

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 637**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2012 E 12704831 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015 EP 2678358**

54 Título: **Anticuerpos contra IL33R humano y la utilización de los mismos**

30 Prioridad:

23.02.2011 EP 11155684

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

30.10.2015

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)

Grenzacherstrasse 124

4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

FERTIG, GEORG;

GEORGES, GUY;

KALUZA, KLAUS;

LIFKE, VALERIA;

MOELLEKEN, JOERG;

OFFNER, SONJA;

PASHINE, ACHAL;

SEEBER, STEFAN y

FISCHER, JENS

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 549 637 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 IL33R humano y la utilización de los mismos

- 5 La presente invención está relacionada con anticuerpos contra IL33R humano (anticuerpo IL33R), los métodos para su producción, las composiciones farmacéuticas que contienen dichos anticuerpos y la utilización de los mismos.

Antecedentes de la invención

- 10 La IL33 humana es una citoquina de tipo interleuquina-1 de la familia IL-1 que señala a través del receptor de IL33 relacionado con el receptor de IL-1 (sinónimos del receptor: IL1RL1, T1/ST2) e induce las citoquinas asociadas a T ayudantes de tipo 2. Son sinónimos de IL33 (Nº registro en Swiss-Prot Nº 095760) son miembro 11 de la familia de la interleuquina-1 (IL-1F11) y factor nuclear de las vénulas endoteliales altas (NF-HEV). El NF-HEV se describe en Baekkevold, E.S., et al., *Am. J. Pathol.* 163 (2003) 69-79. IL33 es descrito por Schmitz, J., et al., *Immunity* 23 (2005) 479-490.

- 15 El receptor de IL33 humano, IL33R, (sinónimo de ILRL1; Nº registro en SwissProt Q01638; otros nombres son ST2, T1/ST2, Fit-1 y DER4) es inducido por la estimulación del crecimiento en células fibroblásticas, y también puede ser inducido por estimulación de un antígeno en las células Th2. Según la invención, IL33R y ST2 indican el IL33R humano. Tominaga, S., et al, (*FEBS Lett* 258 (1989) 301-304; *Biochim. Biophys. Acta* 1171 (1992) 215-218) y Yanagisawa, K., (*FEBS Lett* 318 (1993) 83-87) identificaron el ST2 humano (la forma secretada), ST2L (la forma del receptor transmembrana) y ST2V (variante Glu-78). El ST2 humano sólo se expresa en células BALB/c-3T3 en las que se ha estimulado el crecimiento y es un miembro de la familia de genes de respuesta primaria inducidos por factores de crecimiento: ST2 codifica una proteína similar en secuencia a la porción extracelular del receptor humano de la interleuquina 1, tanto de tipo 1 como 2. Los estudios con ratones en los que se ha anulado IL33R sugieren que IL33R está involucrado en los eventos tempranos de la respuesta TH2 (Kropf, P., et al, *Infect Immunity* 70 (2002) 5512-5520; Hoshino, K., et al, *J. Exp Med* 190 (1999) 1541-1548; Senn, et al., *Eur J. Immunol* 30 (2000) 1929-1938; Townsend, M.J., et al, *J. Exp Med* 191 (2000) 1069-1076). Se supone que ST2 es un marcador, activador y regulador de la inmunidad TH2 (Kumar, R.K., et al., *Clin. Exp. Allergy* 32 (2002) 1394-96).

- 20 Los anticuerpos anti-IL33R y su papel en la función inmune se describen en una serie de publicaciones. El anticuerpo anti-ST2 humano Mab523 y el anticuerpo policlonal AF523 están disponibles a nivel comercial en R&D Systems (<http://www.rndsystems.com>). El anticuerpo anti-ST2 humano HB12 está disponibles a nivel comercial en antibodies-online GmbH, Alemania y MBL Int. Corp. (www.mblintl.com). Los anticuerpos anti-IL33R resultaron en una disminución de la respuesta inmunes de tipo TH2. El anticuerpo inhibe la infiltración de eosinófilos, la producción de IL-5 y la producción de IgE. La evaluación de la función de ST2 en modelos animales para el asma resultó en una mayor expresión del IL33R murino en las células T CD4⁺, lo que indica un papel de IL33R en las respuestas alérgicas o asmáticas (Löhning, M., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 6930-6935 y Xu, D., et al, *J. Exp Med* 187 (1998) 787-794; Coyle, A.J., et al, *J. Exp Med* 190 (1999) 895-902). Meisel, C., et al., *J. Immunol.* 166 (2001) 3143-3150 investigaron la regulación y función de la expresión de T1/ST2 en las células T CD4⁺ y la inducción de la producción de citoquinas de tipo 2 por unión cruzada de T1/ST2. Löhning, M., et al., generaron un anticuerpo anti-ST2 de ratón en ratas. El pretratamiento con 20 µg (aprox. 0,8 mg/kg) de un anticuerpo tal 1 hora antes de una provocación con un alérgeno redujo el número de eosinófilos en las vías respiratorias del ratón en un 70%. Kumar, S., et al. (*Biochem. Biophys. Res. Comm.* 235 (1997) 474-478 y *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 27905-27913) describieron la expresión de la proteína ST2 detectada por inmunoprecipitación usando un anticuerpo policlonal de conejo generado contra el receptor ST2 soluble purificado expresado en *Drosophila*. Los estudios con ratones BALB/c revelaron que el tratamiento con el anticuerpo anti-IL33 indujo una mayor respuesta de tipo TH1. Un sistema de ELISA para cuantificar la proteína ST2 humana en sueros de pacientes fue descrito por Kuroiwa, K., et al., *Hybridoma* 19 (2000) 151-159. Los anticuerpos anti-IL33R también reducen los efectos debidos a las infecciones con RSV (Walzl, et al., *J. Exp. Med.* 193 (2001) 785-792). También se investigaron los anticuerpos anti-IL33R en un modelo animal de artritis (Leung, B.P., et al, *J. Immunol* 173 (2004) 145-150; Walzl, et al, *J. Exp Med* 193 (2001) 785-792). Smithgall, M.D., et al., *Int. Immunol.* 20 (2008) 1019-1030 investigaron los niveles de interferón γ en células NK en presencia de un anticuerpo anti-huST2. IL33R y/o los anticuerpos contra IL33R se mencionan en los documentos WO 2005/079844, US 7087396, WO 2001/021641, WO 2002/038794, WO 2003/094856. Oboki, K., et al., *Allergology Int.* 59 (2010) 143-160, revisaron el papel de la IL-33 y los de receptores de IL-33 en la defensa y las enfermedades del huésped y los efectos de los anticuerpos anti-ST2, ST2 soluble y el anticuerpo anti-IL-33 sobre la inflamación de las vías respiratorias del ratón. La WO 99/34217 se refiere a una forma de la proteína ST2 unida a membrana de la proteína conocida como ST2L y el desarrollo de reactivos como anticuerpos, ligandos, agonistas y/o antagonistas específicos de ST2L.

Resumen de la invención

- La invención comprende un anticuerpo de unión a IL33R, que se caracteriza porque el dominio variable de la cadena pesada comprendel Id. de Sec. Nº: 7 y el dominio variable de la cadena ligera comprendel Id. de Sec. Nº: 8. Preferiblemente, el anticuerpo de unión a IL33R y que se caracteriza por las secuencias de aminoácidos y los fragmentos de secuencia de aminoácidos anteriormente mencionadas, es de isotipo IgG1 humano modificado en la

región de bisagra en la posición de aminoácido 216-240, preferiblemente en la posición de aminoácido 220-240, entre C_{H1} y C_{H2} y/o en la segunda región inter-dominio en la posición de aminoácido 327-331 entre C_{H2} y C_{H3}. Preferiblemente, el anticuerpo comprende las mutaciones L234A (alanina en lugar de leucina en la posición del aminoácido 234) y L235A. Una región constante de la cadena pesada preferible incluye las mutaciones L234A y L235A como se muestra en el Id. de Sec. N°: 9. Preferiblemente, el anticuerpo que se une a IL33R y que se caracteriza por las secuencias de aminoácidos y fragmentos de secuencia de aminoácidos anteriormente mencionados, es de isotipo IgG4 humano modificada en la región de bisagra en la posición de aminoácido 216-240, preferiblemente en la posición de aminoácido 220-240, entre C_{H1} y C_{H2} y/o en la segunda región inter-dominio en el aminoácido 327-331 entre C_{H2} y C_{H3}. Preferiblemente, el anticuerpo comprende las mutaciones L235E (ácido glutámico en lugar de leucina en la posición del aminoácido 235) y S228P (prolina en lugar de serina en la posición del aminoácido 228).

El anticuerpo ra170 (Mab ra170) es una forma de realización preferida de la invención. Una realización adicional de la invención es una variante de anticuerpo quimérico, humanizado o en el que se ha eliminado el epitopo de células T del anticuerpo ra170.

Las variantes de anticuerpos humanizados preferibles del anticuerpo ra170 se caracterizan por que el dominio variable de la cadena pesada comprendel Id. de Sec. N°: 21 o 25. Preferiblemente, el anticuerpo humanizado se caracteriza por que el dominio variable de cadena ligera comprendel Id. de Sec. N°: 30.

El anticuerpo se une específicamente a IL33R con una afinidad de 10^{-10} M o inferior.

Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o humano. Preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la invención inhibe la unión de IL33 a IL33R con un valor de IC50 de 0,32 nM para IL33 / IL33R humanos y de 0,13 nM para IL33 / IL33R de cynomolgus.

Los anticuerpos según la invención muestran preferentemente valores de CI50 de 5 nM o inferior en el ensayo de eosinófilos, ensayo de mastocitos, ensayo de Th2 o el ensayo de basófilos (IL-5). Dichos anticuerpos son especialmente útiles en el tratamiento de la artritis reumatoide, el asma o la colitis ulcerosa.

Una realización adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención. Preferiblemente, el anticuerpo de la composición farmacéutica que se une a IL33R con una afinidad de al menos de 10^{-8} M⁻¹ a 10^{-12} M⁻¹, preferiblemente es de isotipo IgG1 humano modificado en la región de bisagra en la posición de aminoácido 216-240, preferiblemente en la posición de aminoácidos 220-240, entre C_{H1} y C_{H2} y/o en la segunda región inter-dominio en la posición aminoacídica 327-331 entre C_{H2} y C_{H3}. Preferiblemente, el anticuerpo es de isotipo IgG1 humano que comprende mutaciones L234A (alanina en lugar de leucina en la posición del aminoácido 234) y L235A o de isotipo IgG4 humano que comprende las mutaciones S228P y L235E.

Una realización adicional de la invención es la utilización de un anticuerpo de acuerdo con la invención para la fabricación de una composición farmacéutica. Preferiblemente, el anticuerpo de la composición farmacéutica que se une a IL33R con una afinidad de al menos de 10^{-8} M⁻¹ a 10^{-12} M⁻¹, es preferiblemente de isotipo IgG1 humano modificado en la región bisagra en la posición de aminoácido 216-240, preferiblemente en la posición de aminoácidos 220-240, entre C_{H1} y C_{H2} y/o en la segunda región inter-dominio en la posición aminoacídica 327-331 entre C_{H2} y C_{H3}. Preferiblemente, el anticuerpo es de isotipo IgG1 humano que comprende mutaciones L234A (alanina en lugar de leucina en la posición del aminoácido 234) y L235A o es de isotipo IgG4 humano que comprende las mutaciones S228P y L235E.

Una realización adicional de la invención es un anticuerpo de acuerdo con la invención para su utilización en el tratamiento de la colitis ulcerosa o asma. Una realización adicional de la invención es un método para la fabricación de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención. Preferiblemente, el anticuerpo de la composición farmacéutica que se une a IL33R con una afinidad de al menos de 10^{-8} M⁻¹ a 10^{-12} M⁻¹, es preferiblemente del isotipo IgG1 humano modificado en la región bisagra en la posición de aminoácido 216-240, preferiblemente en la posición de aminoácidos 220-240, entre C_{H1} y C_{H2} y/o en la segunda región inter-dominio en la posición aminoacídica 327-331 entre C_{H2} y C_{H3}. Preferiblemente, el anticuerpo es de isotipo IgG1 humano que comprende mutaciones L234A (alanina en lugar de leucina en la posición del aminoácido 234) y L235A o es de isotipo IgG4 humano que comprende las mutaciones S228P y L235E.

Una realización adicional de la invención es un ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un anticuerpo de unión a IL33R, que se caracteriza por que comprende un dominio variable de la cadena pesada del Id. de Sec. N°: 7 y un dominio de cadena ligera variable del Id. de Sec. N°: 8, y preferiblemente las mutaciones L234A y L235A en el dominio constante la cadena pesada de la IgG1 humana o las mutaciones S228P y L235E en el dominio constante de la cadena pesada de la IgG4 humana.

Una realización adicional de la invención es un ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un anticuerpo de unión a IL33R, que se caracteriza por que comprende un dominio variable de la cadena pesada del Id. de Sec. N°:

21 y un dominio variable de cadena ligera de Id. de Sec. N°: 3, y preferiblemente las mutaciones L234A y L235A en el dominio constante de la cadena pesada de la IgG1 humana o las mutaciones S228P y L235E en el dominio constante de la cadena pesada de la IgG4 humana.

5 Una realización adicional de la invención es un ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un anticuerpo de unión a IL33R, que se caracteriza por que comprende un dominio variable de la cadena pesada del Id. de Sec. N°: 25 y un dominio variable de cadena ligera de Id. de Sec. N°: 30, y preferiblemente las mutaciones L234A y L235A en el dominio constante de la cadena pesada de la IgG1 humana o las mutaciones S228P y L235E en el dominio constante de la cadena pesada de la IgG4 humana.

10 El anticuerpo de acuerdo con la invención se caracteriza preferiblemente por que las cadenas constantes son de origen humano. Tales cadenas constantes son bien conocidas en el estado de la materia y, las ha descrito por ejemplo Kabat (Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), y Johnson, G. y Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218).
 15 Por ejemplo, una región constante de la cadena pesada humana útil comprende una secuencia de aminoácidos del Id. de Sec. N°: 9 (IgG1 humana, incluyendo las mutaciones L234A y L235A) o del Id. de Sec. N°: 29 (IgG4 humana, incluyendo las mutaciones S228P y L235E). Por ejemplo, una región constante de cadena ligera humana útil comprende una secuencia de aminoácidos de una región constante de la cadena ligera kappa de Id. de Sec. N°: 12 o 34. Además, es preferible que el anticuerpo sea de origen murino y que comprenda la secuencia variable marco
 20 del anticuerpo de un anticuerpo de ratón de acuerdo con Kabat (Kabat, E.A., et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991); y Johnson, G. y Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218).

25 El anticuerpo de acuerdo con la invención se caracteriza especialmente por inhibir la unión de IL33 a IL33R y por lo tanto por inhibir la señalización a través del complejo de señalización de IL-33R/ IL-1RacP.

El anticuerpo de acuerdo con la invención es preferiblemente de isotipo IgG1 humano. Las regiones constantes de la cadena pesada y1 preferibles se muestran en el Id. de Sec. N°: 10 o 29 y en el Id. de Sec. N°: 11, sin las mutaciones L234A y L235A. Una región constante de cadena ligera kappa preferible se muestra en el Id. de Sec. N°: 12 o 34.

30 El anticuerpo de acuerdo con la invención se caracteriza preferiblemente por no unirse al factor del complemento humano C1q y evitar por lo tanto la función efectora CDC.

35 El anticuerpo de acuerdo con la invención es preferiblemente de isotipo IgG1 humano modificado en la región bisagra en la posición de aminoácido 216-240, preferiblemente en la posición de aminoácido 220 hasta 240, entre C_H1 y C_H2 y/ o en la segunda región inter-dominio en la posición de aminoácidos 327 a 331 entre C_H2 y C_H3. El anticuerpo de acuerdo con la invención se caracteriza preferiblemente por ser de isotipo IgG1 humano, y por contener al menos una mutación en L234 (leucina en la posición del aminoácido 234), L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331, y/ o P329 (numeración de acuerdo con el índice de la UE). Preferiblemente, el anticuerpo es de
 40 isotipo IgG1 humano que comprende las mutaciones L234A (alanina en lugar de leucina en la posición del aminoácido 234) y L235A o es de isotipo IgG4 humano que comprende las mutaciones S228P y L235E.

45 La invención proporciona además vectores de expresión que contienen un ácido nucleico de acuerdo con la invención capaz de expresar dicho ácido nucleico en una célula huésped procariota o eucariota, y las células huésped que contienen tales vectores para la producción recombinante de tal anticuerpo. La invención comprende además una célula huésped procariota o eucariota que comprende un vector de acuerdo con la invención. La invención además comprende un método para la producción de un anticuerpo humano o humanizado recombinante de acuerdo con la invención, que se caracteriza por expresar un ácido nucleico de acuerdo con la invención en una célula huésped procariota o eucariota y por la recuperación de dicho anticuerpo a partir de dicha célula o del sobrenadante del cultivo celular. La invención comprende además el anticuerpo que se puede obtener mediante dicho método recombinante.

50 Los anticuerpos según la invención muestran beneficios para los pacientes en necesidad de una terapia focalizada en IL33R. Los anticuerpos de acuerdo con la invención tienen propiedades nuevas e inventivas que aportan un
 55 beneficio especialmente para un paciente que padece una enfermedad inmunológica, especialmente si sufre de artritis reumatoide, colitis ulcerosa o asma. Los anticuerpos de acuerdo con la invención no causan susceptibilidad a las infecciones bacterianas de estafilococos y entéricas en el paciente tratado. La descripción proporciona además un método para tratar un paciente que sufre de artritis reumatoide, colitis ulcerosa o asma que comprende la administración a un paciente diagnosticado con una enfermedad tal (y por lo tanto estar en necesidad de tal terapia)
 60 una cantidad eficaz de un anticuerpo de unión a IL33R de acuerdo con la invención. El anticuerpo se administra preferiblemente en una composición farmacéutica. Una descripción adicional es un método para el tratamiento de un paciente que sufre de artritis reumatoide, colitis ulcerosa o asma, que se caracteriza por administración al paciente de un anticuerpo de acuerdo con la invención. La invención comprende además un anticuerpo de acuerdo con la invención para uso en el tratamiento de un paciente que sufre de artritis reumatoide, colitis ulcerosa o asma y su
 65 utilización para la fabricación de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención. Además, la invención comprende un método para la fabricación de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención.

La invención comprende además una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención, opcionalmente junto con un tampón y/ o un adyuvante útiles para la formulación de anticuerpos para fines farmacéuticos. La invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo de acuerdo con la invención en un vehículo aceptable a nivel farmacéutico. En una realización, la composición farmacéutica puede incluirse en un artículo de fabricación o equipo.

Descripción detallada de la invención

El término "anticuerpo" abarca las diversas formas de estructuras de anticuerpos que incluyen pero no se limitan a anticuerpos completos y a fragmentos de anticuerpos. El anticuerpo de acuerdo con la invención es preferiblemente un anticuerpo humanizado, anticuerpo quimérico, anticuerpo con modificaciones genéticas adicionales, siempre y cuando las propiedades características de la invención se mantengan. Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, preferiblemente el dominio variable del mismo, o al menos el sitio de unión a antígeno del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen los diacuerpos, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla, y los anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Los anticuerpos scFv, por ejemplo, se describen en Huston, J.S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-88. Además, los fragmentos de anticuerpo comprenden los polipéptidos de cadena única que tienen las características de un dominio V_H , es decir, son capaces de ensamblarse junto a un dominio V_L , o de un dominio V_L de unión a IL33R, es decir, ser capaces de generar junto con un dominio V_H un sitio de unión al antígeno funcional y proporcionar de este modo las propiedades de un anticuerpo de acuerdo con la invención. Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" tal y como se utiliza aquí, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de una única composición de aminoácidos. El término "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los que se han modificado la región marco y/ o las "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR) para que comprendan la CDR de una inmunoglobulina de diferentes especie, en comparación con la de la inmunoglobulina parental. En una realización preferida, una CDR murina se injerta en la región marco de un anticuerpo humano para preparar el "anticuerpo humanizado". Véase, por ejemplo, Riechmann, L., et al, *Nature* 332 (1988) 323-327; y Neuberger, M.S., et al., *Nature* 314 (1985) 268-270.

El término "unión a IL33R" como se utiliza en la presente memoria significa la unión del anticuerpo a IL33R humano inmovilizado en un ensayo de unión ELISA. La unión se da si el anticuerpo genera una señal superior a la media + 3 desviaciones estándar o más de la del control sin anticuerpo a una concentración de anticuerpo superior a 12 ng/ml.

El término "afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su pareja de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, como se utiliza aquí, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción con relación 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su pareja Y se puede representar en general por la constante de disociación (Kd). La afinidad se puede medir mediante métodos comunes conocidos en la materia, incluyendo los descritos en el presente documento. Realizaciones ilustrativas y ejemplares específicas para la medición de la afinidad de unión se describen a continuación.

El término "epítipo" indica un determinante de una proteína capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítipos habitualmente consisten en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como los aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y normalmente los epítipos tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión a la primera pero no la última se pierde en presencia de disolventes de desnaturalización. Preferiblemente un anticuerpo según la invención se une específicamente a IL33R nativo pero no al desnaturalizado. El anticuerpo IL33R de la invención se une al mismo epítipo en IL33R al que se une el anticuerpo Mab ra170. La propiedad de unión al epítipo de un anticuerpo IL33R de la presente invención puede determinarse usando técnicas conocidas en la materia. El anticuerpo IL33R se analiza mediante un ensayo de unión de bloqueo cruzado *in vitro* para determinar la capacidad del anticuerpo de prueba de impedir la unión del anticuerpo Mab ra170 a IL33R. Si hay un desplazamiento del anticuerpo de ensayo por el anticuerpo Mab ra170 de al menos un 15%, entonces los epítipos están en proximidad cercana.

El "dominio variable" (dominio variable de una cadena ligera (VL) o dominio variable de una cadena pesada (VH)) tal y como se utiliza aquí indica cada uno del par de dominios de la cadena ligera y pesada que están implicados directamente en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena ligera y pesada tienen la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones marco (FR) cuyas secuencias están ampliamente conservadas, conectadas por tres "regiones hipervariables" (o regiones determinantes de la complementariedad, CDR). Las regiones estructurales adoptan una conformación de lámina β y los CDR pueden formar bucles que conectan la estructura de lámina β . Las CDR en cada cadena se mantienen en su estructura tridimensional por las regiones marco y forman conjuntamente con las CDR de la otra cadena el sitio de unión a antígeno. Las regiones CDR3 de la cadena pesada y ligera del anticuerpo juegan un papel particularmente importante en la especificidad de unión/ afinidad de los anticuerpos de acuerdo con la invención y por lo tanto proporcionan un objeto adicional de la invención.

El término "porción de unión al antígeno de un anticuerpo" cuando se usa aquí se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La porción de unión a antígeno de un anticuerpo comprende los residuos de aminoácidos de las "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR". Las regiones "marco" o "FR" son aquellas regiones del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable, como aquí se define. Por lo tanto, los dominios variables de la cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo comprenden del extremo N a C terminal, los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Especialmente, la CDR3 de la cadena pesada es la región que más contribuye a la unión del antígeno y define las propiedades del anticuerpo. Las regiones CDR y FR se determinan de acuerdo a la definición estándar de Kabat, et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) y/ o los residuos de un "bucle hipervariable".

El término "aminoácido" como se utiliza en esta solicitud significa el grupo de carboxi α -aminoácidos de origen natural que comprende la alanina (código de tres letras: ala, código de una letra: A), arginina (Arg, R), asparagina (Asn, N), ácido aspártico (Asp, D), cisteína (Cys, C), glutamina (Gln, Q), ácido glutámico (Glu, E), glicina (Gly, G), histidina (His, H), isoleucina (Ile, I), leucina (Leu, L), lisina (Lys, K), metionina (Met, M), fenilalanina (Phe, F), prolina (Pro, P), serina (Ser, S), treonina (Thr, T), triptófano (trp, W), tirosina (Tyr, Y) y valina (val, V).

Los términos "ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico", como se utiliza aquí, pretende incluir moléculas de DNA y moléculas de RNA. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferiblemente es DNA bicatenario. Un ácido nucleico está "unido de forma operativa" cuando se coloca en una relación funcional con otro ácido nucleico. Por ejemplo, el DNA de una presecuencia o líder secretor está unido de forma operativa al DNA de un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; y un promotor o potenciador está unido de forma operativa a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; y un sitio de unión al ribosoma está unido de forma operativa a una secuencia codificante si está colocado de manera que facilite la traducción. Generalmente, "unión operativa" significa que las secuencias de DNA que están unidas son colineales, y en el caso de un líder secretor, contiguas y en marco de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se consigue mediante ligación en los sitios de restricción convenientes. Si no existen tales sitios, se utilizan adaptadores de oligonucleótidos sintéticos o conectores de acuerdo con la práctica convencional. En la presente memoria, la expresión "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se utilizan indistintamente y todas estas designaciones incluyen la progenie. Por lo tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula sujeto primaria y los cultivos derivados de ella sin tener en cuenta el número de transferencias. También se entiende que toda la progenie puede no ser precisamente idéntica en el contenido de DNA, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. La progenie variante que tiene la misma función o actividad biológica que se ha detectado en la célula originalmente transformada, está incluida.

La "porción Fc" de un anticuerpo no está involucrado directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhibe varias funciones efectoras. Una "porción Fc de un anticuerpo" es un término bien conocido por el experto en la materia y definido en base a la escisión de los anticuerpos con papaína. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos o inmunoglobulinas se dividen en las clases: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA1 y IgA2. De acuerdo con las regiones constantes de la cadena pesada de las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. La porción Fc de un anticuerpo está directamente involucrada en la CCDA (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos) y la CDC (citotoxicidad dependiente del complemento), basado en la activación del complemento, unión a C1q y la unión al receptor Fc. La activación del complemento (CDC) se inicia mediante la unión del factor del complemento C1q a la porción Fc de la mayoría de las subclases de anticuerpos IgG. Aunque la influencia de un anticuerpo en el sistema del complemento es dependiente de ciertas condiciones, la unión a C1q es causada por unión a lugares definidos en la porción Fc. Tales sitios de unión son conocidos en el estado de la materia y se describen, por ejemplo, en Boackle, R.J., et al, *Nature* 282 (1979) 742-743.; Lukas, T.J., et al., *J. Immunol.* 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R. y Cebra, J.J., *Mol. Immunol.* 16 (1979) 907-917; Burton, D.R., et al., *Nature* 288 (1980) 338-344; Thommesen, J.E., et al., *Mol. Immunol.* 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E., et al, *J. Immunol.* 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M., et al, *J. Virology* 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., et al., *Immunology* 86 (1995) 319-324 y la EP 0307434. Tales sitios de unión son, por ejemplo, L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numeración de acuerdo con el índice de Kabat, Kabat, EA, et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Los anticuerpos de la subclase IgG1, IgG2 e IgG3 normalmente muestran activación del complemento y unión a C1q, mientras que la IgG4 no activa el sistema del complemento y no se une a C1q.

El anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una porción Fc de origen humano que es la porción Fc de un anticuerpo humano de la subclase IgG1 o IgG4. Para la porción Fc de un anticuerpo según la invención preferentemente no se puede detectar unión a C1q como se define a continuación.

La invención por lo tanto comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención, que se caracteriza porque dicho anticuerpo se une a IL33R, contiene una porción Fc de origen humano, y no se une al factor del complemento C1q humano y por lo tanto evita la función efectora CDC.

5 Preferiblemente, un anticuerpo de acuerdo con la invención, respecto a la unión al receptor Fc gamma, de subclase IgG1 o IgG2 humana, con una mutación en L234, L235, y/ o D265, y/ o con la mutación PVA236. Se prefieren las mutaciones L234A, L235A, L235E y/ o PVA236 (PVA236 significa que la secuencia de aminoácidos ELLG (dado en código de una letra de aminoácidos) a partir de la posición de aminoácido 233 a 236 de la IgG1 o EFLG de IgG4 se sustituye por PVA). Así, la presente invención proporciona un anticuerpo de acuerdo con la invención que se
 10 caracteriza porque dicho anticuerpo es un anticuerpo de subclase IgG1 humana, que contiene al menos una mutación en L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y/ o P329. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo de acuerdo con la invención, que contiene una porción Fc derivada de origen humano, y que se caracteriza porque dicho anticuerpo es un anticuerpo de subclase IgG1 humana, que contiene al
 15 menos una mutación en L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322 o P331, y en el que el anticuerpo se une a IL33R con un valor de K_D inferior a 10^{-8} M en un ensayo BIAcore. En otra realización, el rango de K_D es de 10^{-11} a 10^{-9} M.

20 La unión a C1q se puede medir de acuerdo con Idusogie, E.E., et al., J. Immunol. 164 (2000) 4.178-4.184. La ausencia de unión a C1q de acuerdo con la invención se caracteriza mediante un ensayo en el que se recubre una placa de ELISA con diferentes concentraciones de anticuerpo y se añade C1q humano. La unión a C1q se detecta mediante un anticuerpo dirigido contra el C1q humano seguido por la detección de un conjugado marcado con peroxidasa y el sustrato de la peroxidasa ABTS®, (2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolinsulfonato]). La ausencia de unión a C1q según la invención se define si la densidad óptica (DO) a 405 nm para el anticuerpo de ensayo es inferior a
 25 0,05 a una concentración de anticuerpo de 10 µg/ml.

El anticuerpo de acuerdo con la invención se caracteriza preferiblemente porque las cadenas constantes son de origen humano. Tales cadenas constantes son bien conocidas en el estado de la materia y se describen, por ejemplo, por Kabat (Kabat, EA, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991); y Johnson, G., y Wu, T.T., Nucleic Acids Res 28 (2000) 214-218). Por ejemplo, una región constante de la cadena pesada humana útil comprende el Id. de Sec. N°: 10, 11 o 29. Por ejemplo, una región constante de la cadena ligera humana útil comprende la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena ligera kappa de Id. de Sec. N°: 12 o 34.

35 Una realización adicional de la invención es un ácido nucleico que codifica una cadena pesada y una ligera de un anticuerpo de acuerdo con la invención.

La descripción comprende un método para el tratamiento de un paciente en necesidad de terapia, que se caracteriza por administrar al paciente una cantidad eficaz a nivel terapéutico de un anticuerpo de acuerdo con la invención. La invención comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención para su utilización en terapia. La invención comprende la utilización de un anticuerpo de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento para la profilaxis y el tratamiento especialmente de trastornos inflamatorios. La invención comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención para su utilización en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, preferentemente para el tratamiento de la artritis reumatoide, colitis ulcerativa y asma.

45 Los anticuerpos de acuerdo con la invención incluyen, además, los anticuerpos que tienen "modificaciones de secuencia conservadora" (anticuerpos variantes), modificaciones de la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos que no afectan o alteran las características anteriormente mencionadas del anticuerpo de acuerdo con la invención. Las modificaciones pueden introducirse mediante técnicas estándar conocidas en la materia, tales como la mutagénesis dirigida al sitio y la mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservativas incluyen aquellas en las que el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la materia. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Así, un residuo de aminoácido no esencial predicho en un anticuerpo anti-IL33R humano puede sustituirse preferiblemente con otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. Una "variante" de anticuerpo anti-IL33R, por lo tanto, se refiere aquí a una molécula que difiere en la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-IL33R "parental" hasta en diez, preferiblemente de aproximadamente dos a aproximadamente cinco, adiciones, supresiones y/ o sustituciones en una o más de regiones variables del anticuerpo parental. Las sustituciones de aminoácidos pueden realizarse mediante mutagénesis basada en el modelado molecular como describe Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988)
 50 323-327 y Queen, C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10.029-10.033.
 55
 60
 65

Una realización adicional de la invención es un método para la producción de un anticuerpo contra IL33R que no se une al receptor Fc gamma y/ o a C1q, que se caracteriza porque la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de un anticuerpo de tipo IgG1 humano que se une a IL33R se modifica de tal manera que dicho anticuerpo modificado no se une a C1q y/ o al receptor Fc gamma, y dicho ácido nucleico y el ácido nucleico que codifica la cadena ligera de dicho anticuerpo se insertan en un vector de expresión modificado, dicho vector se inserta en una célula huésped eucariota, la proteína codificada se expresa y se recupera de la célula huésped o el sobrenadante.

La identidad u homología con respecto a la secuencia se define aquí como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos en la secuencia parental, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia. No se deben construir extensiones, deleciones o inserciones, en N-terminal, C-terminal o internas, en la secuencia del anticuerpo que afecten a la identidad u homología de secuencia. La variante retendrá la capacidad de unirse a IL33R humano y preferentemente tendrá propiedades que son superiores a las del anticuerpo parental. Por ejemplo, la variante puede reducir los efectos secundarios durante el tratamiento.

El anticuerpo "parental" comprende las regiones CDR del anticuerpo ra170 y se utiliza preferiblemente para la preparación de la variante. Preferiblemente, el anticuerpo parental tiene una región marco humana y, cuando está presente, tiene una región constante de anticuerpo humano o dominios constantes de anticuerpo humano. Por ejemplo, el anticuerpo parental puede ser un anticuerpo humanizado o humano.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención se producen preferentemente por métodos recombinantes. Tales métodos son ampliamente conocidos en el estado de la materia y comprenden la expresión de proteínas en células procariontas y eucariotas con el posterior aislamiento del polipéptido del anticuerpo y por lo general la purificación hasta una pureza aceptable a nivel farmacéutico. Para la expresión de proteínas, los ácidos nucleicos que codifican las cadenas ligeras y pesadas, o fragmentos de las mismas, se insertan en vectores de expresión mediante métodos estándar. La expresión se realiza en células huésped procariontas o eucariotas apropiadas, tales como las células CHO, células NSO, células SP2/0, células HEK293, células COS, levaduras o células de *E. coli*, y el anticuerpo se recupera de las células (a partir del sobrenadante o después de la lisis de células). La producción recombinante de anticuerpos es bien conocida en el estado de la materia y se describe, por ejemplo, en los artículos de revisión de Makrides, S.C., *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202; Geisse, S., et al., *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-160 y Werner, R.G., *Drug Res.* 48 (1998) 870-880. Los anticuerpos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular o en forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. La purificación se lleva a cabo con el fin de eliminar otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándar, incluyendo la cromatografía en columna y otras técnicas bien conocidas en la materia. Ver Ausubel, F., et al., Ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing y Wiley Interscience, Nueva York (1987). La expresión en células NSO se describe, por ejemplo, en Barnes, L.M., et al., *Cytotechnology* 32 (2000) 109-123; Barnes, L.M., et al., *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270. La expresión transitoria se describe, por ejemplo, en Durocher, Y., et al., *Nucl. Acids. Res.* 30 (2002) E9. La clonación de dominios variables se describe en Orlandi, R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; Norderhaug, L., et al., *J. Immunol. Methods* 204 (1997) 77-87. Un sistema de expresión transitoria preferible (HEK 293) se describe en Schlaeger, E.J. y Christensen, K., en *Cytotechnology* 30 (1999) 71-83, y por Schlaeger, E.J., en *J. Immunol. Methods* 194 (1996) 191-199. Los anticuerpos monoclonales se separan adecuadamente del medio de cultivo mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. El DNA y RNA que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales. Las células de hibridoma pueden servir como una fuente de tal DNA y RNA. Una vez aislado, el DNA puede insertarse en vectores de expresión, que luego son transfectados en células huésped, tales como las células HEK 293, células CHO o células de mieloma, que de otro modo no producen la proteína de inmunoglobulina, para conseguir la síntesis de anticuerpos monoclonales recombinantes en las células huésped.

Las variantes de la secuencia aminoacídica del anticuerpo IL33R humano se preparan introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el DNA que codifica el anticuerpo o mediante síntesis de péptidos. Tales modificaciones pueden realizarse, sin embargo, sólo en un rango muy limitado, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, las modificaciones no alteran las características de los anticuerpos mencionados anteriormente, tales como el isotipo IgG y la unión al epítipo, pero pueden mejorar el rendimiento de la producción recombinante, la estabilidad de las proteínas o facilitar su purificación. Cualquier residuo de cisteína no implicado en mantener la conformación apropiada del anticuerpo anti-IL33R también puede ser sustituido, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar el entrecruzamiento aberrante. Por otro lado, pueden añadirse enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, como un fragmento Fv). Otro tipo de variante de aminoácidos del anticuerpo altera el patrón de glicosilación original del anticuerpo. Por "alteración" se entiende la eliminación de uno o más porciones de carbohidrato que se encuentra en el anticuerpo y/o adición de uno o más sitios de glicosilación que no estaban presentes en el anticuerpo. La glicosilación de anticuerpos es típicamente N-unida. N-unida se refiere a la unión de la porción de carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-

X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de la porción de carbohidrato a la cadena lateral de la asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un potencial sitio de glicosilación. La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de forma que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos descritas anteriormente (para sitios de glicosilación N-unidos).

Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-IL33R se preparan mediante una variedad de métodos conocidos en la materia. Estos métodos incluyen, pero no se limitan al aislamiento de una fuente natural (en el caso de origen natural de la variante de secuencia de aminoácidos) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida a sitio), mutagénesis por PCR, y mutagénesis de cassette de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo anti-IL33R humanizado.

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende la unión del anticuerpo a uno de entre una variedad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera establecida en las patentes US nº 4.640.835, 4.496.689, 4.301.144, 4.670.417, 4.791.192 y 4.179.337.

Los dominios variables de la cadena pesada y ligera de acuerdo con la invención se combinan con secuencias promotoras, de iniciación de la traducción, de la región constante, 3' no traducida, de poliadenilación y terminación de la transcripción para formar construcciones de vectores de expresión. Las construcciones de expresión de la cadena pesada y ligera pueden combinarse en un solo vector, que se cotransfecta, se transfecta en serie o se transfecta por separado en células huésped que a continuación se fusionan para formar una única célula huésped que expresa ambas cadenas.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de anticuerpos monoclonales, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la presente invención, formulado junto con un vehículo aceptable a nivel farmacéutico. En la presente memoria, un "vehículo aceptable a nivel farmacéutico" incluye cualquiera de entre todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, isotónicos y agentes ralentizadores de la absorción/resorción, y similares, que son fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el vehículo es adecuado para su inyección o infusión. Una composición de la presente invención se puede administrar por una variedad de métodos conocidos en la materia. Como el experto en la materia apreciará, la vía y/ o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Los vehículos aceptables a nivel farmacéutico incluyen las soluciones o dispersiones acuosas estériles y los polvos estériles para la preparación de soluciones o dispersiones inyectables estériles. La utilización de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocida en la materia. Además de agua, el vehículo puede ser, por ejemplo, una solución salina isotónica tamponada. Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que pueden usarse en una forma hidratada adecuada, y/ o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación aceptables a nivel farmacéutico por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar a fin de obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente en particular, composición y vía de administración, sin ser tóxico para el paciente (cantidad eficaz). El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleada, del éster, sal o amida del mismo, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto en particular que se emplea, de otros fármacos, compuestos y/ o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, de la edad, sexo, peso, condición, salud general e historial médico previo del paciente que se está tratando, y de factores similares bien conocidos en la práctica médica.

La invención comprende los anticuerpos de acuerdo con la invención para su utilización en el tratamiento de un paciente que sufre de artritis reumatoide, colitis ulcerosa o asma.

Una realización adicional de la invención es un anticuerpo anti-IL33R, preferiblemente un anticuerpo de acuerdo con la invención, para su uso en el tratamiento de un paciente que sufre de artritis reumatoide, y dicho paciente responde moderadamente o no responde al tratamiento con un antagonista de TNF, el anticuerpo anti-CD20, el anticuerpo anti-CTLA4lg o IL6. Una realización adicional de la invención es la utilización de un anticuerpo anti-IL33R, preferiblemente un anticuerpo de acuerdo con la invención, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente que sufre de artritis reumatoide, colitis ulcerosa o asma.

La invención proporciona además un método para la fabricación de una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo de acuerdo con la invención, junto con un vehículo aceptable a nivel farmacéutico y la utilización del anticuerpo de acuerdo con la invención para un método de este tipo. La invención proporciona además la utilización de un anticuerpo de acuerdo con la invención en una cantidad eficaz para la fabricación de un agente farmacéutico, preferiblemente junto con un vehículo aceptable a nivel farmacéutico, para el

tratamiento de un paciente que sufre de artritis reumatoide, colitis ulcerosa o asma. La invención también proporciona la utilización de un anticuerpo de acuerdo con la invención en una cantidad eficaz para la fabricación de un agente farmacéutico, preferiblemente junto con un vehículo aceptable a nivel farmacéutico, para el tratamiento de un paciente que sufre de artritis reumatoide, colitis ulcerosa o asma.

- 5 Descripción de las secuencias
- Id. de Sec. Nº: 1 CDR3 de la cadena pesada, Mab ra170
- 10 Id. de Sec. Nº: 2 CDR2 de la cadena pesada, Mab ra170
- Id. de Sec. Nº: 3 CDR1 de la cadena pesada, Mab ra170
- 15 Id. de Sec. Nº: 4 CDR3 de la cadena ligera, Mab ra170
- Id. de Sec. Nº: 5 CDR2 de la cadena ligera, Mab ra170
- Id. de Sec. Nº: 6 CDR1 de la cadena ligera, Mab ra170
- 20 Id. de Sec. Nº: 7 dominio variable de la cadena pesada, Mab ra170
- Id. de Sec. Nº: 8 dominio variable de la cadena ligera, Mab ra170
- 25 Id. de Sec. Nº: 9 región constante de la cadena pesada y λ humana con las mutaciones L234A y L235A (alotipo caucásico)
- Id. de Sec. Nº: 10 región constante de la cadena pesada y λ humana (alotipo caucásico)
- 30 Id. de Sec. Nº: 11 región constante de la cadena pesada y λ humana (alotipo afroamericano)
- Id. de Sec. Nº: 12 región constante de la cadena ligera κ humana
- Id. de Sec. Nº: 13 fragmento 1 de la secuencia ST2 sustituida por Mut1
- 35 Id. de Sec. Nº: 14 fragmento 2 de la secuencia ST2 sustituida por Mut1
- Id. de Sec. Nº: 15 fragmento 3 de la secuencia ST2 sustituida por Mut1
- Id. de Sec. Nº: 16 fragmento 4 de la secuencia ST2 sustituida por Mut1
- 40 Id. de Sec. Nº: 17 fragmento 1 de IL-1R Mut1, reemplazando el fragmento ST2 de la Sec. 13
- Id. de Sec. Nº: 18 fragmento 2 de IL-1R mut2, reemplazando el fragmento ST2 de la Sec. 14
- 45 Id. de Sec. Nº: 19 fragmento 3 de IL-1R mut3, reemplazando el fragmento ST2 de la Sec. 15
- Id. de Sec. Nº: 20 fragmento 4 de IL-1R mut4, reemplazando el fragmento ST2 de la Sec.16
- 50 Id. de Sec. Nº: 21 dominio variable de la cadena pesada, ra170 humanizado 11.12 (VH11)
- Id. de Sec. Nº: 22 CDR1 de la cadena pesada Mab ra170 11,12
- Id. de Sec. Nº: 23 CDR2 de la cadena pesada, Mab ra170 11,12
- 55 Id. de Sec. Nº: 24 CDR3 de la cadena pesada, Mab ra170 11,12
- Id. de Sec. Nº: 25 dominio variable de la cadena pesada, ra170 humanizado 10.12 (VH10)
- Id. de Sec. Nº: 26 CDR1 de la cadena pesada, Mab ra170 10.12
- 60 Id. de Sec. Nº: 27 CDR2 de la cadena pesada, Mab ra170 10.12
- Id. de Sec. Nº: 28 CDR3 de la cadena pesada, Mab ra170 10.12
- 65 Id. de Sec. Nº: 29 segmento principal de SPLE IgG4 humana (región constante de la cadena pesada y γ 4 humana con las mutaciones L235E y S228P)

Id. de Sec. Nº: 30 dominio variable de la cadena ligera, ra170 humanizado (11.12 y 10.12)

Id. de Sec. Nº: 31 CDR1 de la cadena ligera, Mab ra170 10.12 y 11.12

Id. de Sec. Nº: 32 CDR2 de la cadena ligera, Mab ra170 10.12 y 11.12

Id. de Sec. Nº: 33 CDR3 de la cadena ligera, Mab ra170 10.12 y 11.12

Id. de Sec. Nº: 34 segmento principal de la kappa humana

Ejemplos

Ejemplo 1

Inmunización

Se utilizaron Conejos (*Oryctolagus cuniculus*) New Zealand White (NZW) salvajes de Charles River Laboratories International, Inc. para la inmunización. Se alojaron y mantuvieron de acuerdo con las directrices del comité de cuidado y utilización de animales institucional y la asociación de evaluación y acreditación del cuidado de animales de laboratorio (Alemania, Europa).

La forma soluble secretada de IL-33R humano, purificada, derivada de NS0, fusionada a la región Fc de la IgG humana se disolvió en tampón NaCl-histidina pH 6,1 a una concentración de 1 mg/ml y se mezcló (1:1) con adyuvante completo de Freund (CFA) hasta la generación de emulsión estable. Tres conejos recibieron una inyección intradérmica (id) de 2 ml de la emulsión, seguido de una segunda inyección intramuscular (im) y una tercera subcutánea (sc), cada una de 1 ml en un intervalo de una semana. La cuarta inyección i.m. de 1 ml se realizó dos semanas después, seguido de otras dos inyecciones sc de 1 ml en el intervalo de cuatro semanas. Se recogieron muestras de sangre periférica total de 10 ml de cada animal 4-6 días después de la tercera, cuarta, quinta y sexta inyección, y se utilizaron para la selección de células únicas en FACS. Al mismo tiempo se recogieron 0,5 ml de suero adicional de cada animal y se utilizaron para la caracterización de la respuesta de los anticuerpos específicos IL33R.

Respuesta de los anticuerpos

La respuesta de anticuerpos a la inmunización se determinó mediante una dilución en serie de los sueros utilizando un ELISA específico de IL33R, en el que placas de microtitulación MaxiSorp de 96 pocillos se recubrieron con 0,3 µg/ml de la proteína rhIL33R en tampón carbonato durante 1 hora a 37°C. A partir de entonces los pocillos se bloquearon con PBS suplementado con Crotein C al 1% (Roche Diagnostics GmbH, DE) durante toda la noche a 4°C. Para la detección, se utilizó una IgG de cabra anti-conejo unida a peroxidasa de rábano (The Jackson Laboratory) a dilución 1:16000. Para la visualización se utilizó el sustrato BM blue POD, que precipita tetrametilbenzidina (TMB), en una solución lista para usar de Roche Diagnostics GmbH, DE. La reacción se detuvo mediante HCl 1 N y se midió en un Tecan Infinite a 450/690 nm.

Descripción de la selección de anticuerpos

Las placas de cultivo celular estériles de 6 pocillos se recubrieron con 2 µg/ml de proteína IL33R en tampón carbonato (bicarbonato de sodio 0,1 M, disodiohidrogenocarbonato 34 mM, pH 9,55) durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron en PBS estéril tres veces antes de su uso. Sangre entera de conejo que contenía EDTA se diluyó dos veces con 1xPBS antes de la centrifugación de densidad sobre Lympholyte de mamífero (Cedarlane Laboratories) que se realizó para aislar las PBMC de conejo. Las PBMC se lavaron dos veces antes de la tinción con anticuerpos.

Medio EL-4 B5

RPMI 1640 suplementado con FCS al 10% (Hyclone, Logan, UT, EE.UU.), glutamina 2 mM, solución de penicilina/estreptomocina al 1%, piruvato de sodio 2 mM, HEPES 10 mM y β-mercaptoetanol 0,05 mM.

Eliminación de macrófagos/ monocitos

Se utilizaron placas estériles de 6 pocillos (grado de cultivo de células) para eliminar los macrófagos y monocitos a través de la adhesión inespecífica. Cada pocillo se llenó al máximo con 4 ml de medio y hasta 6×10^6 células mononucleares de sangre periférica del conejo inmunizado y se dejó que se unieran durante 1 h a 37°C en el incubador. El 50% de las células en el sobrenadante se utilizó para la etapa de selección, el 50% restante de las células se mantuvieron en hielo hasta la tinción inmune de fluorescencia.

Enriquecimiento de células B sobre proteína IL33R

Se sembraron placas de cultivo tisular de 6 pocillos recubiertas con la proteína IL33R con hasta 6×10^6 células por 4 ml de medio, y se dejó que se unieran durante 1 h a 37°C en el incubador. Tras la etapa de enriquecimiento sobre la proteína IL33R, las células no adherentes se eliminaron lavando cuidadosamente los pocillos 1-2 veces con PBS 1x. Las células adherentes restantes se separaron con tripsina durante 10 min a 37°C en el incubador y después se lavaron dos veces en medio. Las células se mantuvieron en hielo hasta la tinción inmune de fluorescencia.

Tinción inmune fluorescente y citometría de flujo

La IgG anti-conejo FITC que se utilizó para la selección de una sola célula era de AbD Serotec (STAR121F, Düsseldorf, Alemania). Para la tinción de superficie, las células de la etapa de eliminación y selección se incubaron con el anticuerpo IgG anti-conejo FITC óptimamente diluido en PBS durante 30 min en agitación rotatoria en cámara fría a 4°C y en la oscuridad. Después de la centrifugación, los sobrenadantes se eliminaron mediante aspiración. Las PBMC se sometieron a 2 ciclos de centrifugación y lavado con PBS enfriado con hielo. Finalmente las PBMC se resuspendieron en PBS enfriado con hielo e inmediatamente se sometieron a un análisis de FACS. Se añadió yoduro de propidio a una concentración de 5 µg/ml (BD Pharmingen, San Diego, CA, EE.UU.) antes del análisis FACS para discriminar entre células vivas y muertas. Se utilizaron un Becton Dickinson FACSAria™ equipado con un ordenador y el software FACSDiva™ (BD Biosciences, EE.UU.) para recopilar y analizar los datos.

Cultivo de células B

Los cultivos de células B se prepararon mediante un método similar al descrito por Zubler, et. al., Eur. J. Immunol. 14 (1984) 357-363, Zubler, et al., J. Exp. Med. 160 (1984) 1170-1183. Brevemente, las células B individuales seleccionadas se cultivaron en placas de 96 pocillos con 210 µl/ pocillo de medio con células Pansorbin® (1: 20.000) (Calbiochem (Merck), Darmstadt, Deutschland), sobrenadante de timocitos de conejo al 5% (carga 20080910, producción Irmgard Thorey) y células de timoma murino EL-4-B5 gamma-irradiado (2×10^4 / pocillo) durante 7 días a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% en el incubador. Los sobrenadantes de cultivo de las células B se recogieron para su cribado y las células se recogieron inmediatamente para la recuperación del gen de la región variable o se congelaron a -80°C en 100 ml de tampón RLT (Qiagen, Hilden, Alemania).

Aislamiento de ácido ribonucleico (RNA)

Las células de las que se tuvo que aislar RNA se sedimentaron en primer lugar por centrifugación. El botón celular se lisó mediante la adición de 100 µl de tampón RLT con 10 µl/ml de beta-mercaptoetanol. Las células se resuspendieron mediante mezclado múltiple con una pipeta y se transfirieron a una placa de múltiples pocillos. La placa se centrifugó brevemente a 200 x g y se congelaron a -20°C. El aislamiento de RNA se realizó con el equipo NucleoSpin® 96 RNA (Macherey & Nagel) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa

La transcripción inversa se llevó a cabo con SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante.

Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo con AccuPrime Pfx SuperMix (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Las regiones variables de la cadena ligera y la cadena pesada fueron amplificadas en reacciones separadas. Se utilizaron cebadores de PCR con solapamientos de 25 pb para situarse en los vectores de expresión de los anticuerpos. Los productos de PCR se purificaron mediante el equipo NucleoSpin® 96 Extract II (Macherey & Nagel).

Secuenciación y clonaje SLIC

Los productos de PCR se secuenciaron para determinar las secuencias de DNA de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras. Los productos de PCR se clonaron en vectores de expresión por el llamado método de clonaje SLIC, que se describe en Haun, R.S., et al., en BioTechniques 13 (1992) págs. 515-518 y Li, M.Z., et al., en Nature Methods 4 (2007) págs. 251-256. Los plásmidos para la expresión de anticuerpos se linealizaron mediante digestión anzyme restricción. Los plásmidos linealizados se purificaron por electroforesis en agarosa preparativa y se extrajeron del gel (QIAquick Gel Extraction Kit/ Qiagen). Los plásmidos purificados se añadieron a un protocolo de PCR utilizando cebadores superpuestos (BAY 25 pb) para el producto de PCR a clonar. Tanto el vector como el inserto se trataron con polimerasa de DNA T4 (Roche Applied Sciences) en ausencia de dNTP para generar salientes, a continuación, y luego el vector y el inserto se incubaron con proteína RecA (New England Biolabs) y ATP para promover la recombinación. Los productos se transformaron en E. coli. Los DNA plasmídicos de las cadenas ligeras y cadenas pesadas se aislaron y cada pareja se combinó para las transfecciones transitorias.

Transfección transitoria para la expresión del anticuerpo en las células HEK293

Las células HEK293 (Invitrogen) se cultivaron en medio F17 (Gibco) a 1×10^6 células/ ml. Se transfectaron 2×10^6 células HEK293 con 1 μg de los plásmidos HC + LC en suspensión en 293-free (Novagen) y OptiMEM® (Gibco). Después de 7 días de incubación los sobrenadantes se recogieron y analizaron.

Los anticuerpos según la invención muestran una alta calidad en base a la inhibición de la activación de NFkB inducida por IL33 en células UT-7 humanas. Preferiblemente, los anticuerpos de acuerdo con la invención muestran un valor de CI_{50} de 0,05 nM o inferior, y más preferiblemente de 0,03 nM o inferior. Además, los anticuerpos de acuerdo con la invención muestran propiedades valiosas en la combinación de ensayos de un ensayo de eosinófilos, ensayo de mastocitos, ensayo de basófilos (KU812) y el ensayo de TH_2 . Se encontró que los anticuerpos que muestran una inhibición de la activación de NFkB inducida por IL33 en células UT-7 humanas con un valor de CI_{50} de 0,05 nM o inferior, y más preferiblemente de 0,03 nM o inferior tienen propiedades especialmente útiles en el tratamiento de la artritis reumatoide, colitis ulcerosa y asma. Son más preferibles los anticuerpos que muestran valores de CI_{50} de 5 nM o inferiores en el ensayo de eosinófilos, ensayo de mastocitos, ensayo de Th_2 o ensayo de basófilos (IL-5).

Ejemplo 2

Inhibición de la unión de IL33 a ST2 (ELISA)

La prueba se realizó en placas de microtitulación de 384 pocillos MaxiSorp™ (Sigma-Aldrich, Nunc. DE, N° Cat. 464718) a TA. Después de cada paso de incubación las placas se lavaron 3 veces con PBST (solución salina tamponada con fosfato y Tween®-20). Inicialmente, las placas se recubrieron con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del fragmento Fc de IgG de cabra anti-humana (Jackson Imm. Res., US, N° Cat. 109-006-170) durante al menos 2 horas (h). A partir de ese momento, los pocillos se bloquearon con PBS suplementado con un 0,1% de Tween®-20 y un 2% de BSA (Roche Diagnostics GmbH, DE) durante 1 h. Se capturaron 60 ng/ml de la quimera de ST2 humana recombinante/ IL-1R4 Fc (R&D Systems, Reino Unido, N° Cat. 523-ST) o la quimera ST2 cyno recombinante Fc durante 1 h. Se incubaron diluciones de los anticuerpos purificados o sobrenadantes de hibridoma/ células B en PBS con un 0,5% de BSA y 0,05% de Tween®-20 con la proteína receptor durante 1 h. Se añadió IL33 humana biotinilada (PeproTech, EE.UU., N° Cat. 500-P261) durante una hora más para que se produjera el complejo. Se biotiniló la IL33 con sulfo-NHS-LC-Biotina (Pierce Thermo Scientific, EE.UU., N° Cat. 21327) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se purificó usando columnas Zeba™ Desalt Spin (Thermo Scientific Pierce, EE.UU., N° Cat. 89889). La unión de la IL33 biotinilada al complejo se detectó con estreptavidina HRP diluida 1:4000 (Roche Diagnostics GmbH, DE, N° Cat. 11089153001). Después de 1 h las placas se lavaron 6 veces con PBST y se revelaron con una solución de sustrato BM blue POD recién preparada (BM blue: 3,3'-5,5'-tetrametilbencidina, Roche Diagnostics GmbH, DE, N° Cat. 11484281001) durante 12 minutos a TA. Se midió la absorbancia a 370 nm. El control negativo se definió como sin adición de proteína ST2/IL-1R4 y el control positivo se definió como con todos los componentes, pero sin anticuerpo.

El anticuerpo ra170 muestra un valor de CI_{50} de 0,32 nM para la inhibición de la unión a ST2 humana y 0,13 nM para la ST2 de cynomolgus.

Ejemplo 3

Determinación de la afinidad de los anticuerpos anti-hST2 al ST2 ECD humano (monómero His-Avitag)

Instrumento: BIAcore® T100

Chip: CM4 (GE Healthcare BR-1005 = 34)

Acoplamiento: acoplamiento amina

Tampón: solución salina tamponada fosfato 10 mM con Tween 20 al 0,05% (PBST), pH 7,4, 37°C

Para las mediciones de afinidad se acoplaron 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpos Fcg de cabra anti-humano (Jackson Imm. Res., EE.UU., N° Cat. 115-005-098) a la superficie del chip para la captura de los anticuerpos que se unen a ST2. Se añadió ST2 ECD monomérico humano con 6His-Avitag™ (Avidity, LLC, EE.UU.) a varias concentraciones en solución. La asociación se midió mediante la inyección de ST2 ECD durante un tiempo de contacto de 120 s. (cinética de un único ciclo) a 37°C y la disociación se midió mediante el lavado de la superficie del chip con tampón durante 1.800 s. a 37°C. Para el cálculo de la K_D aparente y otros parámetros cinéticos se utilizó el modelo de Langmuir 1:1. Los resultados (promedio de dos mediciones) se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: Media de los datos de afinidad medidos mediante SPR (BIAcore T100) en 10mM PBST a 37°C, pH 7.4

Anticuerpo	K_D aparente (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	$T_{1/2}$ (min.)
ra170 IgG4 SPLE	$2,7 \times 10^{-12}$	$4,6 \times 10^6$	$1,3 \times 10^{-5}$	881
ra170 10.12	$1,1 \times 10^{-9}$	$4,9 \times 10^6$	$5,1 \times 10^{-3}$	2
ra170 11.12	$1,4 \times 10^{-10}$	$3,1 \times 10^6$	$4,3 \times 10^{-4}$	27

Ejemplo 4

Inhibición de la activación NFκB inducida por IL33 en células UT-7 humanas

a) Reactivos:

Línea celular UT-7 (DSMZ # ACC 137)

Medio de cultivo: RPMI1640 (Gibco # 10509-24) suplementado con L-glutamina 2 mM (Gibco # 25030), piruvato de sodio 1,0 mM (Gibco # 11360-039), NEAA 0,1 mM (Gibco # 11140-035), FCS al 10% (Gibco # 10509-24), rhGM-CSF 10 unidades/ml (Roche # 11115138)

IL-33 recombinante humano (PeproTech # 200-33)

Par de anticuerpos del ELISA en sandwich PathScan® p65 (Ser536) fosfo-NFκB (Cell Signaling # 7834)

Tampón de lisis del ELISA en sandwich PathScan® (Cell Signaling # 7018)

rhTNFα (Roche Applied Sci # 11371843)

b) Procedimiento:

Se cultivaron células UT-7 en RPMI 1640 suplementado con 2 mM de L-glutamina, piruvato de sodio 1,0 mM, NEAA 0,1 mM, FCS al 10% y 10 unidades/ml de GM-CSF en una mezcla de CO₂ al 7%/ aire 95% a 37°C. Se realizó un pase de las células al llegar a una densidad de ~1 x 10⁵ células/ml y se diluyó a una densidad de 2 x 10⁵ células/ml. Las células se utilizaron para el ensayo de NFκB 2 días después del pase. Para determinar la concentración eficaz para IL33, las células UT-7 se sembraron en una placa de cultivo celular de polipropileno de 96 pocillos (8,0 x 10⁵ células/pocillo en un volumen total de 220 μl de medio de cultivo) y se estimularon con diversas concentraciones de IL-33 recombinante humana (0,1-10 ng/ml) durante 15 min. a 37°C. Entonces, las placas se centrifugaron, se lavaron con PBS enfriado con hielo y se centrifugaron de nuevo. Se eliminó el PBS y se añadieron 60 μl por pocillo de tampón de lisis del ELISA en sándwich PathScan®. Las células se incubaron con el tampón de lisis durante 15 min. en hielo. Los lisados se clarificaron mediante centrifugación y se recogieron los sobrenadantes. Los lisados se almacenaron a -80°C hasta la determinación de la activación de NFκB usando el ELISA fosfo-NF-κB p65 PathScan®. El ELISA se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los datos demostraron que la estimulación de la activación de NFκB era óptima a 1 ng/ml de IL33. Para las pruebas de anticuerpos, las células UT7 se sembraron en una placa de cultivo celular de polipropileno de 96 pocillos (8,0 x 10⁵ células/pocillo) y se incubaron con diferentes concentraciones de anticuerpos (0,15 ng/ml - 300 ng/ml de concentración final) en un total volumen de 220 μl de medio de crecimiento. Las células se incubaron con los anticuerpos durante 1 h en hielo. Posteriormente, las células fueron estimuladas con rhIL-33 (1 ng/ml de concentración final) durante 15 min a 37°C. Como control, se determinó la máxima activación de NFκB de las células UT7 mediante la incubación de las células UT7 con TNF-α (30 ng/ml) durante 15 min a 37°C. Se llevó a cabo la preparación del lisado y el análisis de NFκB como se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Inhibición de la activación de NFκB inducida por IL-33 en células UT-7 humana

Anticuerpo	CI ₅₀ de NFκB [nM]
ra170 (IgG1 de conejo)	0,025
ra170 10.12	0,28
ra170 11.12	0,04
Mab523 ¹	1,90
AF523 (PAB, IgG1 de cabra) ¹	0,56
HB12 (IgG1 de ratón) ¹	1,43
2A5 ²	66,22
FB9 ²	0,95
1: disponible en R&D Systems (http://www.rndsystems.com)	
2: disponible en MBL International Corporation, Números de pedido: D065-3, D066-3, D067-3 y ABIN130564	

Ejemplo 5

Definición del sitio de unión para el clon ra170

Para la definición de los sitios de unión del anticuerpo, se clonó y se expresó el receptor ST2 de IL-33 humano. ST2 se compone de 3 dominios D1, D2, D3. De entre ellos, se generó la variante D1D2 y se analizó la unión residual de ra170. Ra170 se une a ST2 y a la variante truncada D1D2.

La unión a la variante ST2 se midió mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) utilizando un instrumento BIAcore® T100 (GE Healthcare) a 25°C. El sistema BIAcore® está bien establecido para el estudio de las interacciones entre moléculas. La tecnología de SPR se basa en la medición del índice de refracción cerca de la superficie de un chip biosensor recubierto de oro. Los cambios en el índice de refracción indican cambios de masa

en la superficie causada por la interacción de un ligando inmovilizado con un analito inyectado en solución. Si las moléculas unen ligandos inmovilizados sobre la superficie, la masa aumenta, y en caso de disociación la masa disminuye reflejando la disociación del complejo. La SPR permite una monitorización continua en tiempo real de los enlaces entre ligando/ analito y por tanto la determinación de las constantes de la tasa de asociación (k_a), constantes de la tasa de disociación (k_d), y las constantes de equilibrio (KD). La inyección de un único valor de concentración da una idea clara de la capacidad de unión del analito, pero también aporta una aproximación a los valores de unión.

El acoplamiento amina de alrededor de 8000 unidades de resonancia (RU) en un sistema de captura (penta-His específico ST2-His de captura, Qiagen, N° Cat. 34660) se realizó en un chip CM5 a pH 5,0 usando un equipo de acoplamiento amina suministrado por GE Healthcare.

Para el análisis, se capturó la variante ST2 con cola de His mediante inyección de una solución a 300 nM durante 1 min. a una tasa de flujo de 30 μ l/ min. A continuación, el anticuerpo a analizar se inyectó a una concentración de 100 nM durante 2 min. a una tasa de flujo de 30 μ l/ min. La fase de disociación se monitorizó durante un máximo de 1 min. y se disparó mediante el cambio de la solución de muestra a tampón de ensayo. La superficie se regeneró mediante un lavado de 30 s. con una solución de glicina a pH 2,0 a una tasa de flujo de 30 μ l/ min.

Las diferencias brutas del índice de refracción se corrigieron restando la respuesta obtenida de una superficie acoplada a un blanco. También se restan las inyecciones de blanco (= doble referenciado).

La variante ST2 está unida por anticuerpos de acuerdo con la invención comparable a ST2 de tipo salvaje y por lo tanto se concluye que el sitio de unión se encuentra en el dominio D1D2.

Ejemplo 6

Determinación de la unión del anticuerpo anti-IL-33R hacia diferentes variantes de ST2

La unión de un anticuerpo de acuerdo con la invención a diferentes variantes de ST2 se midió mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) utilizando un instrumento BIAcore® A100 (GE Healthcare) a 37°C. El sistema BIAcore® está bien establecido para el estudio de las interacciones de moléculas. La tecnología SPR se basa en la medición del índice de refracción cerca de la superficie de un chip biosensor recubierto de oro. Los cambios en el índice de refracción indican cambios de masa en la superficie causada por la interacción del ligando inmovilizado con el analito inyectado en solución. Si las moléculas se unen a ligandos inmovilizados sobre la superficie, la masa aumenta, en el caso de la disociación de la masa disminuye reflejando el complejo de disociación. La SPR permite una monitorización continua en tiempo real de los enlaces de ligando / analito y por tanto la determinación de las constantes de la tasas de asociación (k_a), constantes de la tasas de disociación (Kd), y las constantes de equilibrio (KD).

El acoplamiento de amina de alrededor de 800 unidades de resonancia (UR) de un sistema de captura (anti-Fc γ de ratón, mFc γ específico, de captura, Jackson Imm. Res., n° Cat. JIR115-005-071 y anti-Fc γ de conejo, rbFc γ específica, Jackson Imm. Res., n° Cat. JIR111-005-046) se realizó en un chip CM5 a pH 5,0 usando un equipo de acoplamiento de aminas suministrado por el GE Healthcare.

Para el análisis se capturaron de diferentes anticuerpos mediante la inyección de 10 nM de anticuerpos de conejo y alrededor de 30 nM de solución de anticuerpos de ratón durante 2 min. a un caudal de 10 μ l / min. A continuación, las variantes de ST2 marcadas con His a analizar se inyectaron en una serie de diluciones con una concentración máxima de 150 nM durante 2,5 minutos a un caudal de 30 μ l/min. La fase de disociación se monitorizó durante hasta 10 min y se disparó por el cambio de solución de muestra al tampón de análisis. La superficie de anticuerpos de captura anti-ratón se regeneró por lavado de 60 seg. con una solución de glicina pH 1,5 seguida de lavado de 60 seg. con una solución de glicina pH 2,0 usando el protocolo instrumental. La superficie de anticuerpos de captura anti-conejo se regeneró mediante un lavado en dos etapas de 60 seg. con una solución de glicina a pH 1,7.

Las diferencias en el índice de refracción de masa se corrigieron restando la respuesta obtenida de una superficie en blanco. Las inyecciones en blanco también se restan (= doble referencia).

Si una variante ST2 está unida por el anticuerpo investigado comparable a ST2 de tipo salvaje, la variación no influye en la unión del anticuerpo a ST2 y por lo tanto se concluye que el sitio de unión se encuentra fuera de la región ST2 mutada.

Si una variante ST2 no está unida por el anticuerpo investigado comparable a ST2 tipo salvaje, la variación influye en la unión del anticuerpo a ST2 y por lo tanto se concluye que el sitio de unión se encuentra dentro de la región ST2 mutada.

Las propiedades de unión para anticuerpos se muestran en la Tabla 3. La unión de Ra170 está influenciada por Mut2 y Mut3 lo que indica que su sitio de unión se superpone con el tramo de secuencia mutada. La unión Mab523 está influenciada por MU2 y Mut3 y también por MUT4 lo que indica una región de unión más amplia.

5 Tabla 3: Unión de anticuerpo anti-IL-33R hacia diferentes variantes de ST2

Anticuerpo	Unión			
	Mut1	Mut2	Mut3	Mut4
Ra170	+	-	-	+
MAB523	+	-	-	-

Tabla 4: Mutantes ST2

Mutante	Fragmento de secuencia ST2 sustituida	Fragmento de secuencia IL-1R, que sustituye el fragmento de secuencia ST2
Mut1	Id. de Sec. N°: 13	Id. de Sec. N°: 17
Mut2	Id. de Sec. N°: 14	Id. de Sec. N°: 18
Mut3	Id. de Sec. N°: 15	Id. de Sec. N°: 19
Mut4	Id. de Sec. N°: 16	Id. de Sec. N°: 20

10

Ejemplo 7

Ensayo NK

15 La IL33 amplifica tanto las respuestas T_H1 como T_H2 mediante la activación de diferentes leucocitos y también las células NK (Smithgall, M.D., et al., Int. Immunol. 20 (2008) 1019-1030). En el siguiente ensayo, la secreción de IFN-γ mediante las células NK fue inducida por co-cultivo de IL12 e IL33 y su inhibición sirvió como lectura durante la caracterización de anticuerpos anti-IL33R.

20 Después del aislamiento de las células blancas de la sangre (linfocitos) a partir de sangre sana, las células NK se purificaron a partir de PBMC usando el equipo de aislamiento de células NK negativas (Miltenyi, # 130-092-657). La pureza media fue > 96%.

Reactivos

25

- IL-12 humano (Sigma, # 12276, concentración final [c.f.] = 1 ng / ml)

- IL-33 humano (Peprotech, # 200-33, c.f. = 10 ng / ml)

30

- conjunto IFN-γ CBA flex (BD, # 558,269)

- medio de células NK: RPMI 1640 (PAN, # P04-17500), suplementado con FCS 10% (Invitrogen o PAA), 1% de piruvato de sodio (Gibco Invitrogen, # 11360) y L-glutamina (Gibco Invitrogen, # 25030-024), así como 0,1% β-mercaptoetanol (Gibco Invitrogen, # 31350-O10).

35

Se sembraron 1x10⁵ células NK / pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo plano, opcionalmente pretratado con anticuerpos muestra o anticuerpos de control de isotipo a diferentes concentraciones y se incubaron durante una hora a 37 °C. Las células NK fueron luego estimuladas con 10 ng / ml de IL-33 y 1 ng / ml de IL-12 y se incubaron durante 20 horas. Después de esto, los sobrenadantes se recogieron, se centrifugaron y se analizaron para la producción de IFN-γ. Para la cuantificación de IFN-γ se utilizó la plataforma de ajuste CBA flex (BD TM, utilizando un FACS Canto II). Se determinó el valor de CI50 que era 0,27 nM para ra170, 1,3 nM para ra170 10,12, 1,8 nM para ra170 11,12, 2,3 nM para PAB AF523 y sin inhibición para Mab 523.

40

Ejemplo 8

45

Ensayo de viabilidad de eosinófilos

Para describir el impacto de la IL-33 en la prolongación de la supervivencia de eosinófilos se realizó un ensayo basado en Chow, J.Y., et al., Cellular & Molecular Immunology 7 (2010) 26-34 de, utilizando eosinófilos recién aislados. Como la viabilidad de los eosinófilos humanos depende de la adición de IL-33, la pre-incubación con mAb [ST2] anti-IL-33R humana a diferentes concentraciones inhibe este efecto. Los granulocitos se aislaron de sangre completa mediante centrifugación en gradiente Ficoll-Paque PLUS TM (GE Healthcare, # 17-1440-03). Después de la lisis de los eritrocitos, el botón sedimentado de eritrocitos/ granulocitos se utilizó para purificar eosinófilos a través de un equipo de aislamiento de eosinófilos negativo (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, # 130-092-010).

55

Reactivos:

- IL-33 humano (20 ng / ml)

5 - Ensayo de viabilidad de células luminiscentes, Cell Titer Glo®, (Promega, # 7571)

- Medio de cultivo de eosinófilos: RPMI 1640 suplementado con FCS, 1% de piruvato de sodio, L-glutamina, y 0,1% β-mercaptoetanol.

10 Se transfirieron 1×10^5 eosinófilos / pocillo a una placa de 96 pocillos de fondo plano antes de añadir medio que contiene el anticuerpo de la muestra [5 µg / ml de concentración final] y se incubaron durante una hora a 37 °C. Entonces, se añadió IL33 a una concentración final de 20 ng / ml y los eosinófilos se incubaron a 37 °C en un incubador humidificado. Después de 40 h., se determinó la viabilidad de los eosinófilos. Para ra170 se encontró un valor de CI50 de 1,3 nM.

15 Ejemplo 9

Ensayo de mastocitos primarios

20 Los mastocitos son fundamentales en el desarrollo y mantenimiento de las reacciones alérgicas mediante la amplificación de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas. Los mastocitos se localizan en los tejidos y no en la sangre circulante. Por lo tanto, para obtener mastocitos humanos a partir de sangre, las células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ se diferenciaron en mastocitos en presencia de factor de células madre humano (SCF), IL-3 e IL-6 durante 5-6 semanas. El siguiente protocolo se basa en la publicación de Saito, H., et al., Nature Protocols 1 (2006), 2178-2183.

25 Después del aislamiento de las células blancas de la sangre (véase el Ejemplo 10), las células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ se purificaron a partir de PBMC utilizando el equipo CD34 Microbead (Miltenyi Biotec, # 130-046-702). El rendimiento promedio fue $1-2 \times 10^5$ células totales por donante; por lo general se obtuvieron 50% de células CD34⁺ CD117⁺.

30 Reactivos y protocolo de diferenciación:

- Methocult® (Stem Cell Tech., # H4236)
- Suplemento insulina-transferrina-selenio (Invitrogen, # 51300-044)
- BSA, albúmina de suero bovino
- SCF humano
- IL3 e IL6 humano
- Medio básico para mastocitos (BMC): IMDM (Medio de Dulbecco modificado de Iscove), suplementado con 0,1% de β-mercaptoetanol y 1% penicilina / estreptomina.

35 Después de la purificación, $1,5 \times 10^5$ células CD34⁺ purificadas se resuspendieron en medio BMC, suplementado con IL-3, IL-6 y SCF, BSA, Methocult®, y el suplemento insulina-transferrina-selenio y se sembraron en 10-12 pocillos de una placa de 24 pocillos y se cultivaron durante 5-6 semanas.

45 Ensayo funcional de mastocitos

Después de la fase de expansión y diferenciación se utilizaron los mastocitos en un ensayo funcional para analizar el impacto antagonista de anticuerpos anti-IL33R.

50 Reactivos y medio

- 20 ng / ml de IL-33 humano
- IL-5 humana
- IL-13 humana
- Medio básico para mastocitos.

55 10^5 mastocitos / pocillo se sembraron en una placa de fondo plano de 96 pocillos. En primer lugar, los mastocitos fueron pre-tratados con anticuerpos de control de isotipo o de muestra durante una hora a 37 °C. Para la determinación de CI₅₀ los anticuerpos fueron utilizados en diferentes concentraciones, que suele comenzar con una c.f. de 5 µg / ml y se diluyeron en 1:3 pasos. A continuación se añadieron 20 ng / ml de IL-33 y las células se incubaron durante aproximadamente 40 a 48 horas a 37 °C antes de cuantificar (inhibición de) los niveles de citoquinas T_H2. Después del tiempo de incubación indicado, las suspensiones de células se transfirieron a una placa de fondo en V y se sedimentaron (400 xg, 10 min a TA). El sobrenadante se utilizó para determinar los niveles de citoquinas (IL-5 e IL-13). Para ra170 se encontraron valores de CI₅₀ de hasta 0,4 nM (IL-13) y 0,2 (IL-5).

65

Ejemplo 10

Ensayo Th2 humano

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron a partir de voluntarios sanos por un gradiente de densidad de Ficoll Hypaque. Después de lavar las células con PBS pH 7,2 con 2 mM de EDTA, las células se lavaron una vez con PBS pH 7,2 con 0,5% de BSA y EDTA 2 mM. Se aislaron las células T CD4⁺ vírgenes a partir de las PBMC usando el equipo de aislamiento II de células T CD4⁺ (Miltenyi Biotec) y separación magnética. Las células T enriquecidas se lavaron 3 veces usando RPMI 1640 completo (suplementado con FCS al 10%, 2-mercaptoetanol, L-glutamina, piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales y penicilina / estreptomina), se resuspendieron y se sembraron 0,5 x 10⁶ células / ml en 6 placas de fondo plano, con una proporción 1:1 de Dynabeads T-Activador CD3 / CD28 (Invitrogen), 10 ng / ml de IL-2, 00ng / ml de IL-4, 5 µg / ml de anti-IL-12 (R&D systems), y 5 µg / ml de anti-IFN (R&D systems), y se incubaron durante 4 días a 37 °C. Las células se dividieron, luego se mantuvieron en las mismas condiciones de cultivo durante otros 4 días. Las células se lavaron con RPMI completo dos veces y luego se reposaron en 1 x 10⁶ células / ml en RPMI completo con 2ng / ml de IL2 durante 3 días. Un día antes del ensayo, placas de 96 pocillos de fondo plano (Costar) de alta unión se revistieron con 5 µg / ml de anti-CD3e soluble (BD Bioscience). En el día del ensayo, las células se lavaron con RPMI completo dos veces, y reposaron durante otras 4 horas sin IL-2. Las placas se lavaron con PBS tres veces. Se sembraron 1x10⁵ células / pocillo en RPMI completo, suplementado con 1 µg / ml de anti-CD28 (BD Bioscience). Las células fueron tratadas posteriormente con dilución en serie de anticuerpo anti-ST2 o anticuerpo control de isotipo (0-10 µg / ml) durante 30 min, luego se volvieron a estimular con 10 ng / ml de IL33 (Peprotech), en un volumen total de 200 µl, después se cultivaron a 37 °C bajo 5% de CO₂ durante 64 horas. Se recogieron los sobrenadantes para un ELISA de IL-5 / IL-13 (R&D Systems). Para ra170 se determinó el valor de CI₅₀ que era 2,77±2,58 nM (Media±DE, n = 6) para la IL-5, y 1,10±1,05 (Media±DE, n = 5) para IL-13.

Ejemplo 11

Ensayo de células NK de Cynomolgus

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron de cynomolgus por un gradiente de densidad de Ficoll Hypaque. Después de lavar las células con PBS pH 7,2 con EDTA 2 mM, las células se lavaron una vez con PBS pH 7,2 con 0,5% de BSA y EDTA 2 mM. Se aislaron las células NK a partir de PBMC después de la selección positiva con microperlas CD16 de primates no humanos tras el agotamiento d monocitos por microperlas CD56 de primate no humano (Miltenyi Biotec) y separación magnética por el separador AutoMACS™. Las células NK enriquecidas se lavaron tres veces usando RPMI 1640 completo (suplementado con FCS al 10%, 2-mercaptoetanol, L-glutamina, piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales y penicilina / estreptomina), se resuspendieron y se sembraron a 2,5 x10⁴ células / pocillo en 96 placas de fondo redondo en RPMI completo. Las células se trataron posteriormente con dilución en serie de anticuerpo anti-ST2 o anticuerpo de control de isotipo (0-10 µg / ml) durante 30 min, se volvieron a estimular con 20 ng / ml de IL-33 humano más 10 ng / ml de IL-12 recombinante de cynomolgus en un volumen total de 200 µl, después se cultivaron a 37 °C bajo 5% de CO₂ durante 24 horas. Se recogieron los sobrenadantes de cynomolgus para un ELISA de IFN_γ (MabTech). Se determinó el valor de CI₅₀ que fue de 0,109±0,073 nM (Media±DE, n = 3) para ra170.

Ejemplo 12

Ensayo de línea celular de basófilos (KU812)

La línea celular de basófilos humanos KU812 (ATCC CRL 2099) se cultivó en medio RPMI 1640 con un 10% de FBS y penicilina/ estreptomina. Las células se dividieron dos veces a la semana con una densidad celular no superior a 0,5 millones de células / ml. Los controles de calidad se realizaron de forma rutinaria mediante análisis de FACS de la expresión en superficie celular de c-kit y FcεRI. En el día del ensayo, las células KU812 (0,2 millones de células / pocillo) se sembraron en 96 placas de cultivo de fondo redondo con medio completo fresco. Las células se trataron con dilución en serie de anticuerpos o isotipos de control durante 1 hora a 37 °C. Después del tratamiento, las células se estimularon con 10 ng / ml de IL-33 (Peprotech) durante la noche en una incubadora a 37 °C. Las células se centrifugaron y los sobrenadantes se recogieron para el análisis de citoquinas. Se analizaron las citoquinas (IL-5, IL-13 y GM-CSF) siguiendo el procedimiento del fabricante MSD. Se determinó los valores de CI₅₀ de ra170 a partir de tres experimentos independientes que fueron 3,49±3,43 nM (Media±DE, IL-13), 1,48±0,75 nM (Media±DE, IL-5), y 1,31±1,22 nM (Media±DE, GM-CSF). Se determinaron los valores de CI₉₀ para ra170 de 7,51±0,99 nM (Media±DE, IL-13), 4,60±1,65 nM (Media±DE, IL-5), y 9,10±4,74 nM (Media±DE, GMCSF).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Anticuerpos contra IL33R humano y la utilización de los mismos

<130> 27240 FT

<150> PE11155684

ES 2 549 637 T3

<151> 2011-02-23
 <160> 34
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 5 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus
 <400> 1

Asp Gln Tyr Arg Ser Ser Gly Val Ser Asp Tyr Asp Ile
 1 5 10

10

<210> 2
 <211> 16
 <212> PRT
 15 <213> Oryctolagus cuniculus
 <400> 2

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

20

<210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus
 <400> 3

25

Ser His Asp Met Ser
 1 5

30

<210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus
 <400> 4

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

35

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus
 40 <400> 5

Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

45

<210> 6
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus
 <400> 6

Gln Ser Ser Gln Ser Val Gly Asn Asn Asn Asp Leu Ala
 1 5 10

50

<210> 7
 <211> 118
 <212> PRT
 55 <213> Oryctolagus cuniculus

<400> 7

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

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

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

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

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

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Gln
 85 90 95

Tyr Arg Ser Ser Gly Val Ser Asp Tyr Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

- 5 <210> 8
- <211> 111
- <212> PRT
- <213> *Oryctolagus cuniculus*
- <400> 8

10

ES 2 549 637 T3

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

5 <210> 9
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 9

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

10

ES 2 549 637 T3

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

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

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

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

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

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

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

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

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

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

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

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

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

- 5 <210> 10
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 10

ES 2 549 637 T3

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

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

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

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

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

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

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

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

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

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

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

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

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

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

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

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

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

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

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

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

<210> 11
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 11

5

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

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

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

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

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

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

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

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

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

10

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 12
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 12

5

ES 2 549 637 T3

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

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 13
<211> 9
5 <212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Fragmento 1 de la secuencia de ST2 reemplazada por mut1
<400> 13

Ser Glu Lys Asn Ser Lys Ile Tyr
1 5

<210> 14
<211> 8
15 <212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Fragmento 2 de la secuencia de ST2 reemplazada por mut1
<400> 14

Ser Glu Lys Asn Ser Lys Ile Tyr
1 5

<210> 15
<211> 8
25 <212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Fragmento 3 de la secuencia de ST2 reemplazada por mut1
<400> 15

Arg Ala His Lys Ser Phe Leu Val
1 5

<210> 16
<211> 8
<212> PRT

<213> Artificial
 <220>
 <223> Fragmento 4 de la secuencia de ST2 reemplazada por mut1
 <400> 16

5

Leu Ala Ala Val Leu Trp Gln Leu
1 5

<210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fragmento 1 mut1 de IL-1R, que reemplaza el fragmento de ST2 de la secuencia 13
 <400> 17

10

15

Ala Gln Ala Ile Phe Lys Gln Lys Leu
1 5

<210> 18
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fragmento 2 mut2 de IL-1R, que reemplaza el fragmento de ST2 de la secuencia 14
 <400> 18

20

25

Val Ala Gly Asp Gly Gly Leu Val
1 5

<210> 19
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fragmento 3 mut3 de IL-1R, que reemplaza el fragmento de ST2 de la secuencia 15
 <400> 19

30

35

Ser Gly Val Lys Asp Arg Leu Ile
1 5

<210> 20
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fragmento 4 mut4 de IL-1R, que reemplaza el fragmento de ST2 de la secuencia 16
 <400> 20

40

45

Ser Asp Ile Ala Tyr Trp Lys Trp
1 5

<210> 21
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> dominio variable de la cadena pesada, humanizado ra170 11.12 (VH11)
 <400> 21

50

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

Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser His Asp
 20 25 30

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

Tyr Ile Trp Ser Asp Glu Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Gln Gly
 50 55 60

Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 65 70 75 80

Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 85 90 95

Asp Gln Tyr Arg Ser Ser Gly Val Ser Asp Tyr Asp Ile Trp Gly Pro
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 22
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> CDR1 de la cadena pesada, Mab ra170 11.12
 10 <400> 22

Ser His Asp Ile Ser
 1 5

15 <210> 23
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> CDR2 de la cadena pesada, Mab ra170 11.12
 20 <400> 23

Tyr Ile Trp Ser Asp Glu Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Gln Gly
 1 5 10 15

25 <210> 24
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> CDR3 de la cadena pesada, Mab ra170 11.12
 30 <400> 24

ES 2 549 637 T3

Asp Gln Tyr Arg Ser Ser Gly Val Ser Asp Tyr Asp Ile
 1 5 10

- 5 <210> 25
- <211> 120
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> dominio variable de la cadena pesada, ra170 10.12 humanizado (VH10)
- 10 <400> 25

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

Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser His Asp
 20 25 30

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

Tyr Ile Trp Ser Asp Glu Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Gln Gly
 50 55 60

Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 65 70 75 80

Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 85 90 95

Asp Gln Tyr Arg Ser Ser Gly Val Ser Asp Tyr Asp Ile Trp Gly Pro
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

- 15 <210> 26
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> CDR1 de la cadena pesada, Mab ra170 10.12
- 20 <400> 26

Ser His Asp Ile Ser
 1 5

- 25 <210> 27
- <211> 16
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> CDR2 de la cadena pesada, Mab ra170 10.12
- 30 <400> 27

Tyr Ile Trp Ser Asp Glu Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Gln Gly
1 5 10 15

5 <210> 28
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> cadena pesada CDR3, Mab ra170 10.12
10 <400> 28

Asp Gln Tyr Arg Ser Ser Gly Val Ser Asp Tyr Asp Ile
1 5 10

15 <210> 29
<211> 327
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 29

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

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

ES 2 549 637 T3

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

ES 2 549 637 T3

275

280

285

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 30

<211> 111

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> dominio variable de la cadena ligera, ra170 humanizado (11.12 y 10.12)

<400> 30

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

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

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

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

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

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

Asp Ala Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

10

<210> 31

<211> 13

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR1 de la cadena ligera, Mab ra170 10.12 y 11.12

<400> 31

20

Arg Ser Ser Gln Ser Val Gly Asn Asn Asn Asp Leu Ala
1 5 10

<210> 32

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo que se une al IL33R humano, que se caracteriza porque el dominio variable de la cadena pesada comprende el Id. de Sec. N°: 7 y el dominio variable de la cadena ligera comprende el Id. de Sec. N°: 8.
2. Un anticuerpo según la reivindicación 1, que se caracteriza por ser una variante de anticuerpo humanizado o al que se le ha eliminado el epítipo de células T, quimérica.
- 10 3. Un anticuerpo que se une a IL33R'' humano, que se caracteriza porque el dominio variable de la cadena pesada comprende el Id. de Sec. N°: 21 y el dominio variable de la cadena ligera comprende el Id. de Sec. N°: 30.
4. Un anticuerpo que se une a IL33R humano, que se caracteriza porque el dominio variable de la cadena pesada comprende el Id. de Sec. N°: 25 y el dominio variable de la cadena ligera comprende el Id. de Sec. N°: 30.
- 15 5. Un anticuerpo según las reivindicaciones de 1 a 4, que se caracteriza por ser de isotipo humano IgG1 o IgG4 modificado en la región bisagra en la posición de los aminoácidos 216 a 240, y/ o en la segunda región inter-dominio en la posición de aminoácidos 327 a 331 entre C_{H2} y C_{H3}.
- 20 6. Un anticuerpo según la reivindicación 5, que se caracteriza porque comprende las mutaciones alanina en lugar de leucina en la posición del aminoácido 234 y alanina en lugar de leucina en la posición del aminoácido 235.
7. Un anticuerpo según la reivindicación 5, que se caracteriza porque comprende las mutaciones ácido glutámico en lugar de leucina en la posición del aminoácido 235 y prolina en lugar de serina en la posición el amino ácido 228.
- 25 8. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende un anticuerpo según las reivindicaciones de 1 a 7.
9. La utilización de un anticuerpo según las reivindicaciones de 1 a 5 para la fabricación de una composición farmacéutica.
- 30 10. Un anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones de 1 a 5 para su utilización en el tratamiento de la artritis reumatoide, la colitis ulcerosa o el asma.
- 35 11. Un ácido nucleico que codifica un anticuerpo según la reivindicación 4.
12. Un ácido nucleico que codifica un anticuerpo según la reivindicación 5.
13. Un ácido nucleico que codifica un anticuerpo según la reivindicación 6.
- 40 14. Un vector de expresión que se caracteriza porque comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11, 12 o 13 para la expresión de un anticuerpo de unión a IL33R en una célula huésped procariota o eucariota.
- 45 15. Un método para la producción de un anticuerpo recombinante de unión a IL33R, que se caracteriza por expresar un ácido nucleico según la reivindicación 11, 12 o 13 en una célula huésped procariota o eucariota, y la recuperación de dicho anticuerpo a partir de dicha célula o del sobrenadante del cultivo celular.