiriendo 5 µg de ADN con 20 unidades de HindIII y BamHI en tampón E (Promega) durante 1 hora a 37 °C. El ADN se trató con fosfatasa alcalina antártica y se purificó como se ha descrito anteriormente. Los ADN de inserto de región V (aproximadamente 4 µg) se digirieron como se ha descrito anteriormente y los fragmentos de cadena pesada y ligera se purificaron del vector mediante electroforesis en gel. La banda apropiada se escindió del gel y se purificó en una columna Qiaquick (Qiagen) y se eluyó en 50 µl siguiendo

las instrucciones del fabricante. Se llevaron a cabo ligamientos mezclando 1 µl de vector con tanto 1 µl como 3 µl de ADN de inserto en tampón de ligasa Quick 1x (NEB) y 1 µl de NEB Quick Ligase y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente (20 °C). La reacción se usó para transformar 50 µl de 100 células competentes (NEB). Las construcciones del vector se confirmaron mediante secuenciación de ADN y se llevaron a cabo por GATC Biotech Ltd (Cambridge).

Síntesis de genes variables y mutagénesis dirigida al sitio

Se sintetizaron genes variables se sintetizaron por GeneArt AG (Regensburg, Alemania)

Se realizó mutagénesis dirigida al sitio usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange® II XL (Stratagene) siguiendo las instrucciones del fabricante. Exceptuando las mutaciones de RHA, R3Q y L82aS, en las que se usó el método del kit de mutagénesis dirigida al sitio (NEB) Phusion™, se siguieron las instrucciones del fabricante.

ELISA de IgG1

Se recubrieron placas Maxisorp con 0,4 µg/ml de anticuerpo anti-IgG humana de cabra y se guardaron a 4 °C durante no más de 1 mes. Antes de uso, las placas se lavaron tres veces con PBS/Tween 20 al 0,02 % (v/v), luego se bloquearon en PBS/Tween 20 al 0,02 % (v/v)/BSA al 0,2 % (p/v). Las placas se lavaron como antes y se añadió sobrenadante de muestra sobre un intervalo de concentración usando diluciones dobles y se incubó a 37 °C durante 1 h. Las placas se lavaron como antes y se incubaron con conjugado de anti-cadena ligera kappa humana de cabra - peroxidasa (Sigma) a una dilución 1:5000. Las placas se lavaron, como antes, luego se añadieron 150 µl de sustrato K Blue One-Step (Neogen). Después de 10 minutos, la reacción se detuvo con 50 µl de solución Red Stop (Neogen) y se midió la densidad óptica a 655 nm.

Ensayos de unión a citocina

Se recubrieron placas Maxisorp se recubrieron con 0,25 µg/ml de IL-25 humana (R&D Systems) en tampón de carbonato-bicarbonato (Sigma) y se guardaron a 4 °C durante no más de 1 mes. Antes de uso, las placas se lavaron tres veces con PBS/Tween 20 al 0,02 % (v/v), luego se bloquearon en PBS/Tween 20 al 0,02 % (v/v)/BSA al 0,5 % (p/v). Las placas se lavaron como se antes y se añadió sobrenadante de muestra sobre un intervalo de concentración usando diluciones dobles y se incubó a 37 °C durante 1 h. Las placas se lavaron como antes y se incubaron con conjugado de anti-cadena ligera kappa humana de cabra - peroxidasa (Sigma) a una dilución de 1:5000. Las placas se lavaron, como antes, luego se añadieron 150 µl de sustrato K Blue One-Step (Neogen). Después de 10 minutos, la reacción se detuvo con 50 µl de solución Red Stop (Neogen) y se midió la densidad óptica a 655 nm.

Ratones

Se obtuvieron ratones BALB/c de Harlan UK (Bicester, RU) y se mantuvieron en las instalaciones de Small Animal Barrier Unit and Central Biomedical Services LMB, Cambridge, en entornos sin patógenos específicos. Todos los experimentos con animales expuestos brevemente en este informe se realizaron con la aprobación del Departamento de Interior del RU.

Ensayos de linfocitos no B no T

Se purificaron células no B/no T (NBNT) del ganglio linfático mesentérico y se incubaron durante 72 horas con o sin 10 ng/ml de rIL-25 y con isotipo IgG1 de ratón (anti-c-myc) o 2c3 anti-mIL-25 a concentraciones variables de tanto control de isotipo IgG1 humana (anti-malaria), anti-hIL-25 RH2.5 R71V, anti-hIL-25 RH2.5 S30T o anti-hIL-25 RH2.5. La producción de IL-13 se evaluó a partir del sobrenadante celular, que se reunió de dos pocillos duplicados, mediante ELISA. Se realizó ELISA de IL-13 usando el kit Quantikine Murine IL-13 (R&D Systems).

Diseño experimental del modelo agudo de hipersensibilidad de las vías respiratorias (HVR)

Se sensibilizaron ratones BALB/c (6-12 semanas) por administración intraperitoneal de albúmina de huevo en PBS (20 µg/inyección) complejada con alumbre o PBS y alumbre únicamente (controles), los días 0 y 12. La administración en aerosol de albúmina de huevo al 1 % se realizó los días 19, 20 y 21 durante 20 minutos al día. Los animales de control recibieron PBS. Dos horas antes de cada exposición pulmonar, los ratones también recibieron una administración intraperitoneal de 2c3, control de IgG1 de ratón, o control de isotipo IgG1 humano (anti-malaria) o anti-hIL-25 RH2.5 R71V. El día 22, los animales se analizaron usando pletismografía restringida para evaluar la albúmina de huevo de HVR y los anticuerpos se probaron para endotoxina y se encontró que era inferior a 0,1 UE/ml, excepto para RH2.5_R71V que era de 1,2 UE/ml.

Medición de HVR

Se anestesiaron animales, se les realizó la traqueostomía y se colocaron en un respirador (respirador Minivent 845, EMMS, RU) a una velocidad de aproximadamente 150 respiraciones/min, con un volumen corriente de 0,15 ml. Los ratones se monitorizaron en una pletismografía restringida de cuerpo entero (EMMS Hants, RU) y se evaluó la presión transpulmonar a través de un transductor en línea. Después de registrar la resistencia pulmonar de línea basal estable, se administraron concentraciones crecientes de cloruro de acetil-β-metilcolina (metacolina; Sigma, Dorset, Reino Unido) mediante aerosol durante 10 segundos con un nebulizador ultrasónico y se registró la resistencia pulmonar durante un periodo de 3 minutos. Se usó el programa informático EDaq (EMMS Hants, RU) para analizar la resistencia de las vías respiratorias, la adherencia y los parámetros pulmonares convencionales.

10 Referencias

1. P. G. Fallon et al., *Immunity* 17, 7 (Jul, 2002).
2. G. Grunig et al., *Science* 282, 2261 (1998).
3. M. Wills-Karp et al., *Science* 282, 2258 (1998).
4. M. M. Fort et al., *Immunity* 15, 985 (Dec, 2001).
5. M. R. Kim et al., *Blood* 100, 2330 (Oct 1, 2002).
6. G. Pan et al., *J Immunol* 167, 6559 (Dec 1, 2001).
7. S. D. Hurst et al., *J Immunol* 169, 443 (Jul 1, 2002).
8. T. A. Moseley, et al., *Cytokine Growth Factor Rev* 14,155 (Apr, 2003).
9. P. G. Fallon et al., *J Exp Med* 203, 1105 (Apr 17, 2006).
10. A. M. Owyang et al., *J Exp Med* 203, 843 (Apr 17, 2006).
11. Jones, P.T., et al., *Nature* 331:522 (1986).
12. Riechmann, L., et al., *Nature* 332:323(1988).
13. Chothia, C. & Lesk, A.M. *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987).
14. Foote J & Winter G. *J Mol Biol* 224:487 (1992).
15. Ballantyne, S.J., et al *J. Allergy Clin. Immunol.* 120:1324 (2007).
16. Heller, F., et al., *Immunity* 17, 629-638 (2002)
17. Fichtner-Feigl, S., et al., *Mucosal Immunol* 1 Suppl 1, S24-7 (2008)
18. Fort, M. M., et al., *Immunity* 15, 985-995 (2001)
19. Buning, C., et al., *Eur J Immunogenet* 30, 329-333 (2003)
20. Hanauer, S. B. *Aliment Pharmacol Ther* 27 Suppl 1, 15-21 (2008)
21. Papa, A., et al., *Am J Gastroenterol* 104, 1575-1586 (2009)
22. Yun, L., and Hanauer, S. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 3, 235-248 (2009)

35 Secuencias:

SEC ID Nº: 1 - Dominio VH humanizado (artificial)

**Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
 Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser
 Phe Xa1 Xa2 Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 Gln Arg Leu Glu Trp Xa3 Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly
 Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu
 Thr Xa4 Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Asn
 Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 Glu Xa5 Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser**

40 en la que:

- 45 Xa1 es Ser o Thr;
- Xa2 es Gly, Asp, Ala, Ser, Val, Asn, Lys, Tyr o Met;
- Xa3 es Met o Ile;
- Xa4 es Val o Arg; y
- Xa5 es Asp, Asn o Gly.

50 SEC ID Nº: 2 - Dominio VH humanizado RH2.5_S30T (artificial)

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
 GlyAla Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser
 Phe Ser Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly
 Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu
 Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Asn
 Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

SEC ID Nº: 3 - Dominio VH humanizado RH2.5_R71V (artificial)

5 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
 Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser
 Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly
 Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu
 Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Asn
 Ser Leu Arg Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu
 Asp Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 Gln Gly Thr Leu Val Val Ser Ser

SEC ID Nº: 4 - Dominio VH humanizado RH2 (artificial)

10 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
 Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser
 Phe Ser Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly
 Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu
 Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Asn
 Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

SEC ID Nº: 5 - Dominio VH humanizado (artificial)

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser
Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly
Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu
Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Asn
Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

SEC ID N°: 6 - Dominio VH humanizado (artificial)

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser
Phe Ser Asp Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly
Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu
Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Asn
Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

5

SEC ID N°: 7 - Dominio VH humanizado (artificial)

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser
Phe Thr Asp Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly
Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu
Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Asn
Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

10

SEC ID N°: 8 - Dominio VH humanizado (artificial)

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser
Phe Thr Asp Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly
Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu
Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Asn
Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

SEC ID N°: 9 - Dominio VH humanizado (artificial)

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser
Phe Ser Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
Gln Arg Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly
Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu
Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Asn
Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

5

SEC ID N°: 10 - Dominio VH humanizado (artificial)

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser
Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
Gln Arg Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly
Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu
Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Asn
Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

10

SEC ID N°: 11 - Dominio VH humanizado (artificial)

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
 Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser
 Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 Gln Arg Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly
 Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu
 Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Asn
 Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

SEC ID N°: 12 - Dominio VH humanizado (artificial)

5

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
 Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser
 Phe Ser Asp Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 Gln Arg Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly
 Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu
 Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Asn
 Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

SEC ID N°: 13 - Dominio VH humanizado (artificial)

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
 Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser
 Phe Thr Asp Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 Gln Arg Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly
 Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu
 Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Asn
 Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

10

SEC ID N°: 14 - Dominio VH humanizado (artificial)

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
 Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser
 Phe Thr Asp Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 Gln Arg Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly
 Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu

Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Asn
Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

SEC ID Nº: 15 - Dominio VK de 2c3 (murino)

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWYQQKADGTVELLIYYTSS
LHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQQYSKLPYTFGGGKLEI
5 K

SEC ID Nº: 16 - Ácido nucleico que codifica el dominio VK de 2c3

GACATCCAGATGACCCAGACCACCTCCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCG
ACCGGGTGACCATCAGCTGCAGCGCCTCCCAGGGCATCAGCAACTACCT
GAACTGGTATCAGCAGAAGGCCGACGGCACCGTCGAGCTGCTGATCTAC
TACACCAGCAGCCTGCACAGCGGCGTGCCAGCCGGTTTAGCGGCAGCG
GCTCCGGCACCGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAACCCGAGGA
TATCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCAAGCTGCCCTACACCTTTG
10 GCGGCGGAACAAAGCTGGAAATCAAG

SEC ID Nº: 17 - Dominio VH de 2c3 con secuencia conductora (murina)

MVLSLLYLLTALPGILSEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTDYTMN
WVKQSHGKNLEWIGLINPYNGGTSYNQNFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSL
TSEDSAVYYCAREGYDGYLYFAMDYWGQGTSVTVSS

15 SEC ID Nº: 18 - Ácido nucleico que codifica el dominio VH de 2c3

ATGGTGCTGTCCCTGCTGTACCTGCTGACCGCCCTGCCCGGCATCCTGAG
CGAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGCCCTGAGCTGGTGAAGCCTGGCGCC
AGCATGAAGATCAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACAGCTTCACCGACTACA
CCATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCACGGCAAGAACCTGGAATGGATCG
GCCTGATCAACCCCTACAACGGCGGCACCAGCTACAACCAGAACTTCAA
GGGCAAGGCCACCCTGACCGTGGACAAGAGCAGCAGCACC GCCTACATG
GAACTGCTGTCTCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGCGCCA
GAGAGGGCTACGACGGCTACCTGTACTTCGCCATGGACTACTGGGGCCA
GGGCACCAGCGTGACCGTGAGCAGC

20 SEC ID Nº: 19 - Dominio VH AY393094 (humano)

LLLAVLQGVCAEVRLVQSGAEVKKPGESLKISCKASGYSFTSNWIGWVRQM
PGKGLEWIGIIFPGSDTIYSPSFQGQVTISVDKSINTAYLQWSSLKATDTAM
YYCARQNPPEYSGAYHDGWFDWPWGQGLVIVSS

SEC ID Nº: 20 - Ácido nucleico que codifica el dominio VH de AY393094

25

CTCCTCCTGGCTGTTCTCCAAGGAGTCTGTGCCGAGGTGCGCCTTGTGCA
GTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCGGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGT
AAGGCTTCTGGATACAGTTTTACCAGTAACTGGATCGGCTGGGTGCGCC
AGATGCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATTGGGATCATCTTTCCTGGTGA
CTCTGATACCATATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATTTTCAG
TCGACAAGTCCATCAATACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGC
CACGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGACAGAACCCCCCGAGTAT
AGTGGCGCATATCATGATGGGTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCC
TGGTCATCGTCTCCTCA

SEC ID N°: 21 - Dominio VH de RHA (artificial)

MGSTAILGLLLAVLQGVCAEVRLVQSGAEVKKPGESLKISCKASGYSFTDYT
MNWVRQMPGKGLEWIGLINPYNGGTSYNQNFKGQVTISVDKSINTAYLQW
5 SSLKATDTAMYCYCAREGYDGYLYFAMDYWGQGLVIVSS

SEC ID N°: 22 - Ácido nucleico que codifica el dominio VH de RHA (artificial)

ATGGGGTCAACCGCCATCCTTGGCCTCCTCCTGGCTGTTCTCCAAGGAGT
CTGTGCCGAAGTGCGCCTTGTGCAGTCTGGAGCAGAAGTGAAAAAGCCG
GGGAGTCTCTGAAGATCTCTTGCAAGGCTTCTGGATACAGTTTTACCGA
CTACACCATGAACTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGG
ATTGGGCTTATTAATCCTTACAATGGTGGTACTAGCTACAACCAGAATTT
CAAGGGCCAAGTCACCATTTTCAGTCGACAAGTCCATCAATACCGCCTAC
CTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCACGGACACCGCCATGTATTACTGTG
CGAGAGAGGGCTATGATGGTTACCTTTACTTTGCTATGGACTACTGGGGC
10 CAGGGAACCCTGGTCATCGTCTCCTCAG

SEC ID N°: 23 - Dominio VK de AY510106 (humano)

MRVPAQLLGLLLLWLPDTRCDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNY
LAWYQQKPGKVPKLLIYAASSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDVAT
15 YYCQKYNAPYTFGQGTKLEIK

SEC ID N°: 24 - Ácido nucleico que codifica dominio VK de AY510106

ATGAGGGTCCCTGCTCAGCTCCTGGGACTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGA
TACCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCAT
CTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCGAGTCAGGGCATTAG
CAATTATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAACTC
CTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAATCAGGGGTCCCATCTCGGTTCAG
CGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAG
CCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAAAGTATAACAGTGCCCCGTA
CACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

SEC ID Nº: 25 - Dominio VK de 2c3 humanizado RKA (artificial)

MRVPAQLLGLLLLWLPDTRCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQGISNY
LNWYQQKPGKVPKLLIYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVAT
YYCQQYSKLPYTFGQGTKLEIK

5 SEC ID Nº: 26 - Ácido nucleico que codifica el dominio VK de 2c3 humanizado RKA

ATGAGGGTCCCTGCTCAGCTCCTGGGACTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGA
TACCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCAT
CTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCAGTGCATCCCAGGGCATTAG
CAATTATCTGAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAACTC
CTGATCTATTACACATCAAGTTTACACTCAGGGGTCCCATCTCGGTTGAG
CGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAG
CCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAGCAGTATAGCAAGCTGCCGTA
CACGTTTGGCCAGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

SEC ID Nº: 27 - Dominio VH de AJ399823 (humano)

10

EVQLVESGAEVKKGASVKVSKASGYSFSSYGIHWVRQAPGQRLEWMG
WINGGTGFTKYSQNFQGRVTLTRDTSASTAYLELNSLRSEDTGVYYCARDP
YNNYAAELDYWGQGLVTVSS

SEC ID Nº: 28 - Ácido nucleico que codifica el dominio VH de AJ399823 (humano)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCT
CAGTGAAGTTTCGTGCAAGGCTTCTGGATACTCCTTCAGTAGTTATGGT
ATACATTGGGTGCGCCAGGCCCGGACAAAGGCTTGAGTGGATGGGAT
GGATCAACGGTGGCACTGGTTTTACAAAATATTCACAGAATTTTCAGGG
CAGAGTCACCCTAACCAGGGACACTTCCGCGAGCACAGCCTACTTGGAA
CTGAACAGCCTGAGATCTGAAGACACGGGTGTATATTACTGTGCGAGGG
ATCCCTACAATAACTACGCGGCGGAAGTACTACTGGGGCCAGGGAAC
CCTGGTCACCGTCTCCTCA

15

SEC ID Nº: 29 - CDR1 de la cadena ligera (murina)
SASQGISNYLN

20 SEC ID Nº: 30 - CDR2 de la cadena ligera (murina)
YTSSLHS

SEC ID Nº: 31 - CDR3 de la cadena ligera (murina)
QQYSKLPYT

25

SEC ID Nº: 32 - CDR1 de la cadena pesada (murina)
DYTMN

30 SEC ID Nº: 33 - CDR3 de la cadena pesada (murina)
EGYDGYLYFAMDY

SEC ID Nº: 34 - CDR1 de la cadena pesada (artificial)
GYTMN

SEC ID Nº: 35 - CDR2 de la cadena pesada (murina)
LINPYNGGTSYNQNFKG

5 SEC ID Nº: 36 - CDR3 de la cadena pesada (artificial)
EDYDGYLYFAMDY

SEC ID Nº: 37 Secuencia conductora del dominio VH:
MGSTAILGLLLAVLQGVCA

10 SEC ID Nº: 38 - Secuencia conductora del dominio VK de 2C3:
MRVPAQLLGLLLLWLPDTRC

SEC ID Nº: 39 - Secuencia conductora de VL humano:
MDMRVPAQLLGLLLLWLPDTRC

15 SEC ID Nº: 40 - Ácido nucleico que codifica RH2.5 R71 V (artificial)

ATGGGCAGCACAGCCATTCTGGGCCTGCTGCTGGCCGTGCTGCAGGGCG
TGTGCGCCGAGGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGAGCCGAGGTGAAGAAGC
CAGGCGCCAGCGTCAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACAGCTTCTC
CGGCTACACCATGAACTGGGTGCGGCAGGCCCCAGGCCAGAGGCTGGAA
TGGATGGGCCTGATCAACCCCTACAACGGCGGCACCAGCTACAACCAGA
ACTTCAAGGGCAGGGTGACACTGACCGTGGATACCAGCGCCAGCACCCGC
CTACCTGGAACCTGAACAGCCTGAGAAGCGAGGACACCGGCGTGTACTAC
TGCGCCAGAGAGGACTACGACGGCTACCTGTACTTCGCCATGGACTACT
GGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC

20 SEC ID Nº: 41 - Secuencia consenso de Kozak (artificial)
AAGCTTGCCGCCACC

LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> Medical Research Council Matthews, David Barlow, Jillian McKenzie, Andrew

<120> Anticuerpos contra IL-25

<130> 4433.1001002

30 <150> US 61/101.293
<151> 30-09-2008

35 <150> GB 0817891.5
<151> 30-09-2008

<160> 41

<170> PatentIn versión 3.3

40 <210> 1
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Secuencia sintética: Dominio VH humanizado

50 <220>
<221> VARIANTE
<222> (30)..(30)
<223> Xaa es Ser o Thr

ES 2 537 226 T3

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa es Gly, Asp, Ala, Ser, Val, Asn, Lys, Tyr o Met

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (48)..(48)
 <223> Xaa es Met o Ile

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (72)..(72)
 <223> Xaa es Val o Arg

20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (100)..(100)
 <223> Xaa es Asp, Asn o Gly

<400> 1

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Xaa Xaa Tyr
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Xaa
 35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Xaa Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Xaa Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

25 <210> 2
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia sintética: Dominio VH humanizado RH2.5_S30T

ES 2 537 226 T3

<400> 2

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

- 5 <210> 3
- <211> 120
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Secuencia sintética: Dominio VH humanizado RH2.5_R71V

<400> 3

ES 2 537 226 T3

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

<210> 4
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética: Dominio VH humanizado RH2

<400> 4

ES 2 537 226 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 5

<211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Dominio VH humanizado

<400> 5

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45

5

10

ES 2 537 226 T3

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 6

<211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Dominio VH humanizado

<400> 6

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

5

10

ES 2 537 226 T3

115

120

5 <210> 7
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia sintética: Dominio VH humanizado

<400> 7

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

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

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

15 <210> 8
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia sintética: Dominio VH humanizado

<400> 8

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

25

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

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 9
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética: Dominio VH humanizado

<400> 9

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys

5

10

ES 2 537 226 T3

85

90

95

Ala Arg Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 10
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética: Dominio VH humanizado

<400> 10

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 11
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética: Dominio VH humanizado

<400> 11

ES 2 537 226 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 12
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia sintética: Dominio VH humanizado

10

<400> 12

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe

ES 2 537 226 T3

<211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia sintética: Dominio VH humanizado

<400> 14

```

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

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

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
           35           40           45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe
           50           55           60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80

Leu Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
           85           90           95

Ala Arg Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp
           100          105          110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
           115           120
    
```

10

<210> 15
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 15

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
           20           25           30
    
```

ES 2 537 226 T3

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Asp Gly Thr Val Glu Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 16
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 16

gacatccaga tgaccagac cacctccagc ctgagcgcca gcctgggcca ccgggtgacc 60
 atcagctgca ggcctccca gggcatcagc aactacctga actggtatca gcagaaggcc 120
 gacggcaccg tcgagctgct gatctactac accagcagcc tgcacagcgg cgtgccccagc 180
 cggtttagcg gcagcggctc cggcaccgac tacagcctga ccactcctcaa cctggaaccc 240
 gaggatatcg ccacctacta ctgccagcag tacagcaagc tgcctacac ctttggcggc 300
 ggaacaaagc tggaaatcaa g 321

10

<210> 17
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 17

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

Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
 20 25 30

Ala Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp
 35 40 45

Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp

ES 2 537 226 T3

50	55	60																	
Ile	Gly	Leu	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Gly	Gly	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Asn				
65					70					75					80				
Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala				
				85					90					95					
Tyr	Met	Glu	Leu	Leu	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr				
			100					105					110						
Cys	Ala	Arg	Glu	Gly	Tyr	Asp	Gly	Tyr	Leu	Tyr	Phe	Ala	Met	Asp	Tyr				
		115					120					125							
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
	130					135													

5 <210> 18
 <211> 417
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 18

10	atggtgctgt	cctgctgta	cctgctgacc	gccctgcccg	gcatcctgag	cgaggtgcag	60
	ctgcagcaga	gcgccctga	gctggtgaag	cctggcgcca	gcatgaagat	cagctgcaag	120
	gccagcggct	acagcttcac	cgactacacc	atgaactggg	tgaagcagag	ccacggcaag	180
	aacctggaat	ggatcggcct	gatcaacccc	tacaacggcg	gcaccagcta	caaccagaac	240
	ttcaagggca	aggccaccct	gaccgtggac	aagagcagca	gcaccgccta	catggaactg	300
	ctgtctctga	ccagcgagga	cagcgccgtg	tactactgcg	ccagagaggg	ctacgacggc	360
	tacctgtact	tcgccatgga	ctactggggc	cagggcacca	gcgtgaccgt	gagcagc	417

15 <210> 19
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 19

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

ES 2 537 226 T3

Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Asn Trp Ile Gly Trp Val
 35 40 45

Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Phe Pro
 50 55 60

Gly Asp Ser Asp Thr Ile Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Val Asp Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser
 85 90 95

Leu Lys Ala Thr Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Asn Pro
 100 105 110

Pro Glu Tyr Ser Gly Ala Tyr His Asp Gly Trp Phe Asp Pro Trp Gly
 115 120 125

Gln Gly Thr Leu Val Ile Val Ser Ser
 130 135

<210> 20
 <211> 411
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 20

ctcctcctgg ctgttctcca aggagtctgt gccgaggtgc gccttggtgca gtctggagca 60
 gaggtgaaaa agccggggga gtctctgaag atctctgta aggcttctgg atacagtttt 120
 accagtaact ggatcggtctg ggtgcgccag atgcccggga aaggcctgga gtggattggg 180
 atcatctttc ctggtgactc tgataccata tacagcccgt ccttccaagg ccaggtcacc 240
 atttcagtcg acaagtccat caataccgcc tacctgcagt ggagcagcct gaaggccacg 300
 gacaccgcca tgtattactg tgcgagacag aacccccccg agtatagtgg cgcataatcat 360
 gatgggtggt tcgaccctg gggccagga accctggtca tcgtctctc a 411

10

<210> 21
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Secuencia sintética: Dominio VH de RHA

20

<400> 21

ES 2 537 226 T3

<210> 23
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 23

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

10

<210> 24
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 24

atgaggggtcc ctgctcagct cctgggactc ctgctgctct ggctcccaga taccagatgt 60
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 120
 atcaacttgcc gggcgagtc gggcattagc aattatcttag cctgggatca gcagaaacca 180
 gggaaagttc ctaaactcct gatctatgct gcattccactt tgcaatcagg ggtcccatct 240
 cggttcagcg gcagtgatc tgggacagat ttcactotca ccatcagcag cctgcagcct 300
 gaagatggtg caacttatta ctgtcaaaag tataacagtg ccccgtagac ttttgccag 360
 gggaccaagc tggagatcaa a 381

20

<210> 25
 <211> 127

ES 2 537 226 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia sintética: Dominio VK de 2c3 humanizado RKA

<400> 25

```

Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1           5           10           15

Asp Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
           20           25           30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Gly
           35           40           45

Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro
           50           55           60

Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser
65           70           75           80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
           85           90           95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser
           100          105          110

Lys Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           115          120          125
    
```

10 <210> 26
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Secuencia sintética: Ácido nucleico que codifica el dominio VK de 2c3 humanizado RKA

20 <400> 26

```

atgaggggtcc ctgctcagct cctgggactc ctgctgctct ggctcccaga taccagatgt      60
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      120
    
```

atcacttgca gtgcatccca gggcattagc aattatctga attggtatca gcagaaacca 180
 gggaaagttc ctaaactcct gatctattac acatcaagtt tacactcagg ggtcccatct 240
 cggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 300
 gaagatgttg caacttatta ctgtcagcag tatagcaagc tgccgtacac gtttggccag 360
 gggaccaagc tggagatcaa a 381

<210> 27
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 27

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Gly Gly Thr Gly Phe Thr Lys Tyr Ser Gln Asn Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Pro Tyr Asn Asn Tyr Ala Ala Glu Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

<210> 28
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 28

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaagtt 60

ES 2 537 226 T3

tcgtgcaagg cttctggata ctccttcagt agttatggta tacattgggt gcgccaggcc 120
cccggacaaa ggcttgagtg gatgggatgg atcaacgggtg gcaactggttt tacaaaatat 180
tcacagaatt ttcagggcag agtcacccta accagggaca cttccgcgag cacagcctac 240
ttggaactga acagcctgag atctgaagac acgggtgtat attactgtgc gagggatccc 300
tacaataact acgcggcgga acttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
tca 363

5 <210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
<400> 29

10 Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

15 <210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
<400> 30

20 Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5

25 <210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
<400> 31

30 Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Tyr Thr
1 5

35 <210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
<400> 32

Asp Tyr Thr Met Asn
1 5

40 <210> 33
<211> 13
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
<400> 33

45 Glu Gly Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr
1 5 10

ES 2 537 226 T3

<210> 34
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Secuencia sintética: CDR1 de la cadena pesada

10

<400> 34

Gly Tyr Thr Met Asn
1 5

<210> 35
<211> 17
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

15

<400> 35

Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe Lys
1 5 10 15

20

Gly

<210> 36
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> Secuencia sintética: CDR3 de la cadena pesada

30

<400> 36

Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr
1 5 10

35

<210> 37
<211> 19
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

40

<400> 37

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

45

Val Cys Ala

<210> 38
<211> 20
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 38

ES 2 537 226 T3

Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

Asp Thr Arg Cys
 20

5 <210> 39
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 39

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Pro Asp Thr Arg Cys
 20

10 <210> 40
 <211> 423
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética: Ácido nucleico que codifica RH2.5 R71V

20 <400> 40

atgggcagca cagccattct gggcctgctg ctggccgtgc tgcagggcgt gtgcgccgag 60
 gtgcagctgg tcgagagcgg agccgaggtg aagaagccag gcgccagcgt caaggtgtcc 120
 tgcaaggcca gcggtacag cttctccggc tacaccatga actgggtgcg gcaggcccca 180
 ggccagagggc tggaatgat gggcctgatc aacctctaca acggcggcac cagctacaac 240
 cagaacttca agggcagggt gacactgacc gtggatacca gcgccagcac cgctacctg 300
 gaactgaaca gcctgagaag cgaggacacc ggcgtgtact actgcgccag agaggactac 360
 gacggctacc tgtacttcgc catggactac tggggccagg gcaccctggt gaccgtgagc 420
 agc 423

25 <210> 41
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia sintética: Secuencia consenso de Kozak

<400> 41
 35 aagcttgccg ccacc 15

REIVINDICACIONES

1. Un miembro de unión a diana que se une a IL-25, que comprende un dominio VL de anticuerpo que comprende las CDR 1-3 de Kabat como se expone como los restos 24-34 (SEC ID N°: 29); 50-56 (SEC ID N°: 30) y 89-97 (SEC ID N°: 31), respectivamente, de SEC ID N°: 15 y un dominio VH de anticuerpo que comprende SEC ID N°: 1:

10 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe **Xa1** **Xa2** Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp **Xa3** Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr **Xa4** Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu **Xa5** Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser en donde:

15 Xa1 es Ser o Thr;
Xa2 es Gly, Asp, Ala, Ser, Val, Asn, Lys, Tyr o Met;
Xa3 es Met o Ile;
Xa4 es Val o Arg; y
Xa5 es Asp, Asn o Gly.

20 2. El miembro de unión a diana de la reivindicación 1, en el que

25 (a) Xa2 es Gly y Xa5 es Asp o Asn;
(b) Xa2 es Gly y Xa5 es Asp
(c) Xa1 es Ser;
(d) Xa1 es Thr;
(e) Xa3 es Met;
(f) Xa3 es Ile;
(g) Xa4 es Val; o
(h) Xa4 es Arg.

30 3. El miembro de unión a diana de la reivindicación 1, en el que los restos Xa1 - Xa5 están en las siguientes combinaciones:

Res de Kabat:	30	31	48	71	96
Posición en SEC ID N°: 1:	30	31	48	72	100
Res de la lista de sec:	Xa1	Xa2	Xa3	Xa4	Xa5
SEC ID N°: 2	Ser	Gly	Met	Val	Asp
SEC ID N°: 3	Thr	Gly	Met	Arg	Asp
SEC ID N°: 4	Ser	Gly	Met	Arg	Asp
SEC ID N°: 5	Thr	Gly	Met	Val	Asp
SEC ID N°: 6	Ser	Asp	Met	Val	Asp
SEC ID N°: 7	Thr	Asp	Met	Arg	Asp
SEC ID N°: 8	Thr	Asp	Met	Val	Asp
SEC ID N°: 9	Ser	Gly	Ile	Val	Asp
SEC ID N°: 10	Thr	Gly	Ile	Arg	Asp
SEC ID N°: 11	Thr	Gly	Ile	Val	Asp
SEC ID N°: 12	Ser	Asp	Ile	Val	Asp
SEC ID N°: 13	Thr	Asp	Ile	Arg	Asp
SEC ID N°: 14	Thr	Asp	Ile	Val	Asp

35 4. El miembro de unión a diana de la reivindicación 1:

40 (a) en el que el dominio VL incluye adicionalmente los restos 35-38 de SEC ID N°: 15 adyacentes a CDR1 (SEC ID N°: 29);
(b) que comprende SEC ID N°: 15;
(c) en el que el dominio VL es humanizado; o
(d) en el que el dominio VL es humanizado, y la secuencia del miembro de unión a diana comprende los aminoácidos 21-127 de SEC ID N°: 25.

45 5. El miembro de unión a diana de la reivindicación 1, que es un fragmento de anticuerpo Fab, F(ab')₂, scFv o Fv.

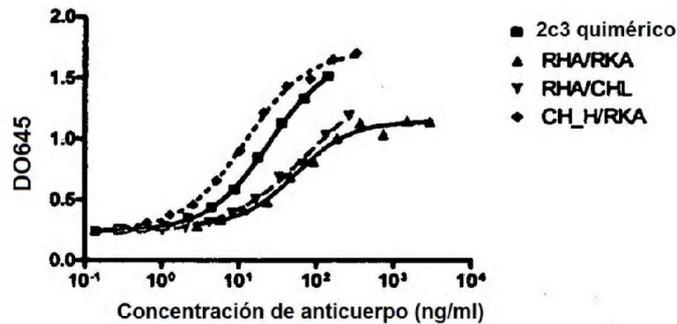
6. El miembro de unión a diana de la reivindicación 1 que comprende una región constante de anticuerpo.

7. El miembro de unión a diana de la reivindicación 6, en el que la región constante es una región constante de IgG1 o IgG4 humana.

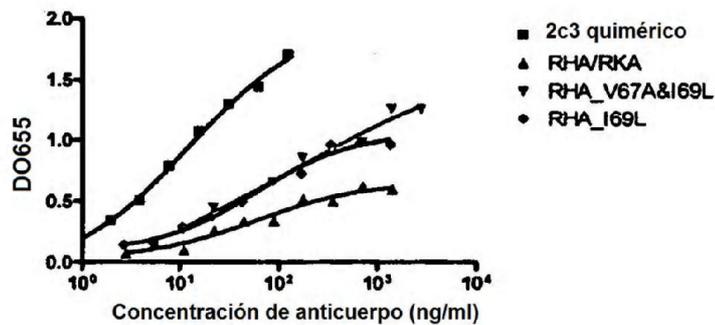
8. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el miembro de unión a diana de la reivindicación 1.
- 5 9. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 8 operativamente ligado a un promotor.
10. Una célula huésped que lleva el vector de expresión de la reivindicación 9.
- 10 11. Un método de producción de un miembro de unión a diana, comprendiendo el método cultivar células huésped según la reivindicación 10 en condiciones para la producción de dicho miembro de unión a diana, método que comprende opcionalmente además aislar dicho miembro de unión a diana, y opcionalmente comprende además formular el miembro de unión a diana en una composición que incluya al menos un componente adicional.
- 15 12. Una composición que comprende el miembro de unión a diana de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, composición que está opcionalmente en forma de un polvo liofilizado.
13. El miembro de unión a diana de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en el tratamiento o la prevención de:
- 20 (a) asma;
 (b) enfermedad inflamatoria del intestino;
 (c) colitis ulcerosa; o
 (d) enfermedad de Crohn.
- 25 14. Un método de producción de un anticuerpo contra IL-25, que comprende:
- (a) proporcionar un dominio VH de anticuerpo que comprende SEC ID N°: 1:
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 Tyr Ser Phe **Xa1** **Xa2** Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp **Xa3** Gly Leu Ile Asn
 30 Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr **Xa4** Asp Thr Ser Ala Ser Thr
 Ala Tyr Leu Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu **Xa5** Tyr Asp Gly Tyr
 Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 en donde:
- 35 Xa1 es Ser o Thr;
 Xa2 es Gly, Asp, Ala, Ser, Val, Asn, Lys, Tyr o Met;
 Xa3 es Met o Ile;
 Xa4 es Val o Arg; y
 Xa5 es Asp, Asn o Gly;
- 40 (b) combinar dicho dominio VH con una pluralidad de dominios VL de anticuerpo para proporcionar moléculas de anticuerpo;
 (c) cribar dichas moléculas de anticuerpo para unirse a IL-25; y
 (d) seleccionar una molécula de anticuerpo que se une a IL-25.
- 45 15. El miembro de unión a diana de la reivindicación 1, que comprende un anticuerpo completo.

Figura 7 Comparación del anticuerpo humanizado RHA/RKA de 2c3 y variantes con 2c3 quimérico.

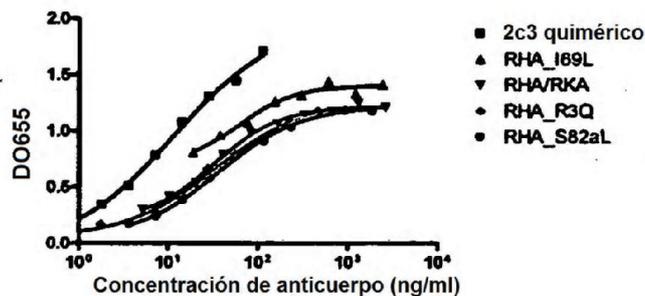
A



B

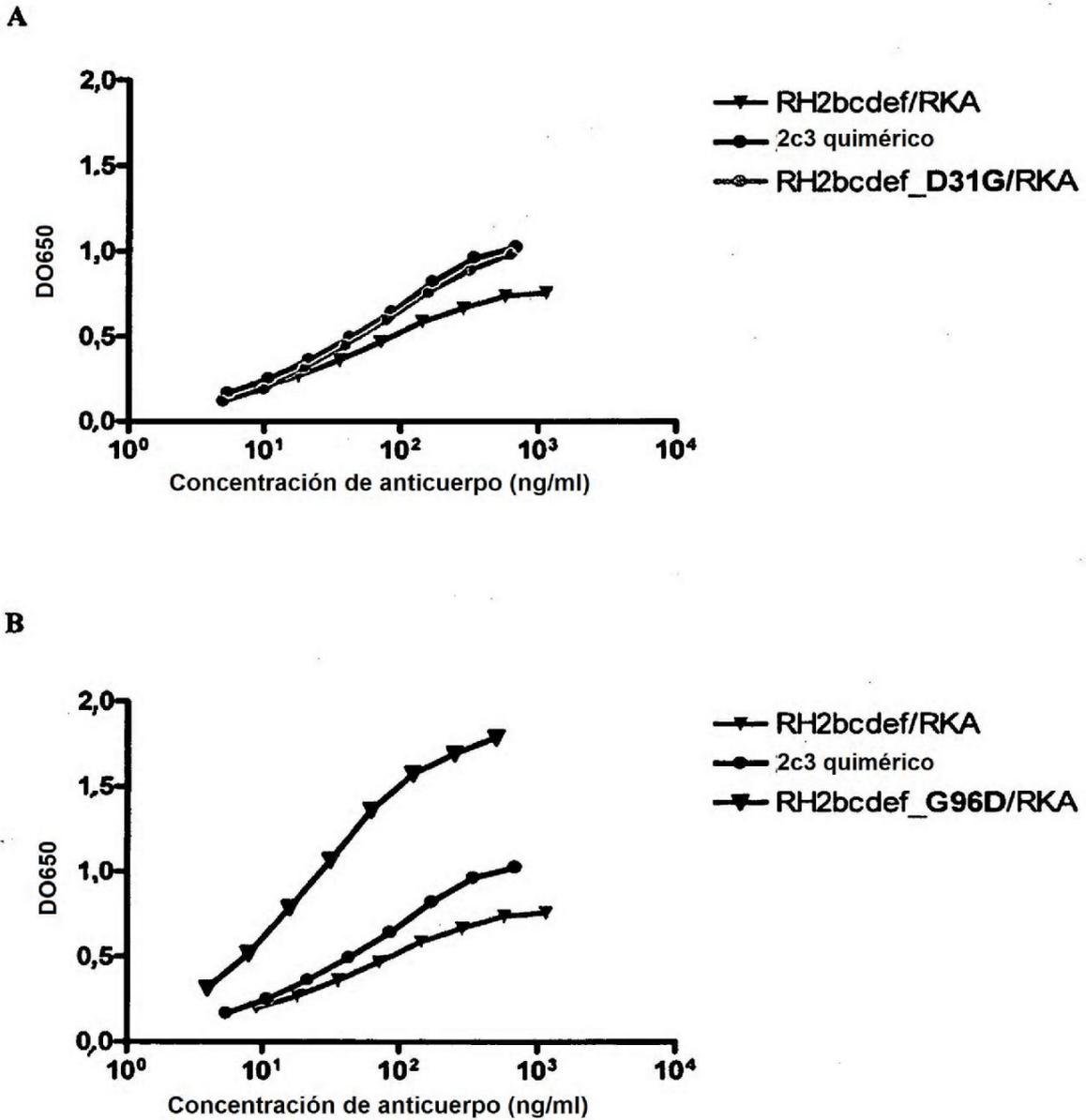


C



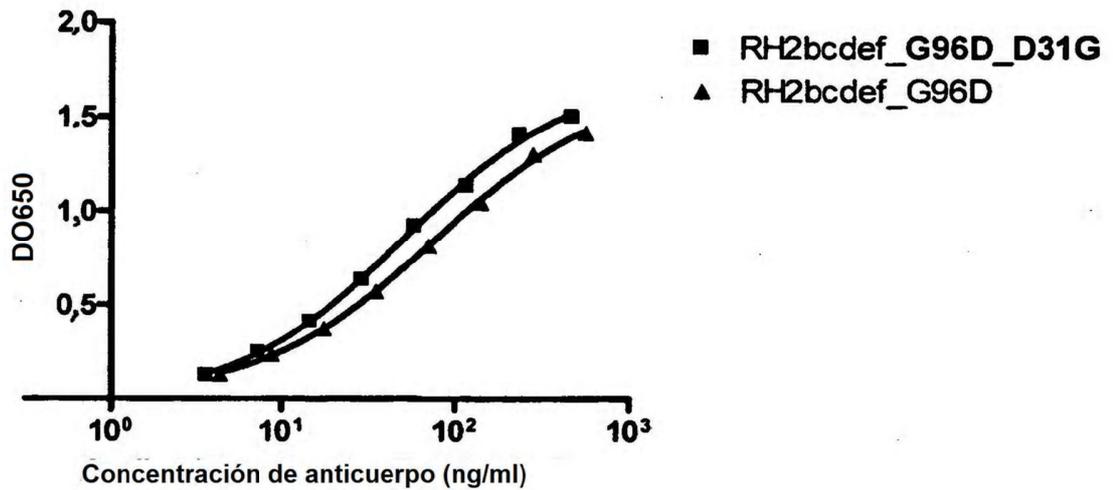
Comparación de unión a IL-25 por anticuerpos 2c3 recombinantes. A. Codificado por RHA de 2c3 o RKA de 2c3 co-expresado con la cadena pesada de 2c3 quimérico (CH_H) o la cadena ligera kappa de 2c3 (CHL) comparado con el anticuerpo 2c3 completamente quimérico (CH_H + CHL) B. Codificado por mutantes de RHA de 2c3 RH_V67A&169L de 2c3 o RH_169L de 2c3 co-transfectados con RKA de 2c3 y comparado con 2c3 quimérico o anticuerpos RHA/RKA de 2c3 humanizados no mutados C. Codificado por mutantes de RHA I69L, R3Q, S82aL co-transfectados con RKA de 2c3 y comparado con los anticuerpos 2c3 quiméricos o RHA/RKA de 2c3 humanizados no mutados. La unión a IL-25 se midió mediante ELISA.

Figura 9 Efecto de mutaciones de CDR específicas para la unión de RH2bcdef de 2c3 a IL-25.



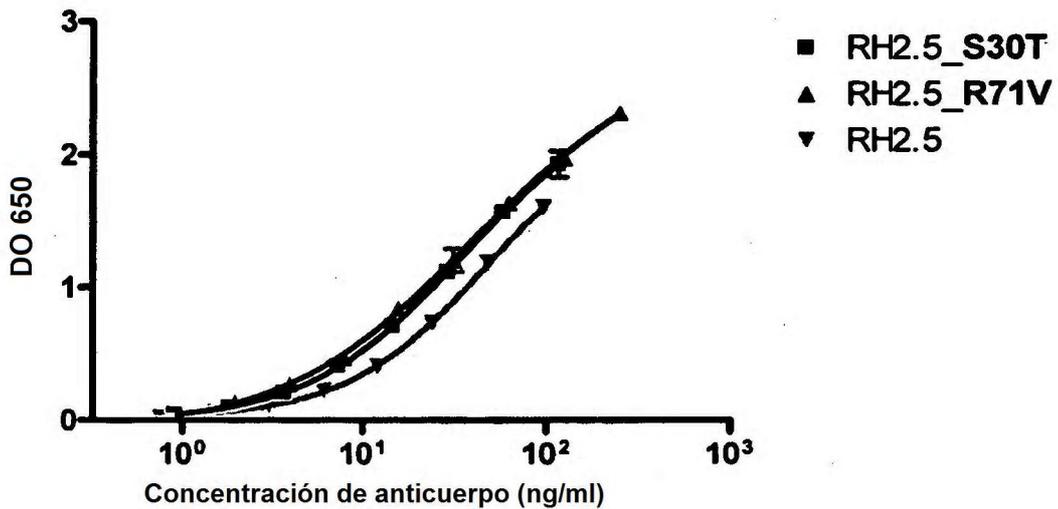
La mutación de la cadena pesada de RH2bcdef de 2c3 en dos posiciones en sus CDR. Se co-transfectaron células HEK 293T con tanto RH2bcdef/RKA de 2c3 como construcciones quiméricas de 2c3 más A. Mutación de CDR en la posición 31 de aspartato a glicina (RH2bcdef_D31G de 2c3) o B. Mutación de CDR en la posición 96 de glicina a aspartato. La unión a IL-25 humano se midió mediante ELISA.

Figura 10 Efecto sobre la unión a IL-25 combinando mutaciones de CDR D31G y G96D



Se mutagenizó RH2bcdef de 2c3 de la cadena pesada humanizada y se combinaron los mutantes D31G y G96D. Se co-transfectaron células HEK 293T con tanto RH2bcdef_G96D_D31G/RKA de 2c3 como RH2bcdef_G96D/RKA de 2c3 y los sobrenadantes se recogieron después de 3 días. La unión de anticuerpo a IL-25 humana se midió mediante ELISA.

Figura 11 Comparación de la unión de RH2.5_S30T de 2c3 y RH2.5_R71V de 2c3 a IL- 25



RH2.5 es la versión optimizada de codón de RH2 más las mutaciones D31G y G29D. Se examinó el residuo de VCI sin probar restante, S30T, y su unión a IL-25 mediante ELISA se comparó con RH2.5_R71V y RH2.5. Se co-transfectaron células HEK 293T con RH2.5_S30T o RH2.5_R71V o RH2.5 y la construcción de cadena ligera RKA. Después de tres días, los sobrenadantes se recogieron y la unión a IL-25 se midió mediante ELISA.

Figura 12 Modelo de ratón *in vivo* de HVR.

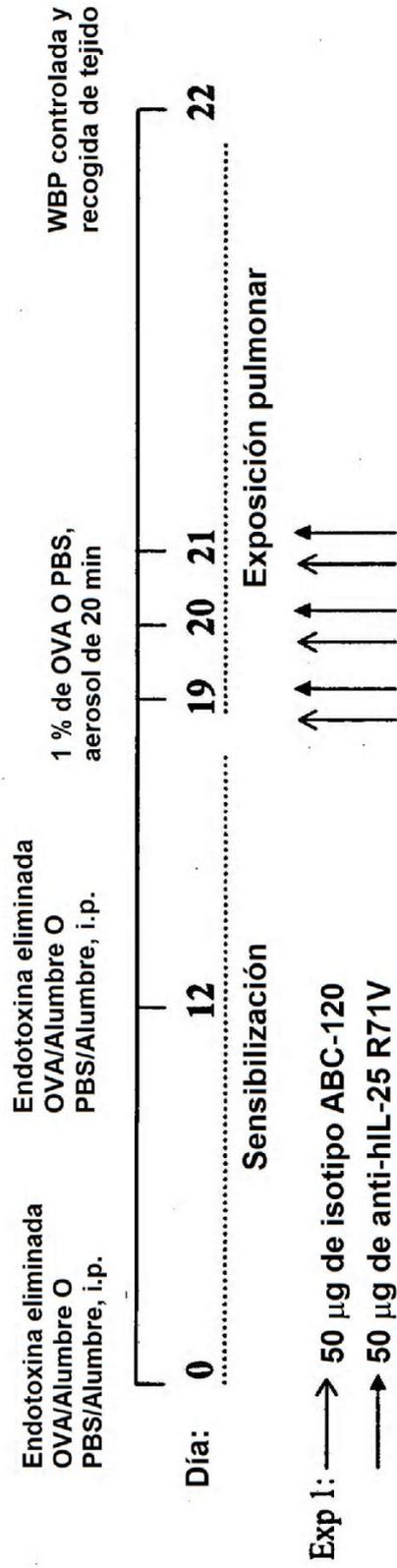
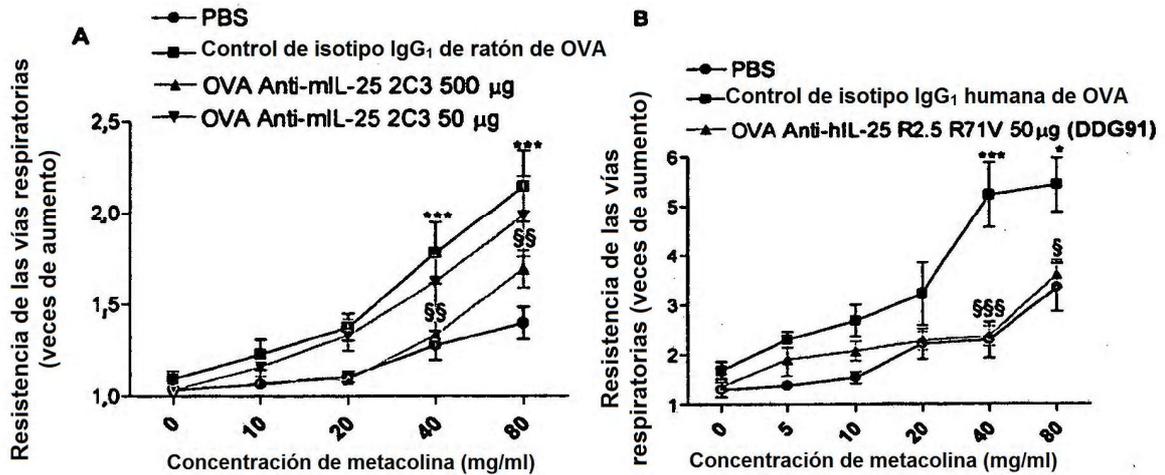


Figura 13 Efecto de administrar RH2.5_R71V de 2c3 a resistencia pulmonar en respuesta a metacolina.



El tratamiento con 2c3 anti-mIL25 o RH2.5 R71V de 2c3 anti-IL-25 durante la fase de exposición pulmonar en un modelo de asma de ratón experimental agudo bloquea HVR. La resistencia de las vías respiratorias se midió mediante pletismografía de cuerpo entero restringida como respuesta a PBS y después a concentraciones crecientes de metacolina. (A) Los ratones recibieron 2c3 anti-mIL-25 antes de cada exposición con aerosol de OVA a una dosis de 500 µg o a 50 µg. (B) Los ratones recibieron RH2.5 R71V anti-IL-25 antes de cada exposición con aerosol de OVA a una dosis de 50 µg. Se usó un ANOVA bilateral con prueba posterior de Bonferroni para evaluar las diferencias estadísticas. *, ** y *** indican un valor de significación de $p < 0,05$; $p < 0,01$ y $p < 0,001$ entre ratones tratados con PBS y con isotipo IgG₁ de OVA. §, §§ y §§§ indica un valor de significación de $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$ entre ratones tratados con isotipo IgG₁ de OVA y anti-IL-25.

Figura 14

