(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 549 767**

(51) Int. CI.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2001 E 10185626 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 2292665**

(54) Título: **Uso de anticuerpos de interleuquina-4 y composiciones de los mismos**

(30) Prioridad:

26.05.2000 US 579808
19.09.2000 US 665343
15.02.2001 US 785934
01.05.2001 US 847816

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.11.2015

(73) Titular/es:

IMMUNEX CORPORATION (100.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320-1799, US

(72) Inventor/es:

PLUENNEKE, JOHN D;
ARMITAGE, RICHARD J;
ESCOBAR, JOSE CARLOS y
MORRIS, ARVIA E

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

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

Uso de anticuerpos de interleuquina-4 y composiciones de los mismos

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La interleuquina-4 (IL-4), previamente conocida como factor estimulante de células B, o BSF-1, se caracterizó originalmente por su capacidad de estimular la proliferación de las células B en respuesta a bajas concentraciones de anticuerpos dirigidos a inmunoglobulinas de superficie. Se ha mostrado que IL-4 posee un espectro mucho más amplio de actividades biológicas, incluyendo la co-estimulación del crecimiento de las células T, mastocitos, granulocitos, megacariocitos y eritrocitos. Además, IL-4 estimula la proliferación de varias líneas celulares dependientes de IL-2 e IL-3, induce la expresión de moléculas de la clase II del complejo de histocompatibilidad principal en células B no estimuladas y aumenta la secreción de los isotipos IgE e IgG1 por las células B estimuladas. IL-4 está asociada con una respuesta inmune de tipo TH2, siendo una de las citoquinas secretadas por las células TH2.

Las IL-4 murinas y humanas se han identificado y caracterizado, incluyendo la clonación de los ADNc de IL-4 y la determinación de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos codificadas. (Véanse Yokota et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83*: 5894, 1986; Noma et al., *Nature 319*: 640, 1986; Grabstein et al., *J. Exp. Med. 163*: 1405, 1986; y Patente U.S. 5.017.691).

IL-4 se une a receptores de la superficie celular particulares, lo que resulta en la transducción de una señal biológica a las células como varias células efectoras inmunes. Los receptores de IL-4 se han descrito y la información sobre la secuencia de ADN y aminoácidos se presentan en Mosley et al., *Cell 59*: 335-348, 20 de octubre, 1989 (IL-4R murino); Idzerda et al., *J. Exp. Med. 171*: 861-873, marzo 1990 (IL-4R humano); y Patente U.S. 5.599.905. El receptor de IL-4 descrito en estas publicaciones se refiere algunas veces como IL-4Rα.

Se ha publicado que otras proteínas están asociadas con IL-4Rα en algunos tipos celulares y que son componentes de complejos del receptor de IL-4 con múltiples subunidades. Una de dichas subunidades es IL-2Rγ, también conocido como IL-2Rγ_c. (Véase la discusión sobre los complejos de IL-4R en Sato et al., *Current Opinion in Cell Biology*, 6: 174-179, 1994). Se ha publicado que IL-4Rα es un componente de determinados complejos del receptor de IL-13 con múltiples subunidades (Zurawski et al., *J. Biol. Chem*. 270 (23), 13869, 1995; de Vries, *J. Allergy Clin. Immunol*. 102(2): 165, agosto 1998; y Callard et al., *Immunology Today*, 17(3): 108, marzo 1996).

IL-4 se ha implicado en varios trastornos, ejemplos de los cuales son la alergia y el asma. Los estudios sobre las propiedades biológicas de IL-4 continúan, en un esfuerzo para identificar actividades adicionales asociadas con esta citoquina pleyotrópica y para elucidar el papel que puede jugar IL-4 en varios procesos biológicos y enfermedades.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal humano capaz de inhibir una actividad biológica inducida por IL-4 que compite para la unión con un anticuerpo de referencia frente al receptor de IL-4 (IL-4R) humano, en el que:

a) la cadena ligera del anticuerpo de referencia comprende la secuencia de SEQ ID NO:10 y la cadena pesada del anticuerpo de referencia comprende la secuencia de SEQ ID NO:12; o

b) la cadena ligera del anticuerpo de referencia comprende la secuencia de SEQ ID NO:14 y la cadena pesada del anticuerpo de referencia comprende la secuencia de SEQ ID NO:16; o

c) la cadena ligera del anticuerpo de referencia comprende la secuencia de SEQ ID NO:18 y la cadena pesada del anticuerpo de referencia comprende la secuencia de SEQ ID NO:20; o

d) la cadena ligera del anticuerpo de referencia comprende la secuencia de SEQ ID NO:22 y la cadena pesada del anticuerpo de referencia comprende la secuencia de SEQ ID NO:24.

Dicho anticuerpo puede ser capaz adicionalmente de inhibir una actividad biológica inducida por IL-13.

La invención también proporciona dicho anticuerpo para uso en un método para tratar dermatitis, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, o asma, y dicho anticuerpo puede estar en la forma de una composición que comprende adicionalmente un diluyente, excipiente, o vehículo.

El anticuerpo de la invención puede competir para la unión a un IL-4R que comprende los aminoácidos 1 a 197 de SEQ ID NO:2.

También se proporciona un ácido nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo de la invención.

También se proporciona un ácido nucleico que codifica la cadena pesada del anticuerpo de la invención.

Un aspecto adicional proporciona una célula huésped que comprende el ácido nucleico que codifica la cadena pesada o cadena ligera del anticuerpo de la invención.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

Las FIGURAS 1A-C presentan la secuencia de nucleótidos de la región codificadora de un ADNc del receptor de IL-4 humano. También se presenta la secuencia de aminoácidos codificada por el ADNc. El clon de ADNc se aisló a partir de una biblioteca de ADNc obtenida de una línea de células T humana T22. La proteína codificada comprende (desde el extremo N al C terminal) un péptido señal N-terminal, seguido de un dominio extracelular, una región transmembrana (subrayada) y un dominio citoplásmico, como se discute adicionalmente más adelante. Las secuencias del ADN y de aminoácidos de las Figuras 1A a 1C también se presentan en las SEQ ID NOS:1 y 2, respectivamente.

Las Figuras 2A a 2C representan la inserción dirigida de un casete neo en el sitio Sma I del exón μ1. La construcción se empleó para generar ratones transgénicos, como se describe en el Ejemplo 2. La Figura 2A es un diagrama esquemático de la estructura genómica del locus μ. Las cajas llenas representan los exones μ. La Figura 2B es una diagrama esquemático del vector de direccionamiento CmD. Las líneas de puntos indican aquellas secuencias genómicas μ incluidas en la construcción. Las secuencias plasmídicas no se muestran. La Figura 2C es un diagrama esquemático del locus diana μ en el que el casete neo se ha insertado en μ1.

Las Figuras 3A y 3B presentan la secuencia de nucleótidos de un vector designado pGP1k, como se describe en el Ejemplo 3 más adelante. Esta secuencia de nucleótidos también se presenta en SEQ ID NO:4.

La Figura 4 presenta un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (región V_L, designada V_K para cadena variable kappa) para varios anticuerpos producidos frente a IL-4R humano. Estos anticuerpos y secuencias se describen adicionalmente en los ejemplos 6, 8 y 9 más adelante. La primera secuencia en el alineamiento es para un anticuerpo designado 1B7. En las secuencias para los demás anticuerpos, se muestran los residuos que se diferencian del residuo encontrado en esa posición en 1B7 y los residuos que son idénticos al residuo encontrado en esa posición en 1B7 están indicados por "-".

La Figura 5 presenta un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (V_H) para varios anticuerpos producidos frente a IL-4R humano. Estos anticuerpos y secuencias se describen adicionalmente en los ejemplos 6, 8 y 9 más adelante. La primera secuencia en el alineamiento es para un anticuerpo designado 1B7. En las secuencias para los demás anticuerpos, se muestran los residuos que se diferencian del residuo encontrado en esa posición en 1B7 y los residuos que son idénticos al residuo encontrado en esa posición en 1B7 están indicados por "-".

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal humano capaz de inhibir una actividad biológica inducida por IL-4 y el uso de éste en métodos para tratar determinadas afecciones inducidas por IL-4, y para inhibir actividades biológicas de interleuquina-4 (IL-4) *in vivo*. Un método comprende administrar un antagonista de IL-4 a un paciente que padece dicha afección. También se proporcionan composiciones para uso en dichos métodos para tratar afecciones inducidas por IL-4.

Entre las afecciones que pueden tratarse según la presente invención están trastornos pulmonares en los que IL-4 juega un papel, afecciones en las que la disrupción de la barrera epitelial inducida por IL-4 juega un papel en particular dermatitis de contacto, dermatitis y dermatitis atópica.

La actividad o actividades biológicas de IL-4 que se inhiben por un anticuerpo según la invención proporcionado en la presente memoria son actividades que juegan un papel en la enfermedad particular que se va a tratar.

Los anticuerpos proporcionados en la presente memoria incluyen, anticuerpos monoclonales humanos que se unen al receptor de IL-4 humano, y que pueden funcionar como antagonistas tanto de IL-4 como de IL-13.

Indicaciones

La presente invención proporciona el anticuerpo monoclonal humano de la invención para uso en métodos que comprenden la administración de un antagonista de IL-4 a un paciente que padece cualquiera de varias afecciones inducidas por la actividad biológica de IL-4. Las afecciones inducidas por IL-4 incluyen afecciones causadas o exacerbadas, directamente o indirectamente, por IL-4. Otros factores o citoquinas también pueden jugar un papel en dichas afecciones, pero IL-4 induce o media la afección en algún grado, es decir, al menos en parte.

Las actividades biológicas de IL-4 están mediadas a través de la unión a receptores de la superficie celular específicos, referidos como receptores de interleuquina-4 (IL-4R). Las afecciones inducidas por IL-4 incluyen aquellas que surgen a partir de respuestas biológicas que resultan de la unión de IL-4 a un receptor de IL-4 nativo en una célula, o que pueden inhibirse o suprimirse evitando que IL-4 se una a un receptor de IL-4. Las afecciones que pueden tratarse incluyen, pero no están limitadas a, trastornos médicos caracterizados por una expresión anormal o

excesiva de IL-4, o por una respuesta anormal del huésped a la producción de IL-4. Los ejemplos adicionales son afecciones en las que juega un papel la producción de anticuerpos inducida por IL-4 o la proliferación o llegada de un tipo celular particular. Los trastornos inducidos por IL-4 incluyen aquellos en los que IL-4 induce la regulación al alza de los receptores de IL-4 o la producción aumentada de otra proteína que juega un papel en una enfermedad (por ejemplo, otra citoquina).

El anticuerpo puede usarse en un método para tratar a un mamífero, incluyendo un paciente humano, que tiene dicho trastorno médico que comprende administrar un antagonista de IL-4 al mamífero o poner en contacto de otra manera IL-4 endógena con un antagonista, por ejemplo, en un procedimiento *ex vivo*. Las afecciones que pueden tratarse según la presente invención incluyen, pero no están limitadas a, afecciones en las que juega un papel la disrupción de la barrera inducida por IL-4 (por ejemplo, afecciones caracterizadas por una función de barrera epitelial disminuida en el pulmón o dermatitis, dermatitis de contacto o dermatitis atópica, afecciones pulmonares inducidas por IL-4 (incluyendo asma). Los antagonistas de IL-4 también pueden encontrar uso como adyuvantes de inmunoterapia de alergia y como adyuvantes de vacunas, especialmente cuando dirigen la respuesta inmune hacia una respuesta TH1 serían beneficiosos para tratar o prevenir la enfermedad en cuestión.

Artritis séptica/reactiva

Los antagonistas de IL-4 pueden emplearse para tratar la artritis séptica, que también se conoce como artritis reactiva o artritis bacteriana. La artritis séptica puede desencadenarse por (resultar de, o desarrollarse posteriormente a) una infección con microbios tales como *Staphylococcus aureus*, *Chlamydia trachomatis*, *Yersinia*, por ejemplo, *Y. enterolitica*, *Salmonella*, por ejemplo, *S. enteritidis*, *Shigella* y *Campylobacter*. Se ha publicado que *S aureus* es un patógeno humano importante en la artritis séptica, responsable de la mayoría de los casos.

Las respuestas a IL-4 y Th2 dependientes de IL-4 juegan papeles en la estimulación de la artritis séptica. Pueden emplearse antagonista(s) de IL-4 para inhibir IL-4 y también para suprimir la respuesta Th2 en pacientes que tienen artritis séptica o que presentan riesgo de desarrollar artritis séptica.

IL-4 incrementa la carga bacteriana y la persistencia bacteriana en las articulaciones, inhibiendo el aclaramiento de las bacterias. Los antagonistas de IL-4 pueden emplearse para ayudar en el aclaramiento de las bacterias asociadas con la artritis reactiva, reduciendo de esta manera las manifestaciones clínicas tales como la inflamación en las articulaciones. Los antagonistas de IL-4 pueden administrarse a un paciente humano que padece artritis séptica, para reducir la inflamación de las articulaciones mediada por IL-4. En una estrategia, un antagonista se inyecta en una articulación, por ejemplo, en el fluido sinovial de la rodilla.

El uso de antagonistas de IL-4 puede beneficiar a pacientes que tienen (o presentan el riesgo de tener) artritis séptica suprimiendo una respuesta TH2 y estimulando una respuesta TH1 frente a la infección. Las citoquinas TH2 pueden contribuir a la persistencia bacteriana en la articulación, mientras que una respuesta TH1 juega un papel en la eliminación de las bacterias.

Los antagonistas pueden administrarse a pacientes infectados con bacterias u otros microbios tales como los listados anteriormente, para prevenir el desarrollo de la artritis séptica. El o los antagonistas pueden administrarse después del diagnóstico con dicha infección, pero antes del desarrollo los síntomas clínicos de la artritis séptica.

Enfermedad de Whipple

Tropheryma whippelii es la bacteria causante de la Enfermedad de Whipple, también conocida como lipodistrofia intestinal y lipofagia granulomatosa. La enfermedad se caracteriza por esteatorrea, frecuentemente linfadenopatía generalizada, artritis, fiebre y tos. También se ha indicado en los pacientes con Enfermedad de Whipple una abundancia de macrófagos "espumosos" en la lámina propria del yeyuno y ganglios linfáticos que contienen partículas positivas para el ácido peryódico de schiff que aparecen como baciliformes por microscopía electrónica (*Steadman's Medical Dictionary*, 26ª Edición, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1995).

El uso de antagonista(s) de IL-4 puede beneficiar a pacientes que tienen (o presentan el riesgo de desarrollar) Enfermedad de Whipple, restaurando un equilibrio normal entre lps componentes TH1 y TH2 de la respuesta inmune del paciente. La producción incrementada de IL-4 (una citoquina de tipo TH2) y los niveles disminuidos de determinadas citoquinas de tipo TH1 se han asociado con la Enfermedad de Whipple. Las citoquinas TH2 pueden contribuir a la persistencia bacteriana, mientras que una respuesta TH1 juega un papel en el aclaramiento de las bacterias causantes. Los antagonistas de IL-4 pueden administrarse a pacientes infectados con *T. whippelii*, tanto si el paciente presenta o no síntomas clínicos de la Enfermedad de Whipple.

Dermatitis herpetiforme

La dermatitis herpetiforme, también conocida como enfermedad de Duhring, es una afección crónica de la piel caracterizada por lesiones ampollosas en la piel, depósitos cutáneos de IgA y picor. Los pacientes tienen un trastorno inmunobulloso de la piel con una enteropatía sensible al gluten asociada, que está mediada por una respuesta inmune Th2. El o los antagonistas de IL-4 pueden administrarse para inhibir IL-4 y la respuesta Th2,

estimulando así la cicatrización de lesiones presentes y reduciendo o previniendo la formación de ampollas en las superficies corporales extensoras.

Cicatrización hipertrófica

El o los antagonistas de IL-4 pueden administrarse a pacientes que tienen, o que son susceptibles de desarrollar, cicatrización hipertrófica. En un método un antagonista de IL-4 se administra a un paciente con quemaduras. Se cree que una respuesta inmune a las quemaduras y otra lesión juega un papel en la patogénesis de la cicatrización hipertrófica. Se ha publicado una producción incrementada de citoquinas de tipo TH2, incluyendo IL-4 y niveles reducidos de determinadas citoquinas de tipo TH1 en pacientes con quemaduras que tienen cicatrización hipertrófica. El uso de antagonistas de IL-4 puede beneficiar a pacientes que tienen (o presentan el riesgo de desarrollar) cicatrización hipertrófica, suprimiendo una repuesta inmune de tipo TH2.

Urticaria

La urticaria, especialmente las formas crónicas de ésta, tales como urticaria crónica idiopática (CIU), pueden tratarse con un antagonista de IL-4. Los pacientes con CIU tienen niveles séricos de IL-4 más altos que los controles y pueden tener un perfil de citoquinas predominantemente de tipo TH2. Los mastocitos y las células T de tipo Th2 están implicados como células efectoras principales en la urticaria crónica. IL-4 estimula la proliferación de los mastocitos. La desgranulación de los mastocitos da lugar a la liberación de histamina, eritema, eosinofilia, enrojecimiento de la piel y picor posteriores. Los antagonistas de IL-4 se administran para inhibir IL-4 y reducir la respuesta de tipo TH2, ayudando de esta manera a controlar la urticaria de un paciente.

Colitis ulcerosa: otros trastornos del tracto gastrointestinal

IL-4 está implicada en la patogénesis de la colitis ulcerosa. Las citoquinas de tipo Th2 incluyendo IL-4 pueden predominar en la mucosa colónica de los pacientes con este trastorno. El uso de antagonista(s) de IL-4 para suprimir la respuesta TH2 puede paliar esta afección.

Además de la colitis ulcerosa, otros trastornos del tracto gastrointestinal o sistema digestivo pueden tratarse con antagonista(s) de IL-4. Los ejemplos de dichos trastornos incluyen, pero no están limitados a, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), siendo la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn formas de IBD, gastritis, úlceras e inflamación mucosal.

Cualquier afección gastrointestinal en la que IL-4 juega un papel puede tratarse con un antagonista de IL-4. Por ejemplo, las afecciones que implican la inflamación inducida por IL-4 de parte del tracto gastrointestinal pueden tratarse con un antagonista de IL-4. Los ejemplos particulares descritos en la presente memoria están dirigidos al tratamiento de afecciones inflamatorias crónicas en el tracto gastrointestinal.

Otros ejemplos descritos en la presente memoria están dirigidos a afecciones en las que juega un papel la disrupción de la barrera epitelial inducida por IL-4, por ejemplo, afecciones caracterizadas por una función disminuida de la barrera epitelial en al menos una parte del tracto gastrointestinal. Dichas afecciones pueden implicar, por ejemplo, daño en el epitelio que es inducido por IL-4, directamente o indirectamente.

El epitelio intestinal forma una barrera relativamente impermeable entre el lumen y la submucosa. La disrupción de la barrera epitelial se ha asociado con afecciones tales como la enfermedad inflamatoria del intestino. Véase la discusión en Youakim, A. y Ahdieh (*Am. J. Physiol*. 276 (*Gastrointest. Liver Physiol*. 39): G1279-G1288, 1999). Una barrera dañada o "agujereada" puede permitir a los antígenos cruzar la barrera, lo que a su vez induce una respuesta inmune que puede causar un daño adicional al tejido gastrointestinal. Dicha respuesta inmune puede incluir el reclutamiento de neutrófilos o células T, por ejemplo. Un antagonista de IL-4 puede administrarse para inhibir la estimulación no deseada de una respuesta inmune.

Trastornos pulmonares

En la presente memoria se describen métodos para tratar trastornos pulmonares inducidos por IL-4. Dichos trastornos incluyen, pero no están limitados a, fibrosis pulmonar, incluyendo enfermedad pulmonar fibrótica crónica, otras afecciones caracterizadas por la proliferación de fibroblastos o la acumulación de colágeno inducida por IL-4 en los pulmones, afecciones pulmonares en las que juega un papel una respuesta inmune de tipo TH2, afecciones caracterizadas por una función disminuida de la barrera en el pulmón (por ejemplo, que resulta del daño en el epitelio inducido por IL-4) o afecciones en las que IL-4 juega un papel en una respuesta inflamatoria.

La fibrosis quística está caracterizada por la sobreproducción de moco y el desarrollo de infecciones crónicas. La inhibición de IL-4 y la respuesta Th2 reducirá la producción de moco y ayudará a controlar las infecciones tales como aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA).

La micosis broncopulmonar alérgica ocurre principalmente en pacientes con fibrosis quística o asma, en las que es dominante una respuesta inmune Th2. La inhibición de IL-4 y la respuesta Th2 ayudará en el aclaramiento y control de estas infecciones.

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica está asociada con la hipersecrecion de moco y fibrosis. La inhibición de IL-4 y la respuesta Th2 reducirá la producción de moco y el desarrollo de fibrosis mejorando de esta manera la función respiratoria y retrasando la progresión de la enfermedad.

La neumopatía y fibrosis inducidas por bleomicina y la fibrosis pulmonar inducida por radiación son trastornos caracterizados por fibrosis en el pulmón que se manifiesta por el influjo de Th2, células $CD4^+$ y macrófagos, que producen IL-4 que a su vez media el desarrollo de la fibrosis. La inhibición de IL-4 y la respuesta Th2 reducirá o prevendrá el desarrollo de estos trastornos.

La proteinosis alveolar pulmonar se caracteriza por la disrupción del aclaramiento de tensioactivo. IL-4 incrementa el producto tensioactivo. El uso de antagonistas de IL-4 disminuirá la producción de tensioactivo y disminuirá la necesidad de lavado de pulmón completo.

El síndrome de distrés respiratorio del adulto (ARDS) puede atribuirse a varios factores, uno de los cuales es la exposición a químicos tóxicos. Una población de pacientes susceptible a ARDS es los pacientes críticamente enfermos que están con ventiladores. ARDS es una complicación frecuente en dichos pacientes. Los antagonistas de IL-4 pueden aliviar ARDS reduciendo las moléculas de inflamación y adhesión, aunque los métodos para tratar a dichos pacientes no están limitados por un mecanismo particular de acción. Los antagonistas de IL-4 pueden usarse para prevenir o tratar ARDS.

La sarcoidosis se caracteriza por lesiones granulomatosas. En la presente memoria, se contempla el uso de antagonistas de IL-4 para tratar sarcoidosis, particularmente sarcoidosis pulmonar.

Las afecciones en las que la disrupción de la barrera inducida por IL-4 juega un papel (por ejemplo, las afecciones caracterizadas por una función disminuida de la barrera epitelial en el pulmón) pueden tratarse con antagonista(s) de IL-4. El daño en la barrera epitelial en los pulmones puede inducirse por IL-4 directamente o indirectamente. El epitelio en el pulmón funciona como una barrera selectiva que evita que los contenidos del lumen pulmonar entren en la submucosa. Una barrera dañada o "agujereada" permite a los antígenos cruzar la barrera, lo que a su vez induce una respuesta inmune que puede causar un daño adicional al tejido pulmonar. Dicha respuesta inmune puede incluir el reclutamiento de eosinófilos o mastocitos, por ejemplo, Un antagonista de IL-4 puede administrarse para inhibir dicha estimulación no deseable de una respuesta inmune.

Los antagonistas de IL-4 pueden emplearse para estimular la cicatrización del epitelio pulmonar, restaurando así la función de la barrera. Los antagonistas de IL-4 pueden emplearse para estimular la cicatrización del epitelio pulmonar en asmáticos, por ejemplo, Alternativamente, el antagonista se administra para propósitos profilácticos, para prevenir el daño en el epitelio pulmonar inducido por IL-4.

Tuberculosis

Una respuesta inmune de tipo TH2 está implicada en jugar un papel en causar daño tisular (por ejemplo, necrosis de tejido pulmonar) en pacientes con tuberculosis (TB). Los niveles elevados de IL-4 están asociados con TB. La producción de IL-4 puede estar particularmente elevada en la tuberculosis cavitaria (es decir, en pacientes con TB que han desarrollado cavidades pulmonares, que pueden detectarse/visualizarse por técnicas tales como radiografías del pecho).

Los antagonistas de IL-4 pueden beneficiar a los pacientes con TB (especialmente a aquellos con TB cavitaria) suprimiendo una respuesta inmune de tipo TH2 o uniéndose (e inactivando) a IL-4 secretada en exceso. Los métodos para tratar a dichos pacientes no están limitados por un mecanismo particular de acción, sin embargo. Los antagonistas de IL-4 pueden administrarse ventajosamente en una cantidad que restaura el equilibrio deseado entre los componentes TH1 y TH2 de la respuesta inmune y reduce el daño tisular inducido por IL-4 en un paciente.

Síndrome de Churg-Strauss

El síndrome de Churg-Strauss, una enfermedad también conocida como angiitis granulomatosa alérgica, se caracteriza por la inflamación de los vasos sanguíneos en personas con un historial de asma o alergia, y por eosinofilia. El o los antagonistas de IL-4 pueden administrarse para aliviar la inflamación en pacientes con este síndrome. El uso de antagonistas de IL-4 para suprimir una respuesta inmune de tipo TH2, y para combatir la eosinofilia, beneficiaría a los pacientes.

Pre-eclampsia

La pre-eclampsia es una toxemia del embarazo avanzado. La afección se caracteriza por una elevación brusca de la presión sanguínea, generalmente acompañada de edema y albuminuria, durante el tercer trimestre del embarazo.

Las respuestas de tipo TH1 y tipo TH2 elevadas pueden jugar un papel en la afección. Un método descrito en la presente memoria comprende administrar un antagonista de IL-4 a una mujer embarazada que ha desarrollado pre-eclampsia. El antagonista de IL-4 se administra en una cantidad, y durante un periodo de tiempo, suficiente para reducir el nivel de IL-4 (o de las citoquinas de tipo TH2 colectivamente) hasta un nivel que se considera normal

durante el embarazo. En general, el antagonista de IL-4 se administra repetidamente a lo largo de la duración del embarazo.

Escleroderma

El o los antagonistas de IL-4 pueden administrarse a pacientes con escleroderma.

Los antagonistas reducen la síntesis de colágeno inducida por IL-4 por los fibroblastos en los pacientes. Los antagonistas pueden emplearse para prevenir o reducir la fibrosis de los tejidos de la piel y pulmón, así como otros tejidos en los que la fibrosis ocurre en los pacientes con escleroderma, suprimiendo la síntesis de colágeno en dichos tejidos, y para tratar la enfermedad pulmonar relacionada con el escleroderma.

Hiperplasia Benigna de la Próstata

La hiperplasia benigna de la próstata (BPH), también conocida como hipertrofia benigna de la próstata, puede tratarse con antagonista(s) de IL-4. Aunque no se pretende la vinculación a ningún mecanismo de acción particular, la administración de un inhibidor de IL-4 puede beneficiar a un paciente con BPH mediante la supresión de la inflamación inducida por IL-4 o mediante la supresión de una respuesta inmune de tipo TH2.

Enfermedad de Grave

Los anticuerpos dirigidos frente al receptor de la tirotropina juegan un papel importante en la Enfermedad de Grave, un trastorno caracterizado por hipertiroidismo. Los estudios sobre la producción de citoquinas en los pacientes con la Enfermedad de Grave muestran un desplazamiento hacia una respuesta de citoquina de tipo TH2. El uso de un antagonista de IL-4 para suprimir la respuesta inmune de tipo TH2, y suprimir la producción de anticuerpos, beneficiaría a los pacientes con Enfermedad de Grave.

Enfermedad de Células Falciformes

Los pacientes con enfermedad de células falciformes experimentan típicamente periodos intermitentes de exacerbación aguda denominados crisis, clasificándose las crisis como anémicas o vaso-oclusivas. Los antagonistas de IL-4 encuentran uso en el tratamiento o prevención de las crisis de células falciformes, especialmente en pacientes con niveles elevados de IL-4 o en los que la respuesta inmune se ha desplazado hacia una respuesta de tipo TH2. La enfermedad de células falciformes (especialmente la crisis de células falciformes) se ha asociado con una susceptibilidad incrementada a enfermedades infecciosas, incluyendo infecciones bacterianas. La administración de antagonistas de IL-4 a pacientes con enfermedad de células falciformes puede ayudar al paciente a preparar una respuesta inmune frente a las enfermedades infecciosas.

Síndrome de Sjogren

La enfermedad autoinmune conocida como síndrome de Sjogren o síndrome sicca combina típicamente ojos secos y boca seca con un trastorno de los tejidos conectivos, tales como artritis reumatoide, lupus, escleroderma o polimiositis. La gran mayoría de los pacientes son mujeres de mediana edad (o mayores). El síndrome de Sjogren es una enfermedad inflamatoria de las glándulas (por ejemplo, glándulas lacrimales y salivares) y otros tejidos del cuerpo. El síndrome está típicamente asociado con producción de autoanticuerpos.

Los antagonistas de IL-4 pueden administrarse para reducir la respuesta inflamatoria (tal como inflamación de las glándulas, incluyendo las glándulas lacrimales) en dichos pacientes. Los antagonistas de IL-4 pueden beneficiar a los pacientes con síndrome de Sjogren mediante la supresión de una respuesta inmune de tipo TH2 o mediante la unión (e inactivación) a IL-4 en exceso en las lesiones inflamatorias. Sin embargo, los métodos para tratar a los pacientes no están limitados por un mecanismo particular de acción.

Síndrome linfoproliferativo autoinmune

Las manifestaciones del síndrome linfoproliferativo autoinmune incluyen linfoproliferación y producción de autoanticuerpos. Los pacientes con el síndrome tienen según se informa una deficiencia heredada de la apoptosis. Los antagonistas de IL-4 pueden beneficiar a los pacientes con este síndrome mediante la supresión de una respuesta inmune de tipo TH2 o mediante la unión (e inactivación) a IL-4 en exceso en los sitios de la inflamación. Sin embargo, los métodos para tratar a los pacientes no están limitados por un mecanismo particular de acción.

Anemia hemolítica autoinmune

La secreción excesiva de IL-4, y una deficiencia en citoquinas de tipo TH1, están implicadas en contribuir a la patogénesis de la anemia hemolítica autoinmune. Los antagonistas de IL-4 pueden administrarse para beneficiar a los pacientes mediante la reducción de la producción de autoanticuerpos y mediante la restauración de un equilibrio más normal entre los componentes TH1 y TH2 de la respuesta inmune.

Uveítis autoinmune

La uveítis implica la inflamación de la úvea (que se considera generalmente que incluye el iris, cuerpo ciliar, y coroide, considerados conjuntamente). La secreción de IL-4 en exceso está implicada como que juega un papel en la patogénesis de esta enfermedad inflamatoria ocular que es una amenaza para la visión. El o los antagonistas de IL-4 pueden administrarse a un paciente con uveítis para reducir la gravedad de la enfermedad. En una realización, el o los antagonistas de IL-4 pueden administrarse a un individuo que tiene uveoretinitis autoinmune.

Enfermedad de Kawasaki

También conocida como el síndrome de ganglios infáticos mucocutáneos, la enfermedad de Kawasaki (KD) afecta principalmente a niños jóvenes. La enfermedad se caracteriza por cambios particulares en las membranas mucosas que recubren los labios y la boca, y por glándulas linfáticas agrandadas y sensibles. Los síntomas incluyen típicamente fiebre, conjuntivitis, inflamación de los labios y las membranas mucosas de la boca, glándulas hinchadas en la nuca y un sarpullido que cubre las manos y los pies, que da lugar a una piel endurecida, hinchada y descamada en las manos y los pies. En los niños con la Enfermedad de Kawasaki (KD), puede desarrollarse la inflamación de las arterias (vasculitis). Debido al efecto de la enfermedad en el sistema vascular, KD es la causa principal informada de enfermedad cardiaca adquirida en los niños.

Los antagonistas de IL-4 pueden administrarse a pacientes con Enfermedad de Kawasaki, para reducir los niveles elevados de IL-4 en el paciente. La secreción excesiva de IL-4 y una deficiencia en citoquinas de tipo TH1 contribuyen a la patogénesis de la enfermedad.

Esófago de Barrett

El esófago de Barrett es una afección caracterizada por la alteración (posterior a la irritación) de las células del tejido epitelial que recubre la parte inferior del esófago. El reflujo frecuente de los contenidos del estómago en el esófago, durante el tiempo, puede dar lugar al esófago de Barrett. Los pacientes con esófago de Barrett presentan riesgo de desarrollar cáncer de esófago (por ejemplo, adenocarcinoma). Aunque no se pretende la vinculación a un mecanismo particular de acción, la administración de un antagonista de IL-4 puede beneficiar a un paciente con esófago de Barrett mediante la supresión de una respuesta inmune de tipo TH2. Un antagonista de IL-4 puede administrarse a un paciente con esofagitis, para inhibir la progresión a esófago de Barrett.

Nefrosis

La nefrosis, también conocida como síndrome nefrótico, es una enfermedad renal que no es inflamatoria y no es maligna. En la afección conocida como nefrosis de cambio mínimo, el daño glomerular (que se cree que surge a partir de cambios estructurales en las células epiteliales viscerales glomerulares) resulta en anormalidades que incluyen proteinuria. Una respuesta inmune de tipo TH2 (especialmente secreción de las citoquinas de tipo TH2 IL-4 e IL-13) está implicada en jugar un papel en la patogénesis de nefrosis de cambio mínimo.

Otras indicaciones

Los ejemplos adicionales de afecciones que pueden tratarse incluyen pero no están limitados a las siguientes. Los antagonistas de IL-4 pueden emplearse para tratar o prevenir el síndrome hiper IgE, síndrome hipereosinófilo idiopático, reacciones alérgicas a la medicación, enfermedades ampollosas autoinmunes (por ejemplo, pénfigo vulgar o pénfigo bulloso), miastenia grave (una enfermedad muscular autoinmune) y síndrome de fatiga crónica. Los inhibidores de IL-4 pueden emplearse para tratar GVHD; los métodos particulares para tratar GVHD en terapia de combinación con otros agentes terapéuticos como se describe más adelante. Los inhibidores de IL-4 también encuentran uso en el tratamiento o prevención de hepatotoxicidad inducida por fármacos tales como diclofenac (un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo).

Un antagonista de IL-4 puede emplearse como un adyuvante de tratamiento de inmunoterapia de alergia. Los antagonistas de IL-4 encuentran uso adicional como adyuvantes de vacunas, tales como adyuvantes para vacunas del cáncer y vacunas de enfermedades infecciosas. El uso de antagonistas de IL-4 es especialmente ventajoso cuando el favorecer una respuesta inmune de tipo TH1 sería beneficioso para prevenir o tratar la afección para la que se administra la vacuna. Los antagonistas de IL-4 pueden emplearse cuando se desea reducir una respuesta inmune mediada por anticuerpos y/o estimular una respuesta inmune mediada por células T.

Antagonistas de IL-4

Los antagonistas de IL-4 que pueden emplearse incluyen compuestos que inhiben una actividad biológica de IL-4. Las actividades biológicas inducidas por IL-4 que se van a inhibir por los anticuerpos de la invención, para uso en métodos proporcionados en la presente memoria, son actividades que directamente o indirectamente juegan un papel en la afección que se va a tratar.

Los ejemplos de antagonistas de IL-4 descritos en la presente memoria incluyen, pero no están limitados a, receptores de IL-4 (IL-4R), anticuerpos, otras moléculas de unión a IL-4, y muteínas de IL-4 como se discute

adicionalmente más adelante. Los anticuerpos pueden unirse a IL-4 o pueden unirse a un receptor de IL-4, por ejemplo.

Los antagonistas que se unen a IL-4 incluyen pero no están limitados a receptores de IL-4 y anticuerpos anti-IL-4. La IL-4 endógena que se une a dicho antagonista no puede de esta manera unirse a su receptor natural en las superficies celulares *in vivo*, y así no puede manifestar las actividades biológicas mediadas por IL-4.

Los diferentes tipos de antagonistas pueden actuar en diferentes sitios o por diferentes mecanismos de acción. Los ejemplos incluyen pero no están limitados a antagonistas que interfieren con la unión de IL-4 a los receptores de la superficie celular o que inhiben la transducción de las señales. El sitio de acción puede ser intracelular (por ejemplo, mediante la interferencia con una cascada de señalización intracelular), en la superficie de una célula o extracelular. Los antagonistas que actúan mediante la interferencia con la interacción de IL-4 con IL-4R, pueden unirse bien a IL-4 o al receptor. Un antagonista no necesita inhibir completamente una actividad inducida por IL-4 para encontrar uso en la presente invención; en lugar de esto, los antagonistas que reducen una actividad particular de IL-4 también se contemplan para usarse.

Las discusiones presentadas anteriormente de mecanismos particulares de acción para los antagonistas de IL-4 en el tratamiento de enfermedades particulares son sólo ilustrativas y los métodos presentados en la presente memoria no están vinculados a éstas. Los mecanismos de acción por los que los antagonistas de IL-4 mejoran las enfermedades no están limitados a los discutidos anteriormente.

Para tratar trastornos particulares, una antagonista de IL-4 puede reducir la cantidad de IL-4 activa en un sitio particular en el cuerpo que está implicado en el trastorno. Los antagonistas que se unen a IL-4 de manera que no puede unirse más a receptores celulares endógenos reducen funcionalmente la cantidad de IL-4 activa disponible para inducir respuestas biológicas.

Un antagonista de IL-4 puede aliviar un trastorno mediante la reducción de la cantidad de IL-4 endógena libre que está circulando en el cuerpo, por ejemplo, en el torrente sanguíneo o en un tejido particular. Cuando la acción de IL-4 en dicho tejido juega un papel en la patogénesis de la enfermedad, el antagonista sirve para bloquear la acción de IL-4 en el tejido, aliviando de esta manera el trastorno. En un ejemplo adicional, los antagonistas pueden inhibir el reclutamiento inducido por IL-4 de células a un sitio o tejido en el cuerpo, en el que dicho reclutamiento juega un papel en causar o exacerbar una enfermedad. Los antagonistas pueden inhibir un influjo mediado por IL-4 de células implicadas en una respuesta inmune o inflamatoria. Un antagonista puede actuar mediante la reducción de la proliferación, activación, migración, influjo o acumulación de un tipo de célula particular, o mediante la inhibición de una respuesta biológica directamente o indirectamente atribuible a un tipo de célula particular. Los ejemplos de tipos de células particulares son fibroblastos, mastocitos y eosinófilos.

Como se ha discutido anteriormente, algunas afecciones pueden tratarse mediante la supresión de una respuesta inmune de tipo TH2. IL-4 está asociada con una respuesta TH2, y es una de las citoquinas secretadas por las células T auxiliares de tipo 2 (células TH2). Un antagonista de IL-4 puede administrarse para reducir una respuesta inmune de tipo TH2. El antagonista de IL-4 puede decirse que reduce la proliferación de células TH2, suprime una respuesta TH2, desplaza la respuesta inmune hacia una respuesta TH1 o favorece una respuesta de tipo TH1. El uso de antagonistas de otras citoquinas asociadas con una respuesta inmune de tipo TH2 se discute más adelante. Los antagonistas de otra u otras citoquinas de tipo TH2, tales como IL-5, IL-10 o IL-13, pueden administrarse a pacientes que tienen un trastorno que implica niveles elevados de dichas citoquinas. Las técnicas para medir la cantidad de dichas citoquinas en un paciente, por ejemplo, en el suero del paciente, son muy conocidas.

Una realización de la invención puede estar dirigida al anticuerpo de la invención para uso en un método para inhibir el daño inducido por IL-4 en el epitelio, que comprende administrar el anticuerpo a un individuo que tiene, o presenta riesgo de desarrollar, una afección en la que la disrupción de la barrera epitelial mediada por IL-4 juega un papel. Los estudios de la función de la barrera revelaron que IL-4 juega un papel en la reducción de la función de la barrera en modelos de epitelio pulmonar, y que un polipéptido de receptor de IL-4 humano soluble (un antagonista de IL-4) inhibe la reducción mediada por IL-4 de la función de la barrera (véase el ejemplo 7).

Las realizaciones particulares de métodos descritos en la presente memoria comprenden administrar un antagonista de IL-4 para inhibir el daño inducido por IL-4 en el epitelio en el tracto gastrointestinal o el pulmón. Dichos métodos pueden emplearse para prevenir el daño epitelial o para restaurar la función de la barrera epitelial (es decir, para estimular la reparación o cicatrización del epitelio). La capacidad de un antagonista de IL-4 para inhibir el daño inducido por IL-4 en el epitelio puede confirmarse en cualquiera de varios ensayos adecuados, tales como los descritos en el ejemplo 7 más adelante.

Cualquier inflamación asociada con (o posterior a) una infección también puede tratarse con un antagonista de IL-4. El antagonista puede administrarse para inhibir cualquier componente inducido por IL-4 de una respuesta inflamatoria que resulta de infección microbiana en el tracto gastrointestinal, por ejemplo.

Las combinaciones de dos o más antagonistas pueden emplearse en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria. Los ejemplos de antagonistas de IL-4 son como sigue.

Receptor de IL-4

Un antagonista de IL-4 preferido es un receptor de IL-4 (IL-4R). Cuando se administran *in vivo*, los polipéptidos de IL-4R circulan en el cuerpo y se unen a moléculas de IL-4 endógenas circulantes, evitando la interacción de IL-4 con receptores de IL-4 en la superficie celular endógenos, inhibiendo así la transducción de las señales biológicas inducidas por IL-4.

Los receptores de IL-4 se describen en la Patente U.S. 5.599.905; Idzerda et al., *J Exp. Med*. 171: 861-873, marzo 1990 (IL-4R humano); y Mosley et al., *Cell* 59: 335-348, 20 octubre, 1989 (IL-4R murino). La proteína descrita en estas tres referencias se refiere algunas veces en la bibliografía científica como IL-4Rα. A no ser que se especifique otra cosa, los términos "IL-4R" y "receptor de IL-4" tal y como se usan en la presente memoria engloban esta proteína en varias formas que son capaces de funcionar como antagonistas de IL-4, incluyendo pero no limitadas a fragmentos solubles, proteínas de fusión, oligómeros, y variantes que son capaces de unirse a IL-4, como se describe con más detalles más adelante.

La secuencia de nucleótidos de un ADNc de IL-4R humano y la secuencia de aminoácidos codificada por ésta, se muestran en las Figuras 1A-1C. El clon de ADNc se aisló a partir de una biblioteca de ADNc obtenida de un clon de célula T humano $CD4^+/CD8^-$ designado T22, como se describe en Idzerda et al., *J. Exp. Med.*, 171: 861, marzo 1990 y en la Patente U.S. 5.599.905. Las secuencias de ADN y de aminoácidos de las Figuras 1A-1C se presentan en SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, respectivamente.

La proteína IL-4R humana codificada comprende (del extremo N al C terminal) un péptido señal N-terminal, seguido de un dominio extracelular, una región transmembrana y un dominio citoplásmico. La región transmembrana, que está subrayada en la Figura 1A, corresponde a los aminoácidos 208 hasta 231. El dominio citoplásmico comprende los aminoácidos 232 hasta 800.

Un péptido señal incluye los aminoácidos -25 a -1 de SEQ ID NO:2. Un sitio de escisión de péptido señal alternativo ocurre entre los residuos -3 y -2 de SEQ ID NO:2, de manera que el péptido señal corresponde a los residuos -25 hasta -3.

Como se reconoce en el campo pertinente, el sitio de escisión del péptido señal para una proteína dada puede variar según factores tales como el sistema de expresión particular (especialmente las células huésped) en el que la proteína se expresa. Los límites exactos del péptido señal, y así el dominio extracelular, de una proteína recombinante dada pueden depender así del sistema de expresión empleado. Además, el péptido señal puede escindirse en más de una posición, generando más de una especie de polipéptido en una preparación de proteína recombinante.

En un ejemplo, en el que un vector de expresión comprende ADN que codifica los aminoácidos -25 hasta 207 de SEQ ID NO:2, el IL-4R recombinante expresado incluye dos especies de IL-4R humano soluble maduro. Los polipéptidos expresados incluyen una especie principal que corresponde a los aminoácidos -2 a 207 y una especie menor que corresponde a los aminoácidos 1 a 207 de SEQ ID NO:2. Dos formas alternativas del dominio extracelular de IL-4R humano corresponden así a los residuos -2 a 207 y 1 a 207 de SEQ ID NO:2. E término "maduro" se refiere a una proteína en una forma que carece de péptido señal o secuencia líder, como se entiende en la técnica pertinente.

Entre los receptores de IL-4 adecuados para uso como se describe en la presente memoria están fragmentos de IL-4R. Los polipéptidos IL-4R truncados pueden ocurrir naturalmente, por ejemplo, como resultado de escisión proteolítica, procesamiento posterior a la traducción o corte y empalme alternativo del ARNm. Alternativamente, los fragmentos pueden construirse mediante la deleción de partes terminales o internas de una secuencia de IL-4R, por ejemplo, mediante tecnología de ADN recombinante. Los fragmentos que retienen la capacidad de unirse a IL-4 pueden identificarse en ensayos de unión convencionales. Dichos fragmentos pueden ser fragmentos solubles, como se discute más adelante.

En un ejemplo, el antagonista comprende una forma soluble del IL-4R. Un receptor de IL-4 soluble es un polipéptido secretado de la célula en la que se expresa, en lugar de ser retenido en la superficie de la célula. La proteína IL-4R humana de longitud completa de SEQ ID NO:2 es una proteína transmembrana, que, como se ha descrito anteriormente, comprende un péptido señal N-terminal, seguido de un dominio extracelular, una región transmembrana y un dominio citoplásmico C-terminal. Los polipéptidos IL-4R solubles carecen de la región transmembrana que causaría la retención en la célula y los polipéptidos solubles se secretan consecuentemente en el medio de cultivo. La región transmembrana y el dominio intracelular de IL-4R pueden delecionarse o sustituirse por residuos hidrofílicos para facilitar la secreción del receptor en el medio de cultivo celular.

Los ejemplos particulares de polipéptidos IL-4R solubles carecen de la región transmembrana pero comprenden el dominio extracelular (el dominio extracelular completo o un fragmento de éste que es capaz de unir IL-4). Como una opción, el polipéptido comprende todo o parte del dominio citoplásmico, así como el dominio extracelular (o fragmento del dominio extracelular) pero carece de la región transmembrana.

Los ejemplos de polipéptidos IL-4R humanos solubles incluyen, pero no están limitados a, polipéptidos que comprenden los residuos de aminoácidos x a y de SEQ ID NO:2, en el que x representa 1 ó -2 e y representa un número entero de 197 a 207. Los ejemplos incluyen polipéptidos que comprenden los residuos 1 a 207 ó -2 a 207 de SEQ ID NO:2.

Una preparación de proteína administrada como un antagonista de IL-4 puede comprender más de una forma de IL-4R. Por ejemplo, la preparación puede comprender moléculas de polipéptido que consisten en los aminoácidos 1 a 207 de SEQ ID NO:2, así como polipéptidos que consisten en los aminoácidos -2 a 207 de SEQ ID NO:2.

Los polipéptidos IL-4R que surgen de las construcciones alternativas de ARNm, por ejemplo, que pueden atribuirse a diferentes eventos de corte y empalme de ARNm después de la transcripción, y que rinden traducciones de polipéptidos capaces de unir IL-4, están entre los polipéptidos IL-4R descritos en la presente memoria. Dichos ARNm de corte y empalme alternativos pueden dar lugar a polipéptidos solubles.

Los ejemplos adicionales de receptores de IL-4 que pueden emplearse en los métodos descritos en la presente memoria son variantes que tienen secuencias de aminoácidos que son sustancialmente similares a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 del receptor de interleuquina-4 nativo, o fragmentos de éste. Pueden emplearse los polipéptidos de receptor de IL-4 variantes que son capaces de funcionar como antagonistas de IL-4 en los métodos descritos en la presente memoria.

Pueden emplearse cualquiera de las diferentes técnicas de ensayo convencionales para confirmar que una forma dada de IL-4R (por ejemplo, un fragmento o variante de IL-4R) funciona como un antagonista de IL-4. Los ejemplos incluyen ensayos de unión o ensayos que ensayan la capacidad de un polipéptido IL-4R dado para inhibir la transducción de una señal biológica inducida por IL-4. Los ejemplos de ensayos *in vitro* adecuados se describen más adelante.

Los receptores de IL-4 "sustancialmente similares" incluyen aquellos que tienen secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico que varían de una secuencia nativa por una o más sustituciones, deleciones o adiciones, pero que retienen una actividad biológica deseada de la proteína IL-4R. Los ejemplos de moléculas de ácido nucleico que codifican receptores de IL-4 incluyen, pero no están limitadas a: (a) ADN obtenido de la región codificadora de un gen IL-4R de mamífero nativo; (b) ADN que es capaz de hibridar con un ADN de (a) bajo condiciones de astringencia moderadas y que codifica un IL-4R que tiene una actividad biológica de un IL-4R nativo; o (c) ADN que está degenerado como resultado del código genético a un ADN definido en (a) o (b) y que codifica un IL-4R que tiene una actividad biológica de un IL-4R nativo. Debido a la degeneración del código, existe una variación considerable en las secuencias de nucleótidos que codifican la misma secuencia de aminoácidos.

Las variantes pueden ocurrir naturalmente, tal como variantes alélicas o aquellas que surgen del corte y empalme alternativo del ARNm. Alternativamente, las variantes pueden prepararse por técnicas muy conocidas tal como mutagénesis *in vitro*.

Una secuencia variante identificada por Idzerda et al., *supra*, comprende un codón GTC que codifica el aminoácido valina (Val) en la posición 50, en lugar de isoleucina (Ile). La secuencia variante es idéntica por otra parte a la secuencia de SEQ ID NOS:1 y 2. En la presente memoria se proporcionan fragmentos de IL-4R, tal como fragmentos solubles, que comprenden Val en la posición 50.

En ejemplos particulares, una secuencia de ADN o de aminoácidos del receptor de IL-4 es al menos 80 por ciento idéntica a la secuencia de un IL-4R nativo. Preferiblemente, un ADN o polipéptido IL-4R comprende una secuencia que es al menos 90 por ciento idéntica a un ADN o secuencia de aminoácidos de IL-4R nativo. Un ejemplo es un IL-4R humano que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 por ciento idéntica a la secuencia presentada en SEQ ID NO:2. Otro ejemplo es un IL-4R soluble que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80 por ciento idéntica a la secuencia del dominio extracelular de IL-4R humano. Los ejemplos adicionales son polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos que son al menos 90 por ciento idénticas a la secuencia presentada en SEQ ID NO:2 o un fragmento de éstos. En un ejemplo particular, el polipéptido comprende no más de 10 sustituciones de aminoácidos. Los polipéptidos IL-4R que retienen la capacidad de unir IL-4 pueden identificarse en ensayos de unión convencionales.

El porcentaje de similitud o porcentaje de identidad puede determinarse, por ejemplo, comparando la información de la secuencia de ADN o aminoácidos usando el programa informático GAP, versión 6.0, disponible en la Universidad de Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG). El programa GAP utiliza el método de alineamiento de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol*. 48: 443, 1970), revisado por Smith y Waterman (*Adv. Appl. Math*. 2: 482, 1981). Brevemente, el programa GAP define la similitud como el número de símbolos alineados (es decir, nucleótidos o aminoácidos) que son similares, dividido por el número total de símbolos en la más corta de las dos secuencias. Los parámetros por defecto preferidos para el programa GAP incluyen: (1) una matriz de comparación unaria (que contiene un valor de 1 para identidades y 0 para no identidades) para nucleótidos y la matriz de comparación ponderada de Gribskov y Burgess, *Nucl. Acids Res*. 14: 6745, 1986, como se describe por Schwartz y Dayhoff, ed., *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, p. 353-358, 1979; (2) una

penalización de 3.0 para cada hueco y una penalización de 0.10 para cada símbolo en cada hueco; y (3) sin penalización para huecos finales.

Los polipéptidos IL-4R que varían respecto a las proteínas nativas pero que poseen una propiedad deseada pueden construirse, por ejemplo, sustituyendo o delecionando residuos no necesarios para la actividad biológica particular. Las sustituciones pueden ser sustituciones conservativas, de manera que se retiene una propiedad biológica deseada de la proteína. Los aminoácidos pueden reemplazarse con residuos que tienen características fisicoquímicas similares.

Los residuos de cisteína pueden delecionarse o reemplazarse con otros aminoácidos para evitar la formación de puentes disulfuro intramoleculares incorrectos después de la renaturalización. Otras alteraciones de una secuencia nativa implican la modificación de residuos de aminoácidos dibásicos adyacentes, para incrementar la expresión en células huésped de levadura en las que está presente la actividad proteasa KEX2.

También se describe IL-4R con o sin patrón de glicosilación nativo asociado. El patrón de glicosilación puede variar según el tipo de células huésped en las que se produce la proteína. Otra opción es la inactivación de los sitios de N-glicosilación por mutagénesis específica de sitio. Los sitios de N-glicosilación en las proteínas eucariotas se caracterizan por el triplete de aminoácidos Asn-A_1-Z, en el que A_1 es cualquier aminoácido excepto Pro y Z es Ser o Thr. En esta secuencia, la asparagina proporciona un grupo amino como cadena lateral para la unión covalente de carbohidrato. Dicho sitio puede eliminarse mediante la sustitución de otro aminoácidos por Asn o por el residuo Z, mediante la deleción de Asn o Z, o mediante la inserción de un aminoácido distinto de Z entre A_1 y Z o un aminoácido distinto de Asn entre Asn y A_1.

Los procedimientos de mutagénesis específica de sitio dirigida por oligonucleótido pueden emplearse para proporcionar un gen alterado que tiene codones particulares alterados según la sustitución, deleción o inserción requerida. Los ejemplos de técnicas para hacer dichas alteraciones se describen en Walder et al. (*Gene 42*: 133. 1986); Bauer et al. (*Gene 37*: 73, 1985); Craik (*BioTechniques*, enero 1985, 12-19); Smith et al. (*Genetic Engineering: Principles and Methods*, Plenum Press, 1981); y Patentes U.S. Nos. 4.518.584 y 4.737.462.

Los receptores de IL-4 que pueden emplearse también incluyen derivados, por ejemplo, varias formas estructurales de la proteína primaria que retienen una actividad biológica deseada. Debido a la presencia de grupos amino y carboxilo ionizables, por ejemplo, una proteína IL-4R puede estar en la forma de sales ácidas o básicas, o en forma neutra. Los residuos de aminoácidos individuales también pueden modificarse por oxidación o reducción. La estructura de aminoácidos primaria puede modificarse mediante la formación de conjugados covalentes o agregados con otros restos químicos, tales como grupos glicosilo, lípidos, fosfato, grupos acetilo y semejantes, o mediante la creación de mutantes de la secuencia de aminoácidos. Se contemplan los derivados PEGilados (modificados con polietilen glicol). Los derivados covalentes pueden prepararse uniendo grupos funcionales particulares a las cadenas laterales de los aminoácidos de IL-4R o en el extremo N o C-terminal. Los derivados de IL-4R también pueden obtenerse por agentes de entrecruzamiento, tales como éster de succinimida M-maleidobenzoilo y N-hidroxisuccinimida, en los residuos de cisteína y lisina. Las proteínas IL-4R también pueden unirse covalentemente a través de grupos laterales reactivos a varios sustratos insolubles, tales como estructuras de agarosa activadas con bromuro de cianógeno, activadas con bisoxirano, activadas con carbonildiimidazol o activadas con tosilo o adsorbiendo a superficies de poliolefina (con o sin entrecruzamiento con glutaraldehído).

Otros derivados de IL-4R descritos en la presente memoria incluyen conjugados covalentes o agregados de IL-4R o sus fragmentos con otras proteínas o polipéptidos, tales como por expresión de proteínas de fusión recombinantes que comprenden polipéptidos heterólogos fusionados con el extremo N-terminal o C-terminal de un polipéptido IL-4R. Por ejemplo, el péptido conjugado puede ser una polipéptido señal heterólogo (o líder), por ejemplo, el líder factor α de levaduras o un péptido tal como una etiqueta de epítopo. Las proteínas de fusión que contienen IL-4R pueden comprender péptidos añadidos para facilitar la purificación o identificación de IL-4R (por ejemplo, poli-His). Los ejemplos específicos de construcciones de fusión poli-His que es biológicamente activa son IL-4R humano soluble (por ejemplo, que comprende los residuos -2 a 207 ó 1-207 de SEQ ID NO:2) His His y IL-4R humano soluble His His His His His His. Una secuencia de aminoácidos del receptor de IL-4 también puede unirse al péptido Flag® Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (DYKDDDDK) (SEQ ID NO:3) como se describe en Hopp et al. *Bio/Technology* 6: 1204, 1988 y en la Patente U.S. 5.011.912. El péptido Flag® es altamente antigénico y proporciona un epítopo unido de manera reversible por un anticuerpo monoclonal específico, permitiendo un ensayo rápido y una purificación fácil de la proteína recombinante expresada. Los reactivos útiles para preparar proteínas de fusión en las que el péptido Flag® está fusionado con un polipéptido dado están disponibles comercialmente (Sigma, St. Louis, MO).

Los oligómeros que contienen polipéptidos IL-4R pueden emplearse como antagonistas de IL-4. Los oligómeros pueden estar en la forma de dímeros, trímeros u oligómeros superiores unidos covalentemente o unidos no covalentemente. Se contemplan para uso los oligómeros que comprenden dos o más polipéptidos IL-4R, siendo un ejemplo un homodímero. Otros oligómeros incluyen heterodímeros, heterotrímeros y semejantes, que comprenden un polipéptido IL-4R así como al menos un polipéptido que no se obtiene del IL-4R de SEQ ID NO:2.

Un ejemplo está dirigido a oligómeros que comprenden múltiples polipéptidos IL-4R unidos mediante interacciones covalentes o no covalentes entre restos de péptido fusionados con los polipéptidos IL-4R. Dichos péptidos pueden ser conectores peptídicos (espaciadores) o péptidos que tienen la propiedad de estimular la oligomerización. Las cremalleras de leucina y determinados polipéptidos obtenidos de anticuerpos están entre los péptidos que pueden estimular la oligomerización de polipéptidos IL-4R unidos a ellos, como se describe con más detalle más adelante.

En ejemplos particulares, los oligómeros comprenden de dos a cuatro polipéptidos IL-4R. Los restos IL-4R del oligómero pueden estar en cualquiera de las formas descritas anteriormente, por ejemplo, variantes o fragmentos. Preferiblemente, los oligómeros comprenden polipéptidos IL-4R solubles.

Como una alternativa, un oligómero se prepara usando polipéptidos obtenidos de inmunoglobulinas. La preparación de proteínas de fusión que comprenden determinados polipéptidos heterólogos fusionados a varias partes de polipéptidos obtenidos de anticuerpo (incluyendo el dominio Fc) se ha descrito, por ejemplo, por Ashkenazi et al. (*PNAS USA* 88: 10535, 1991); Byrn et al. (*Nature* 344: 677, 1990); y Hollenbaugh y Aruffo ("Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", en *Current Protocols in Immunology*, Supl. 4, páginas 10.19.1-10.19.11, 1992).

Un ejemplo está dirigido a un dímero que comprende dos proteínas de fusión creado fusionando IL-4R a la región Fc de un anticuerpo. Una fusión génica que codifica la proteína de fusión IL-4R/Fc se inserta en un vector de expresión apropiado. Las proteínas de fusión IL-4R/Fc se expresan en células huésped transformadas con el vector de expresión recombinante y se permite que se ensamble de forma parecida a las moléculas de anticuerpo, en las que se forman pueden disulfuro intercadena entre los restos Fc para rendir IL-4R divalente.

El término "polipéptido Fc" tal y como se usa en la presente memoria, incluye formas nativas y muteínas de polipéptidos obtenidos de la región Fc de un anticuerpo. También se incluyen las formas truncadas de dichos polipéptidos que contienen la región bisagra que estimula la dimerización. Las proteínas de fusión que comprenden restos Fc (y los oligómeros formados de ellas) ofrecen la ventaja de una purificación fácil por cromatografía de afinidad en columnas de Proteína A o Proteína G.

Un polipéptido Fc adecuado, descrito en la solicitud PCT WO 93/10151, es un polipéptido de cadena única que se extiende desde la región bisagra N-terminal hasta el extremo C-terminal nativo de la región Fc de un anticuerpo IgG1 humano. Otro polipéptido Fc útil es la muteína Fc descrita en la Patente U.S. 5.457.035 y en Baum et al., (*EMBO J.* 13: 3992-4001, 1994). La secuencia de aminoácidos de esta muteína es idéntica a la de la secuencia de Fc nativa presentada en WO 93/10151, excepto en que el aminoácido 19 se ha cambiado de Leu a Ala, el aminoácido 20 se ha cambiado de Leu a Glu y el aminoácido 22 se ha cambiado de Gly a Ala. La muteína presenta una afinidad reducida por los receptores de Fc.

En otros ejemplos, IL-4R puede sustituirse por la parte variable de una cadena pesada o ligera de un anticuerpo. Si se preparan proteínas de fusión tanto con las cadenas pesadas como ligeras de un anticuerpo, es posible formar un oligómero con tantas como cuatro regiones extracelulares de IL-4R.

Las proteínas de fusión recombinantes solubles que comprenden un IL-4R y varias partes de la región constante de una inmunoglobulina se describen en EP 464.533, junto con procedimientos para preparar dichas proteínas de fusión y dímeros de éstas. Entre las proteínas de fusión descritas en EP 464.533 están aquellas que comprenden la parte extracelular de IL-4R humano y un polipéptido Fc.

Alternativamente, el oligómero es una proteína de fusión que comprende múltiples polipéptidos IL-4R, con o sin conectores peptídicos (péptidos espaciadores). Entre los conectores peptídicos adecuados están aquellos descritos en las Patentes U.S. 4.751.180 y 4.935.233.

Otro método para preparar IL-4R oligomérico implica el uso de una cremallera de leucina. Los dominios de cremallera de leucina son péptidos que estimulan la oligomerización de las proteínas en las que se encuentran. Las cremalleras de leucina se identificaron originariamente en varias proteínas de unión a ADN (Landschulz et al., *Science 240*: 1759, 1988) y desde entonces se han encontrado en varias proteínas diferentes. Entre las cremalleras de leucina conocidas están péptidos naturales y derivados de éstos que dimerizan o trimerizan. Los ejemplos de dominios de cremallera de leucina adecuados para producir proteínas oligoméricas solubles se describen en la solicitud PCT WO 94/10308 y la cremallera de leucina obtenida de la proteína tensioactiva pulmonar D (SPD) se describe en Hoppe et al. (*FEBS Letters*, 344: 191, 1994). El uso de una cremallera de leucina modificada que permite la trimerización estable de una proteína heteróloga fusionada a ella se describe en Fanslow et al. (*Semin. Immunol. 6*: 267-278, 1994). En una estrategia, las proteínas de fusión recombinantes que comprenden un polipéptido IL-4R soluble fusionado con un péptido de cremallera de leucina se expresan en células huésped adecuadas y el IL-4R oligomérico soluble que se forma se recupera del sobrenadante del cultivo.

Un ejemplo de un heterodímero comprende un polipéptido IL-4R obtenido de IL-4R humano de SEQ ID NO:2 y un polipéptido IL-2Rγ. IL-2Rγ (también conocido como IL-2Rγ_c) se describe en la Patente U.S. 5.510.259 y en Takeshita et al. (*Science 257*: 379, 17 de julio 1992). Los polipéptidos pueden estar en una de las diferentes formas descritas en la presente memoria, por ejemplo fragmentos solubles, variantes y semejantes, obtenidas de las proteínas indicadas. Una realización de dicho heterodímero comprende una proteína de fusión IL-4R/Fc soluble y una proteína de fusión IL-2Rγ/Fc soluble. Dichos heterodímeros se describen en WO 96/11213, junto con homodímeros IL-4R.

Otros ejemplos de heterodímeros comprenden una subunidad de IL-4R (preferiblemente un fragmento soluble de la proteína de SEQ ID NO:2) y al menos una subunidad del receptor de IL-13. El receptor de IL-13 (IL-13R) forma un complejo y los polipéptidos IL-13R (tales como los polipéptidos designados IL-13Rα1 e IL-13Rα2) se describen en Zurawski et al., *J. Biol. Chem*. 270 (23), 13869, 1995; de Vries, *J. Allergy Clin. Immunol*. 102(2): 165, agosto 1998; Callard et al. *Immunology Today*, 17(3): 108, marzo 1996 y Patente U.S. 5.710.023. En un ejemplo, un heterodímero comprende un IL-4R humano soluble y un IL-13R soluble (preferiblemente una forma soluble del polipéptido descrito en la Patente U.S. 5.710.023 o IL-13Rα1). Los componentes de los heterodímeros pueden ser cualquier forma adecuada de los polipéptidos que retiene la actividad deseada, tal como fragmentos, variantes o proteínas de fusión (por ejemplo, fusiones de los polipéptidos de receptor solubles con polipéptidos Fc, péptidos de cremallera de leucina, conectores peptídicos o etiquetas de epítopo).

Los polipéptidos del receptor de IL-4 y las proteínas de fusión descritas en la presente memoria pueden prepararse por cualquiera de varias técnicas convencionales. Los polipéptidos IL-4R pueden purificarse de las células que expresan naturalmente el receptor (tal como las células discutidas en Park et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84*: 1669-673, 1987) o pueden producirse en sistemas de expresión recombinantes, usando técnicas muy conocidas. Los sistemas de expresión para usarse en la producción de IL-4R incluyen los descritos en la Patente U.S. 5.599.905.

Se conocen varios sistemas de expresión para usarse en la producción de proteínas recombinantes. En general, las células huésped se transforman con un vector de expresión recombinante que comprende ADN que codifica un polipéptido IL-4R deseado. Entre las células huésped que pueden emplearse están células procariotas, de levadura o eucariotas superiores. Los procariotas incluyen organismos gram negativos o gram positivos, por ejemplo *E. coli* o bacilos. Las células eucariotas superiores incluyen células de insecto y líneas celulares establecidas de origen mamífero. Los ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero adecuadas incluyen la línea COS-7 de células de riñón de mono (ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., *Cell 23*:175, 1981), células L, células 293, células C127, células 3T3 (ATCC CCL 163), células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, líneas celulares BHK (ATCC CRL 10) y la línea celular CVI/EBNA obtenida de la línea celular de riñón de mono verde africano CVI (ATCC CCL 70) como describen McMahan et al. (*EMBO J. 10*: 2821, 1991). Los vectores de clonación y expresión apropiados para usarse con huéspedes celulares bacterianos, fúngicos, de levadura y de mamífero se describen por Pouwels et al. (*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, Nueva York, 1985).

Las células transformadas se cultivan bajo condiciones que estimulan la expresión de IL-4R y el polipéptido se recupera por procedimientos de purificación de proteínas convencionales. Uno de dichos procedimientos de purificación incluye el uso de cromatografía de afinidad, por ejemplo, en una matriz que tiene IL-4 unida a ella. El IL-4R expresado se depositará en la membrana celular o se secretará en el sobrenadante del cultivo, dependiendo del ADN de IL-4R seleccionado. Los polipéptidos que se contemplan para usarse en la presente memoria incluyen polipéptidos IL-4R de mamífero recombinantes sustancialmente homogéneos sustancialmente sin materiales endógenos contaminantes.

Anticuerpos

Los anticuerpos que funcionan como antagonistas de IL-4 pueden emplearse para uso en los métodos de la presente invención. Los anticuerpos son anticuerpos monoclonales. Los más preferidos son anticuerpos monoclonales humanos preparados usando ratones transgénicos, como se describe más adelante. Los anticuerpos humanos también pueden prepararse usando técnicas de exposición en fago.

Los ejemplos de anticuerpos adecuados son aquellos que interfieren con la unión de IL-4 a un receptor de IL-4. Dichos anticuerpos, referidos en la presente memoria como anticuerpos bloqueantes, pueden producirse frente a IL-4R y cribarse en ensayos convencionales para la capacidad de interferir con la unión de IL-4 a los receptores de IL-4. Los ejemplos de ensayos adecuados son ensayos que ensayan los anticuerpos para la capacidad de inhibir la unión de IL-4 a células que expresan IL-4R o que ensayan los anticuerpos para la capacidad de reducir una respuesta biológica o celular que resulta de la unión de IL-4 a los receptores de IL-4 de la superficie celular.

Se ha indicado que IL-4Rα es un componente de determinados complejos del receptor de IL-13 con múltiples subunidades (Zurawski et al., *J. Biol. Chem. 270* (23), 13869, 1995; de Vries, *J. Allergy Clin Immunol. 102*(2): 165, agosto 1998; y Callard et al. *Immunol Today, 17*(3): 108, marzo 1996). Así, algunos anticuerpos producidos frente a IL-4Rα pueden interferir con la unión de IL-13 a dichos complejos de receptor.

En una realización, los anticuerpos dirigidos frente a IL-4R bloquean la unión de IL-4 y también IL-13 a células. Los anticuerpos inhiben la actividad biológica inducida por IL-4 y también inhiben la actividad inducida por IL-13 y así pueden emplearse para tratar afecciones inducidas por una o las dos citoquinas. Los ejemplos de dichas afecciones incluyen pero no están limitadas a, afecciones mediadas por IgE, asma, afecciones alérgicas, rinitis alérgica, y dermatitis incluyendo dermatitis atópica.

Los anticuerpos que se unen a IL-4R e inhiben la unión de IL-4 pueden cribarse en varios ensayos convencionales para identificar aquellos anticuerpos que también interfieren con la unión de IL-13 a dichos complejos de receptor. Los anticuerpos pueden cribarse en ensayos de unión o ensayarse para la capacidad de inhibir una actividad

biológica inducida por IL-4 e inducida por IL-13. Un ejemplo de un ensayo adecuado se ilustra en el Ejemplo 5 más adelante.

Los anticuerpos específicos para IL-4 o IL-4R pueden prepararse por procedimientos muy conocidos. Véase, por ejemplo, *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Kennet et al. (eds.), Plenum Press, Nueva York (1980); y *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow y Land (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988).

Los fragmentos de unión a antígeno de dichos anticuerpos pueden producirse por técnicas convencionales. Los ejemplos de dichos fragmentos incluyen, pero no están limitados a, fragmentos Fab, $F(ab')_2$ y Fv. También se contempla el uso de fragmentos de anticuerpo y derivados producidos por técnicas de ingeniería genética. A no ser que se especifique otra cosa, los términos "anticuerpo" y "anticuerpo monoclonal" tal y como se usan en la presente memoria engloban tanto anticuerpos completos como fragmentos de unión a antígeno de éstos.

Las realizaciones adicionales incluyen anticuerpos quiméricos, por ejemplo, versiones humanizadas de anticuerpos monoclonales murinos. Dichos anticuerpos humanizados pueden prepararse por técnicas conocidas, y ofrecen la ventaja de una inmunogenicidad reducida cuando los anticuerpos se administran a seres humanos. En una realización, un anticuerpo monoclonal humanizado comprende la región variable de un anticuerpo murino (o sólo el sitio de unión a antígeno de éste) y una región constante obtenida de un anticuerpo humano. Alternativamente, un fragmento de anticuerpo humanizado puede comprender el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal murino y un fragmento de región variable (que carece del sitio de unión a antígeno) obtenido de un anticuerpo humano. Los procedimientos para la producción de anticuerpos monoclonales quiméricos y obtenidos por ingeniería incluyen los descritos en Riechmann et al. (*Nature 332*: 323, 1988), Liu et al. (*PNAS 84*: 3439, 1987), Larrick et al. (*Bio/Technology 7*: 934, 1989) y Winter y Harris (*TIPS 14*: 139, mayo, 1993).

Un método para producir un anticuerpo comprende inmunizar un animal no humano, tal como un ratón transgénico, con un polipéptido IL-4R, mediante lo cual los anticuerpos dirigidos frente al polipéptido IL-4R se generan en dicho animal. Se han desarrollado procedimientos para generar anticuerpos humanos en animales no humanos. Los anticuerpos pueden ser parcialmente humanos o preferiblemente completamente humanos. Por ejemplo, pueden emplearse ratones transgénicos en los que se ha introducido material genético que codifica una o más cadenas de inmunoglobulina humanas. Dichos ratones pueden alterarse genéticamente de diferentes formas. La manipulación genética puede resultar en cadenas de polipéptido de inmunoglobulina humanas que reemplazan las cadenas de inmunoglobulina endógenas en al menos algunos anticuerpos (preferiblemente virtualmente en todos) producidos por el animal después de la inmunización.

Se han preparado ratones en los que se han inactivado uno o más genes de inmunoglobulina endógenos por diferentes medios. Los genes de inmunoglobulina humana se han introducido en los ratones para reemplazar los genes de ratón inactivados. Los anticuerpos producidos en los animales incorporan cadenas de polipéptido de inmunoglobulina humana codificadas por el material genético humano introducido en el animal.

Los ejemplos de técnicas para la producción y uso de dichos animales transgénicos se describen en las Patentes U.S. 5.814.318, 5.569.825 y 5.545.806. Los Ejemplos 2-4 más adelante proporcionan una descripción adicional de la preparación de ratones transgénicos útiles para generar anticuerpos humanos dirigidos frente a un antígeno de interés.

En la presente memoria se proporcionan anticuerpos producidos mediante la inmunización de animales transgénicos no humanos con un polipéptido IL-4R. Los ratones transgénicos en los que se ha introducido material genético que codifica una o unas cadenas de polipéptido de inmunoglobulina humana están entre los animales transgénicos adecuados. Los ejemplos de dichos ratones incluyen, pero no están limitados a, aquellos que contienen las alteraciones genéticas descritas en los ejemplos más adelante. Un ejemplo de un inmunógeno adecuado es un IL-4R humano soluble, tal como un polipéptido que comprende el dominio extracelular de la proteína de SEQ ID NO:2 u otro fragmento inmunogénico de la proteína de SEQ ID NO:2.

Los anticuerpos monoclonales pueden producirse por procedimientos convencionales, por ejemplo, mediante células de bazo inmortalizadas recogidas del animal transgénico después de la finalización del programa de inmunización. Las células del bazo pueden fusionarse con células de mieloma para producir hibridomas, por procedimientos convencionales.

Un método para producir una línea celular de hibridoma comprende inmunizar dicho animal transgénico con un inmunógeno IL-4R; recoger las células del bazo del animal inmunizado; fusionar las células del bazo recogidas con una línea celular de mieloma, generando de esta manera células de hibridoma; e identificar una línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une a un polipéptido IL-4R. Dichas líneas celulares de hibridoma, y los anticuerpos monoclonales anti-IL-4R producidos por ellas, están englobados en la presente invención. Los anticuerpos monoclonales secretados por la línea celular de hibridoma se purifican por técnicas convencionales. Los hibridomas o MAb pueden cribarse adicionalmente para identificar MAb con propiedades particulares, tales como la capacidad de bloquear una actividad inducida por IL-4, y para bloquear una actividad inducida por IL-13 (véase el ensayo en el ejemplo 5).

La presente invención proporciona anticuerpos humanos que se unen a IL-4R. En una realización de la invención, los anticuerpos humanos producidos frente a IL-4R y producidos por técnicas que implican el uso de ratones transgénicos, bloquean la unión de IL-4 y también de IL-13 a las células. Dichos anticuerpos son antagonistas de IL-4 y funcionan adicionalmente como antagonistas de IL-13.

Entre los usos de los anticuerpos dirigidos frente a un IL-4R está el uso en ensayos para detectar la presencia de polipéptidos IL-4R, bien *in vitro* o *in vivo*. Los anticuerpos también pueden emplearse para purificar proteínas IL-4R por cromatografía de inmunoafinidad. Aquellos anticuerpos que peden además bloquear la unión de IL-4 a IL-4R pueden usarse para inhibir una actividad biológica que resulta de dicha unión. Los anticuerpos bloqueantes encuentran uso en los métodos de la presente invención. Dichos anticuerpos que funcionan como antagonistas de IL-4 pueden emplearse para tratar cualquier afección inducida por IL-4, incluyendo pero no limitadas a asma y alergias, por ejemplo, rinitis alérgica, dermatitis de contacto y dermatitis atópica. En una realización, un anticuerpo monoclonal anti-IL-4R humano generado por procedimientos que implican la inmunización de ratones transgénicos se emplea para tratar dichas afecciones.

Los anticuerpos pueden emplearse en un procedimiento *in vitro*, o administrarse *in vivo* para inhibir una actividad biológica inducida por IL-4. Los trastornos causados o exacerbados (directamente o indirectamente) por la interacción de IL-4 con receptores de IL-4 de la superficie celular pueden por lo tanto tratarse. Un método terapéutico implica la administración *in vivo* de un anticuerpo bloqueante a un mamífero en una cantidad eficaz para reducir una actividad biológica inducida por IL-4.

Los anticuerpos de la invención incluyen, pero no están limitados a, anticuerpos monoclonales completamente humanos que inhiben una actividad biológica de IL-4 y también inhiben una actividad biológica de IL-13. Una realización está dirigida a un anticuerpo monoclonal humano que bloquea al menos parcialmente la unión de IL-4 a una célula, y que bloquea al menos parcialmente la unión de IL-13 a una célula.

Los anticuerpos de la presente invención incluyen pero no están limitados a anticuerpos generados mediante la inmunización de un ratón transgénico con un inmunógeno que es un receptor de IL-4, en el que el ratón transgénico se selecciona de las cepas de ratones descritas en el ejemplo 3 más adelante. Los anticuerpos deseados son humanos. En una realización, el inmunógeno es un polipéptido de receptor de IL-4 humano. Las líneas celulares de hibridoma obtenidas del los ratones así inmunizados, en las que el hibridoma secreta un anticuerpo monoclonal que se une a IL-4R, también se proporcionan en la presente memoria. Los ejemplos de anticuerpos producidos mediante la inmunización de dichos ratones transgénicos son los anticuerpos monoclonales humanos designados 6-2 (descrito en el ejemplo 6), 12B5 (descrito en el ejemplo 8); y Mab 63, 1B7, 5A1 y 27A1 (todos descritos en el ejemplo 9). Los anticuerpos monoclonales 6-2, 12B5, 63, 1B7, 5A1 y 27A1 son anticuerpos completamente humanos y son capaces de inhibir la actividad de IL-4 y de IL-13. Los Mab 12B5, 63 y 1B7 son antagonistas preferidos de IL-4 humana y IL-13 humana.

Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo dado pueden identificarse usando el sistema descrito por Kabat et al. en *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, Publicación NIH no. 91-3242, 1991). Los ejemplos particulares de anticuerpos comprenden, en la región variable de su cadena ligera, al menos una de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), o regiones hipervariables, encontradas en la cadena ligera de 6-2. Las CDR de 6-2 se discuten en el ejemplo 6. Así, entre los anticuerpos proporcionados en la presente memoria, están aquellos que comprenden de una a las tres de las secuencias siguientes en la región variable de la cadena ligera: residuos de aminoácidos 24-35 de SEQ D NO:6; residuos 51-57 de SEQ ID NO:6; y residuos 90-97 de SEQ ID NO:6. Los anticuerpos particulares proporcionados en la presente memoria comprenden, en la región variable de su cadena pesada, al menos una de las CDR encontradas en la cadena pesada de 6-2. Así entre los anticuerpos proporcionados en la presente memoria, están aquellos que comprenden de una a las tres de las secuencias siguientes en la región variable de la cadena pesada: residuos 31-35; residuos 50-66; y residuos 99-107 de SEQ ID NO:8.

Los anticuerpos monoclonales particulares de la invención pueden seleccionarse del grupo que consiste en un Mab que reacciona de manera cruzada con 12B5; un Mab que se une al mismo epítopo que 12B5; un Mab que compite con 12B5 para la unión a una célula que expresa IL-4R humano; y un Mab que posee una actividad biológica de 12B5. El anticuerpo puede tener una afinidad de unión para IL-4R humano que es sustancialmente equivalente a la afinidad de unión de 12B5 para IL-4R humano. Mab 12B5 es un anticuerpo IgG1. Los Mab de otros isotipos, obtenidos de 12B5, también están englobados por la presente invención. En realizaciones particulares, el isotipo del MAb es IgG1, IgG4 o IgM. La presente invención también proporciona líneas celulares de hibridoma que producen cualquiera de dichos anticuerpos monoclonales.

Un ejemplo de una actividad biológica de 12B5 es la capacidad de funcionar como un antagonista de IL-4 y como un antagonista de IL-13. En un ejemplo, un MAb de la invención posee actividad bloqueante de IL-4 sustancialmente equivalente a la de 12B5; y posee una actividad bloqueante de IL-13 sustancialmente equivalente a la de 12B5. Dicha actividad puede medirse en cualquier ensayo convencional adecuado (por ejemplo, como se mide en el ensayo de expresión de CD23 descrito en el ejemplo 5).

En la presente memoria se proporcionan anticuerpos monoclonales IgG4 obtenidos de 12B5. Otro ejemplo está dirigido a anticuerpos monoclonales IgM obtenidos de 12B5. Los procedimientos para cambiar (alterar) la subclase o isotipo de un anticuerpo se conocen en el campo pertinente. Dichos procedimientos pueden implicar, por ejemplo, tecnología de ADN recombinante, mediante la cual el ADN que codifica las cadenas de polipéptido del anticuerpo que confieren la subclase deseada se sustituye por ADN que codifica la cadena de polipéptido correspondiente del anticuerpo parental.

La secuencia de ADN de la región variable de la cadena ligera de MAb 12B5 se presenta en SEQ ID NO:9 y la secuencia de aminoácidos codificada se presenta en SEQ ID NO:10. La secuencia de ADN para la región variable de la cadena pesada de MAb 12B5 se presenta en SEQ ID NO:11 y la secuencia de aminoácidos codificada se presenta en SEQ ID NO:12. Los anticuerpos de la presente invención pueden incluir anticuerpos monoclonales que comprenden, en su cadena ligera, los residuos 1 a 109 de SEQ NO:10; y anticuerpos que comprenden adicionalmente o alternativamente, en su cadena pesada, los residuos 1 a 115 de SEQ ID NO:12.

Los ejemplos particulares de anticuerpos de la presente invención pueden comprender, en la región variable de su cadena ligera, al menos una de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), o regiones hipervariables, encontradas en la cadena ligera de 12B5. Las CDR de 12B5 se discuten en el ejemplo 8. Así, entre los anticuerpos descritos en la presente memoria, están aquellos que comprenden de una a las tres secuencias siguientes en la región variable de la cadena ligera: residuos de aminoácidos 24-35 de SEQ D NO:10; residuos 51-57 de SEQ ID NO:10; y residuos 90-99 de SEQ ID NO:10. Los anticuerpos particulares descritos en la presente memoria comprenden, en la región variable de su cadena pesada, al menos una de las CDR encontradas en la cadena pesada de 12B5. Así entre los anticuerpos descritos en la presente memoria, están aquellos que comprenden de una a las tres secuencias siguientes en la región variable de la cadena pesada: residuos 31-35; residuos 50-65; y residuos 98-104 de SEQ ID NO:12.

Los anticuerpos monoclonales particulares de la invención pueden seleccionarse del grupo que consiste en Mab 27A1; un Mab que reacciona de manera cruzada con 27A1; un Mab que se une al mismo epítopo que 27A1; un Mab que compite con 27A1 para la unión a una célula que expresa IL-4R humano; y un Mab que posee una actividad biológica de 27A1. El anticuerpo puede tener una afinidad de unión para IL-4R humano que es sustancialmente equivalente a la afinidad de unión de 27A1 para IL-4R humano. 27A1 es un anticuerpo IgG1. Los Mab de otros isotipos, obtenidos de 27A1, también están englobados por la presente invención. La presente invención también proporciona líneas celulares de hibridoma que producen cualquiera de dichos anticuerpos monoclonales.

Un ejemplo de una actividad biológica de 27A1 es la capacidad de funcionar como un antagonista de IL-4 y como un antagonista de IL-13. En un ejemplo, un MAb de la invención posee actividad bloqueante de IL-4 sustancialmente equivalente a la de 27A1; y posee una actividad bloqueante de IL-13 sustancialmente equivalente a la de 27A1. Dicha actividad puede medirse en cualquier ensayo convencional adecuado (por ejemplo, como se mide en el ensayo de expresión de CD23 descrito en el ejemplo 5).

La secuencia de ADN de la región variable de la cadena ligera de de MAb 27A1 se presenta en SEQ ID NO:13 y la secuencia de aminoácidos codificada se presenta en SEQ ID NO:14. La secuencia de ADN para la región variable de la cadena pesada de MAb 27A1 se presenta como SEQ ID NO:15 y la secuencia de aminoácidos codificada se presenta en SEQ ID NO:16. Los anticuerpos de la presente invención pueden incluir anticuerpos monoclonales que comprenden, en su cadena ligera, los residuos 1 a 109 de SEQ NO:14; y anticuerpos que comprenden adicionalmente o alternativamente, en su cadena pesada, los residuos 1 a 116 de SEQ ID NO:16.

Los ejemplos particulares de anticuerpos de la presente invención pueden comprender, en la región variable de su cadena ligera, al menos una de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), o regiones hipervariables, encontradas en la cadena ligera de 27A1. Las CDR de 27A1 se discuten en el ejemplo 9. Así, entre los anticuerpos descritos en la presente memoria, están aquellos que comprenden de una a las tres secuencias siguientes en la región variable de la cadena ligera: residuos de aminoácidos 24-35 de SEQ D NO:14; residuos 51-57 de SEQ ID NO:14; y residuos 90-99 de SEQ ID NO:14. Los anticuerpos particulares descritos en la presente memoria comprenden, en la región variable de su cadena pesada, al menos una de las CDR encontradas en la cadena pesada de 27A1. Así entre los anticuerpos descritos en la presente memoria, están aquellos que comprenden de una a las tres secuencias siguientes en la región variable de la cadena pesada: residuos 31-35; residuos 50-66; y residuos 99-105 de SEQ ID NO:16.

Los anticuerpos monoclonales particulares de la invención pueden seleccionarse del grupo que consiste en Mab 5A1; un Mab que reacciona de manera cruzada con 5A1; un Mab que se une al mismo epítopo que 5A1; un Mab que compite con 5A1 para la unión a una célula que expresa IL-4R humano; y un Mab que posee una actividad biológica de 5A1. El anticuerpo puede tener una afinidad de unión para IL-4R humano que es sustancialmente equivalente a la afinidad de unión de 5A1 para IL-4R humano. 5A1 es un anticuerpo IgG1. Los Mab de otros isotipos, obtenidos de 5A1, también están englobados por la presente invención. La presente invención también proporciona líneas celulares de hibridoma que producen cualquiera de dichos anticuerpos monoclonales.

Un ejemplo de una actividad biológica de 5A1 es la capacidad de funcionar como un antagonista de IL-4 y como un antagonista de IL-13. En un ejemplo, un MAb de la invención posee actividad bloqueante de IL-4 sustancialmente

equivalente a la de 5A1; y posee una actividad bloqueante de IL-13 sustancialmente equivalente a la de 5A1. Dicha actividad puede medirse en cualquier ensayo convencional adecuado (por ejemplo, como se mide en el ensayo de expresión de CD23 descrito en el ejemplo 5).

La secuencia de ADN de la región variable de la cadena ligera de de MAb 5A1 se presenta en SEQ ID NO:17 y la secuencia de aminoácidos codificada se presenta en SEQ ID NO:18. La secuencia de ADN para la región variable de la cadena pesada de MAb 5A1 se presenta como SEQ ID NO:19 y la secuencia de aminoácidos codificada se presenta en SEQ ID NO:20. Los anticuerpos de la presente invención incluyen, pero no están limitados a, anticuerpos monoclonales que comprenden, en su cadena ligera, los residuos 1 a 107 de SEQ NO:18; y anticuerpos que comprenden adicionalmente o alternativamente, en su cadena pesada, los residuos 1 a 123 de SEQ ID NO:20.

Los ejemplos particulares de anticuerpos de la presente invención pueden comprender, en la región variable de su cadena ligera, al menos una de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), o regiones hipervariables, encontradas en la cadena ligera de 5A1. Las CDR de 5A1 se discuten en el ejemplo 9. Así, entre los anticuerpos descritos en la presente memoria, están aquellos que comprenden de una a las tres secuencias siguientes en la región variable de la cadena ligera: residuos de aminoácidos 24-34 de SEQ D NO:18; residuos 50-56 de SEQ ID NO:18; y residuos 89-97 de SEQ ID NO:18. Los anticuerpos particulares descritos en la presente memoria comprenden, en la región variable de su cadena pesada, al menos una de las CDR encontradas en la cadena pesada de 5A1. Así entre los anticuerpos descritos en la presente memoria, están aquellos que comprenden de una a las tres secuencias siguientes en la región variable de la cadena pesada: residuos 31-35; residuos 50-65; y residuos 98-112 de SEQ ID NO:20.

Los anticuerpos monoclonales particulares de la invención pueden seleccionarse del grupo que consiste en Mab 63; un Mab que reacciona de manera cruzada con Mab 63; un Mab que se une al mismo epítopo que 63; un Mab que compite con 63 para la unión a una célula que expresa IL-4R humano; y un Mab que posee una actividad biológica de 63. El anticuerpo puede tener una afinidad de unión para IL-4R humano que es sustancialmente equivalente a la afinidad de unión de 63 para IL-4R humano. MAb 63 es un anticuerpo IgM. Los Mab de otros isotipos, obtenidos de 63, también están englobados por la presente invención. La presente invención también proporciona líneas celulares de hibridoma que producen cualquiera de dichos anticuerpos monoclonales.

Un ejemplo de una actividad biológica de 63 es la capacidad de funcionar como un antagonista de IL-4 y como un antagonista de IL-13. En un ejemplo, un MAb de la invención posee actividad bloqueante de IL-4 sustancialmente equivalente a la de 63; y posee una actividad bloqueante de IL-13 sustancialmente equivalente a la de 63. Dicha actividad puede medirse en cualquier ensayo convencional adecuado (por ejemplo, como se mide en el ensayo de expresión de CD23 descrito en el ejemplo 5).

La secuencia de ADN de la región variable de la cadena ligera de MAb 63 se presenta en SEQ ID NO:21 y la secuencia de aminoácidos codificada se presenta en SEQ ID NO:22. La secuencia de ADN para la región variable de la cadena pesada de MAb 63 se presenta como SEQ ID NO:23 y la secuencia de aminoácidos codificada se presenta en SEQ ID NO:24. Los anticuerpos de la presente invención pueden incluir anticuerpos monoclonales que comprenden, en su cadena ligera, los residuos 1 a 107 de SEQ NO:22; y anticuerpos que comprenden adicionalmente o alternativamente, en su cadena pesada, los residuos 1 a 117 de SEQ ID NO:24.

Los ejemplos particulares de anticuerpos de la presente invención comprenden, en la región variable de su cadena ligera, al menos una de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), o regiones hipervariables, encontradas en la cadena ligera de 63. Las CDR de 63 se discuten en el ejemplo 9. Así, entre los anticuerpos descritos en la presente memoria, están aquellos que comprenden de una a las tres secuencias siguientes en la región variable de la cadena ligera: residuos de aminoácidos 24-34 de SEQ D NO:22; residuos 50-56 de SEQ ID NO:22; y residuos 89-97 de SEQ ID NO:22. Los anticuerpos particulares descritos en la presente memoria comprenden, en la región variable de su cadena pesada, al menos una de las CDR encontradas en la cadena pesada de 63. Así entre los anticuerpos descritos en la presente memoria, están aquellos que comprenden de una a las tres secuencias siguientes en la región variable de la cadena pesada: residuos 31-35; residuos 50-66; y residuos 99-106 de SEQ ID NO:24.

La Figura 4 presenta un alineamiento de las secuencias de aminoácidos para la región variable de la cadena ligera para los anticuerpos 1B7, 63, 12B5, 6-2, 5A1 y 27A1. La primera secuencia en el alineamiento es para el anticuerpo 1B7. En las secuencias para los demás anticuerpos, se muestran los residuos de aminoácidos que se diferencian del residuo encontrado en la posición correspondiente en la secuencia de 1B7 y los residuos que son idénticos al residuo encontrado en esa posición en 1B7 se indican con "-".

La Figura 5 presenta un alineamiento de las secuencias de aminoácidos para la región variable de la cadena pesada para los anticuerpos 1B7, 63, 12B5, 6-2, 5A1 y 27A1. La primera secuencia en el alineamiento es para el anticuerpo 1B7. En las secuencias para los demás anticuerpos, se muestran los residuos de aminoácidos que se diferencian del residuo encontrado en la posición correspondiente en la secuencia de 1B7 y los residuos que son idénticos al residuo encontrado en esa posición en 1B7 se indican con "-".

Como puede verse en las Figuras 4 y 5, varios residuos están altamente conservados, respecto a que el residuo aparece en una posición correspondiente en los seis anticuerpos. Los anticuerpos particulares de la invención pueden comprender, en la región variable de su cadena ligera, residuos de aminoácidos que se encuentran en la posición correspondiente en al menos tres de las secuencias de la Figura 4. En determinados ejemplos, los anticuerpos comprenden residuos encontrados en una posición correspondiente en al menos cuatro, o al menos cinco, o al menos seis, de las secuencias de la Figura 4. Los anticuerpos particulares de la invención pueden comprender, en la región variable de su cadena pesada, residuos de aminoácidos que se encuentran en la posición correspondiente en al menos tres de las secuencias de la Figura 5. En determinados ejemplos, los anticuerpos comprenden residuos encontrados en una posición correspondiente en al menos cuatro, o al menos cinco, o al menos seis, de las secuencias de la Figura 5.

Los derivados de los anticuerpos monoclonales dirigidos frente a IL-4R pueden prepararse, y cribarse para propiedades deseadas, por cualquiera de varias técnicas conocidas. Algunas de las técnicas implican el aislamiento del ADN que codifica una cadena de polipéptido (o parte de ésta) de un MAb de interés, y manipular el ADN mediante tecnología de ADN recombinante. El ADN puede fusionarse con otro ADN de interés, o alterarse (por ejemplo, por mutagénesis u otras técnicas convencionales) para añadir, delecionar o sustituir uno o más residuos de aminoácidos, por ejemplo.

El ADN que codifica polipéptidos de anticuerpo (por ejemplo, cadena pesada o ligera, región variable sólo o longitud completa) puede aislarse de células B de ratones que han sido inmunizados con IL-4R. El ADN puede aislarse por procedimientos convencionales tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La exposición en fagos es otro ejemplo de una técnica conocida mediante la cual pueden prepararse los derivados de anticuerpos. En una estrategia, los polipéptidos que son componentes de un anticuerpo de interés se expresan en cualquier sistema de expresión recombinante adecuado y se permite que los polipéptidos expresados se ensamblen para formar moléculas de anticuerpo.

Los anticuerpos de cadena única pueden formarse uniendo fragmentos de la región variable de la cadena pesada y ligera (región Fv) mediante un puente de aminoácidos (conector peptídico corto), lo que resulta en una única cadena de polipéptido. Dichos Fv de cadena única (scFv) se han preparado fusionando ADN que codifica un conector peptídico entre ADN que codifican los dos polipéptidos de la región variable (V_L y V_H). Los fragmentos de anticuerpo resultantes pueden formar dímeros o trímeros, dependiendo de la longitud de un conector flexible entre los dos dominios variables (Kortt et al., *Protein Engineering* 10: 423, 1997). Las técnicas desarrolladas para la producción de anticuerpos de cadena única incluyen las descritas en la Patente U.S. 4.946.778; Bird (*Science* 242: 423, 1988); Huston et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85*: 5879, 1988); y Ward et al. (*Nature 334*: 544, 1989). Los anticuerpos de cadena única obtenidos de anticuerpos proporcionados en la presente memoria (incluyendo pero no limitados a scFv obtenidos de los MAb 6-2, 12B5, 63, 1B7, 5A1 y 27A1) pueden estar englobados por la presente invención.

Se conocen técnicas para obtener un anticuerpo de una subclase o isotipo diferente de un anticuerpo de interés, es decir, cambio de subclase. Así, los anticuerpos monoclonales IgG1 o IgG4 pueden obtenerse de un anticuerpo monoclonal IgM, por ejemplo, y viceversa. Dichas técnicas permiten la preparación de nuevos anticuerpos que poseen las propiedades de unión a antígeno de un anticuerpo dado (el anticuerpo parental), pero también presentan propiedades biológicas asociadas con un isotipo o subclase de anticuerpo diferente de la del anticuerpo parental. Pueden emplearse técnicas de ADN recombinante. El ADN clonado que codifica polipéptidos de anticuerpo particulares puede emplearse en dichos procedimientos, por ejemplo, ADN que codifica la región constante de un anticuerpo del isotipo deseado.

En ejemplos particulares, los anticuerpos producidos frente a IL-4R tienen una afinidad de unión (Ka) para IL-4R de al menos 1×10^8. En otras realizaciones, los anticuerpos presentan una Ka de al menos 1×10^9 o al menos 1×10^{10}.

También se contemplan derivados PEGilados de anticuerpos (modificados con polietilen glicol) y pueden prepararse por técnicas convencionales. En la presente memoria también se describen conjugados que comprenden un agente detectable (por ejemplo, de diagnóstico) o terapéutico, unido a un anticuerpo dirigido frente a IL-4R. Los ejemplos de dichos agentes son muy conocidos, e incluyen pero no están limitados a radionúclidos de diagnóstico, radionúclidos terapéuticos y fármacos citotóxicos. Los conjugados encuentran uso en procedimientos *in vitro* o *in vivo*.

Los ejemplos particulares de la invención están dirigidos a nuevas moléculas de ácido nucleico y polipéptidos. La información sobre la secuencia de ADN y aminoácidos se ha determinado para polipéptidos que son componentes de determinados anticuerpos de la presente invención, como de discute en los ejemplos 6, 8 y 9 más adelante. Entre los ácidos nucleicos está ADN aislado que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de nucleótidos presentada en SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23 y SEQ ID NO:25. Entre los polipéptidos está un polipéptido purificado que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24 y SEQ ID NO:26. Para el uso *in vivo*, los polipéptidos están ventajosamente purificados. Un polipéptido puede purificarse individualmente o en la forma de un anticuerpo purificado del que el polipéptido es un componente.

Los ejemplos adicionales de antagonistas de IL-4 son anticuerpos que se unen a IL-4 e inhiben la unión de IL-4 a los receptores de la superficie celular. Dichos anticuerpos pueden prepararse, y cribarse para identificar aquellos que son anticuerpos bloqueantes, por procedimientos convencionales. Los fragmentos de unión a antígeno de dichos anticuerpos encuentran uso como antagonistas, como lo hacen los derivados humanizados o modificados por ingeniería genética de éstos.

Los ejemplos de procedimientos para preparar los anticuerpos dirigidos frente a IL-4 humana (incluyendo anticuerpos monoclonales), ensayos por los que se identifican los anticuerpos bloqueantes, y técnicas ara generar derivados humanizados o modificados por ingeniería genética de anticuerpos anti-IL-4, se describen en las patentes U.S. 5.041.381, 5.863.537, 5.928.904 y 5.676.940. Los ejemplos adicionales de anticuerpos que pueden emplearse como antagonistas de IL-4 se describen en WO 91/09059.

Otros antagonistas

Los antagonistas no necesitan suprimir completamente la actividad biológica inducida por IL-4 para ser útiles. En lugar de esto, un antagonista dado puede reducir una actividad biológica de IL-4.

Pueden emplearse derivados, mutantes/muteínas y otras variantes de IL-4 que funcionen como antagonistas de IL-4. Los péptidos (que pueden o no ser muteínas) obtenidos de IL-4 que se unen a un IL-4R sin inducir la transducción de una señal biológica encuentran un uso en la presente memoria. Dichos péptidos funcionan como bloqueantes inertes, interfiriendo con la unión de IL-4 endógena biológicamente activa a receptores de la superficie celular. De esta manera, se inhibe la transducción de la señal inducida por IL-4. Las muteínas u otros antagonistas que inducen una respuesta biológica a un nivel reducido o en un grado menor, comparado con la respuesta inducida por IL-4 nativa, también encuentran uso como antagonistas de IL-4.

Una muteína de IL-4 humana es capaz de inhibir la actividad biológica inducida por IL-4 e inducida por IL-13. Dichas muteínas pueden emplearse en aquellos métodos descritos más adelante que implican el uso de un antagonista tanto de IL-4 como de IL-13 para tratar trastornos particulares. Véase, por ejemplo, la muteína IL-4 humana (un polipéptido variante con dos mutaciones puntuales) descrita en Fitch et al. (*J. Allergy Clin. Immunol.*, Vol. 107, no. 2, p. S61, resumen no. 209, 2001).

Ejemplos adicionales de antagonistas de IL-4, incluyendo muteínas de IL-4, y procedimientos para la preparación de estos se describen en Muller et al., *J. Mol. Biol.*, 237: 423-436, 1994; Patente U.S. 6.028.176, y Patente U.S. 5.723.118.

Otras opciones son moléculas antisentido (oligonucleótidos) que inhiben la expresión de IL-4. Alternativamente, la molécula antisentido puede suprimir la expresión de otras moléculas implicadas en la transducción de la señal inducida por IL-4.

Cualquier ensayo adecuado, incluyendo ensayos *in vitro*, puede utilizarse para determinar si un compuesto dado inhibe una actividad biológica inducida por IL-4. Un antagonista puede ensayarse para la capacidad de inhibir la incorporación de ^{3}H-timidina en células que proliferan normalmente en respuesta a IL-4.

Una alternativa implica el uso de técnicas de ensayo de unión convencionales para ensayar un antagonista para la capacidad de inhibir la unión de IL-4 a células que expresan receptores de IL-4 nativos o recombinantes. Para uso en dichos ensayos, IL-4 humana recombinante puede expresarse y purificarse como se describe en la Patente U.S. 5.017.691, o en Park et al., *J. Exp. Med. 166*: 476 (1987). La proteína purificada puede marcarse con un agente detectable (por ejemplo, marcado radiactivamente) por cualquiera de varias técnicas convencionales. Un reactivo de redioyodación enzymobead disponible comercialmente (BioRad) puede emplearse para marcar radiactivamente IL-4 con ^{125}I, por ejemplo.

La capacidad de un antagonista de IL-4 para inhibir el daño en el epitelio inducido por IL-4, tal como epitelio pulmonar o epitelio intestinal (que puede resultar en la pérdida de la función de barrera) puede confirmarse en cualquiera de varios ensayos adecuados. Entre las técnicas de ensayo adecuadas están aquellas descritas en el ejemplo 7 más adelante.

Métodos terapéuticos y Administración de Antagonistas

Los métodos proporcionados en la presente memoria en los que se usa el anticuerpo de la invención comprenden administrar un antagonista de IL-4 a un paciente, reduciendo de esta manera una respuesta biológica inducida por IL-4 que juega un papel en una afección particular. En ejemplos particulares, los métodos implican poner en contacto IL-4 endógena con un antagonista de IL-4, por ejemplo, en un procedimiento *ex vivo*.

El tratamiento engloba la mejora de al menos un síntoma de un trastorno o la reducción de la gravedad de la enfermedad y semejantes. Un antagonista no necesita efectuar una "cura" completa o erradicar todos los síntomas o manifestaciones de una enfermedad, para constituir un agente terapéutico viable. Como se reconoce en el campo pertinente, los fármacos empleados como agentes terapéuticos pueden reducir la gravedad de un estado patológico dado, pero no necesitan suprimir todas las manifestaciones de la enfermedad para ser considerados como agentes

terapéuticos útiles. Se describe un método que comprende administrar a un paciente un antagonista de IL-4 en una cantidad y durante un tiempo suficiente para inducir una mejora sostenida sobre la línea base de un indicador que refleja la gravedad del trastorno particular.

Los anticuerpos que inhiben la unión tanto de IL-4 como de IL-13 a las células se discuten en la presente memoria. Un método para suprimir las actividades inducidas por IL-4 e inducidas por IL-13 en los seres humanos comprende administrar una cantidad eficaz de dicho anticuerpo. Así, pueden tratarse las afecciones inducidas por IL-4 o por IL-13, o por ambas citoquinas.

Como se entiende en el campo pertinente, los antagonistas se administran a un paciente de una manera apropiada a la indicación. Los antagonistas pueden administrarse por cualquier técnica adecuada, incluyendo pero no limitada a, vía parenteral, tópica o por inhalación. Si se inyecta, el antagonista puede administrarse, por ejemplo, mediante rutas intra-articular, intravenosa, intramuscular, intralesional, intraperitoneal o subcutánea, por inyección en bolo, o infusión continua. Se contempla la administración localizada, por ejemplo, en un sitio de la enfermedad o lesión, como también la administración transdérmica y liberación sostenida desde implantes. La administración por inhalación incluye, por ejemplo, la inhalación nasal u oral, el uso de un nebulizador, inhalación del antagonista en forma de aerosol, y semejantes. Otras alternativas incluyen gotas oculares; preparaciones orales incluyendo comprimidos, jarabes, pastillas o chicle; y preparaciones tópicas tales como lociones, geles, pulverizadores y pomadas.

Se contempla el uso de antagonistas de IL-4 en procedimientos *ex vivo*. Por ejemplo, la sangre de un paciente (fluido corporal que contiene IL-4) puede ponerse en contacto con un antagonista que se une a IL-4 *ex vivo*, reduciendo de esta manera la cantidad de IL-4 en el fluido cuando se devuelve al paciente. El antagonista puede unirse a una matriz insoluble adecuada o material de soporte sólido.

Ventajosamente, los antagonistas se administran en la forma de una composición que comprende al menos un antagonista de IL-4 según la invención y uno o más componentes adicionales tales como un vehículo, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable. La presente invención proporciona dichas composiciones que comprenden una cantidad efectiva de un antagonista de IL-4, para usarse en los métodos proporcionados en la presente memoria.

Las composiciones contienen antagonista(s) en cualquiera de las formas descritas en la presente memoria. El antagonista puede ser un anticuerpo completo o un derivado modificado por ingeniería de éste, por ejemplo.

Las composiciones pueden comprender, por ejemplo, un antagonista junto con un tampón, antioxidante tal como ácido ascórbico, polipéptido de bajo peso molecular (tal como los que tienen menos de 10 aminoácidos), proteína, aminoácido, carbohidrato tal como glucosa, sacarosa, o dextrinas, agentes quelantes tal como EDTA, glutatión, y otros estabilizadores y excipientes. La disolución salina tamponada neutra o disolución salina mezclada con albúmina de suero específica son ejemplos de diluyentes apropiados. Según estándares industriales apropiados, también pueden añadirse conservantes tales como alcohol bencílico. La composición puede formularse como un liofilizado usando las disoluciones de excipiente apropiadas (por ejemplo, sacarosa) como diluyentes. Los componentes adecuados no son tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas. Los ejemplos adicionales de componentes que pueden emplearse en las formulaciones farmacéuticas se presentan en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª Ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1980.

Los kits para usarse por médicos incluyen un antagonista de IL-4 y una etiqueta u otras instrucciones para usarse para tratar cualquiera de las afecciones discutidas en la presente memoria. El kit incluye preferiblemente una preparación estéril de uno o más antagonistas de IL-4, que puede estar en la forma de una composición como se ha descrito anteriormente, y puede estar en uno o más viales.

Las dosificaciones y la frecuencia de administración pueden variar según factores tales como la ruta de administración, el antagonista particular empleado, la naturaleza y gravedad de la enfermedad que se va a tratar, si la afección es aguda o crónica y el tamaño y condición general del paciente. Las dosificaciones apropiadas pueden determinarse por procedimientos conocidos en la técnica pertinente, por ejemplo, en ensayos clínicos que pueden implicar estudios con escalada de la dosis.

Un antagonista puede administrarse una vez o repetidamente. En ejemplos particulares, el antagonista se administra durante un periodo de tiempo de al menos un mes o más, por ejemplo, durante uno, dos o tres meses o incluso indefinidamente. Para tratar afecciones crónicas, el tratamiento a largo plazo es generalmente el más eficaz. Sin embargo, para tratar afecciones agudas, la administración durante periodos más cortos, por ejemplo, de una a seis semanas, puede ser suficiente. En general, el antagonista se administra hasta que el paciente manifiesta un grado médicamente relevante de mejora sobre la línea base para el indicador o indicadores elegidos.

Los ejemplos particulares de la presente invención implican administrar un antagonista a una dosificación de aproximadamente 1 ng/kg/día hasta aproximadamente 10 mg/kg/día, más preferiblemente de aproximadamente 500 ng/kg/día hasta aproximadamente 5 mg/kg/día y lo más preferiblemente de aproximadamente 5 ug/kg/día hasta aproximadamente 2 mg/kg/día, a un paciente. En ejemplos adicionales, un antagonista se administra a adultos una vez a la semana, dos veces a la semana o tres o más veces a la semana, para tratar los trastornos médicos descritos en la presente memoria. Si se inyecta, la cantidad eficaz del antagonista por dosis en adultos puede variar

de 1-20 mg/m^2 y preferiblemente es aproximadamente 5-12 mg/m^2. Alternativamente, puede administrarse una dosis plana; la cantidad puede variar de 5-100 mg/dosis. Un intervalo para una dosis plana es aproximadamente 20-30 mg por dosis. En un ejemplo de la invención, una dosis plana de 25 mg/dosis se administra repetidamente por inyección. Si se usa una ruta de administración diferente a la inyección, la dosis se ajusta apropiadamente según las prácticas médicas estándar. Un ejemplo de un régimen terapéutico implica inyectar una dosis de aproximadamente 20-30 mg de un antagonista una a tres veces a la semana durante un periodo de al menos tres semanas, aunque el tratamiento durante periodos más largos puede ser necesario para inducir el grado deseado de mejora. Para los pacientes pediátricos (edad 4-17), un régimen adecuado implica la inyección subcutánea de 0,4 mg/kg, hasta una dosis máxima de 25 mg de IL-4R, administrado dos o tres veces a la semana.

Los métodos descritos en la presente memoria implican la inyección subcutánea de 0,5 mg a 10 mg, preferiblemente de 3 a 5 mg, de un IL-4R soluble, una o dos veces a la semana. Otro ejemplo está dirigido a la administración pulmonar (por ejemplo, por nebulizador) de 3 o más mg de un IL-4R soluble una vez a la semana.

Los ejemplos de regímenes terapéuticos descritos en la presente memoria comprenden la inyección subcutánea de un IL-4R humano soluble una vez a la semana, a una dosis de 1,5 a 3 mg, para tratar sarcoidosis pulmonar, nefrosis de cambio mínimo, uveitis autoinmune, crisis de células falciformes, síndrome de Chrug-Strauss, síndrome de Sjogren, síndrome linfoproliferativo autoinmune, pre-eclampsia, anemia hemolítica autoinmune, esófago de Barrett, Enfermedad de Grave, Enfermedad de Kawasaki y tuberculosis cavitaria. La administración semanal de IL-4R se continúa hasta que los síntomas remiten. El tratamiento puede reiniciarse según se necesite o, alternativamente, pueden administrarse dosis de mantenimiento.

Un antagonista se administra al paciente en una cantidad y durante un tiempo suficiente para inducir una mejora preferiblemente una mejora sostenida, en al menos un indicador que refleja la gravedad del trastorno que se está tratando. Varios indicadores que reflejan la magnitud de la enfermedad del paciente pueden evaluarse para determinar si la cantidad y tiempo del tratamiento es suficiente. Dichos indicadores incluyen, por ejemplo, indicadores clínicamente reconocidos de la gravedad de la enfermedad, síntomas o manifestaciones del trastorno en cuestión. En la mayor parte de los casos, una mejora se considera que es sostenida si el paciente presenta la mejora en al menos dos ocasiones separadas por dos a cuatro semanas. El grado de mejora se determina generalmente por el médico del paciente, que puede hacer esta determinación tomando como base signos o síntomas y que también puede emplear cuestionarios que se administran al paciente, tales como cuestionarios sobre la calidad de vida desarrollados para una enfermedad dada.

Como un ejemplo, para tratar la hiperplasia benigna de la próstata, un inhibidor de IL-4 se administra al paciente en una cantidad y durante un tiempo eficaz en la regresión de la cicatriz o cicatrización completa. Las dosis de mantenimiento pueden proporcionarse o reiniciarse el tratamiento según se necesite.

Los niveles elevados de IL-4 están asociados con varios trastornos, como se ha discutido anteriormente. Los pacientes con un trastorno dado pueden cribarse, para identificar aquellos individuos que tienen niveles elevados de IL-4 o para identificar aquellos con una respuesta inmune de tipo TH2 elevada, identificando de esta manera a los pacientes que pueden beneficiarse más del tratamiento con un antagonista de IL-4. Así, los métodos de tratamiento proporcionados en la presente memoria comprenden opcionalmente una primera etapa de medir el nivel de IL-4 de un paciente. Un antagonista de IL-4 puede administrarse a un paciente en el que los niveles de IL-4 están elevados por encima de lo normal. Alternativamente o adicionalmente, un paciente puede pre-cribarse para determinar si el paciente tiene una respuesta inmune de tipo TH2 elevada, antes de la administración del antagonista(s) frente a una o más citoquinas de tipo TH2.

Los niveles de IL-4 de un paciente (y, opcionalmente, de otras citoquinas de tipo TH2) pueden monitorizarse durante y/o después del tratamiento con un antagonista de IL-4, para detectar la reducción en los niveles de las citoquinas. Para algunos trastornos, la incidencia de niveles elevados de IL-4 y el equilibrio entre las respuestas inmunes de tipo TH1 y tipo TH2, puede variar según factores tales como el estadio de la enfermedad o la forma particular de la enfermedad. Pueden emplearse técnicas conocidas para medir los niveles de IL-4, por ejemplo, en el suero de un paciente y para evaluar las respuestas inmunes de tipo TH2. Los niveles de citoquinas en muestras de sangre pueden medirse por ELISA, por ejemplo.

Los ejemplos particulares descritos en la presente memoria implican el uso de dos o más antagonistas de IL-4 diferentes. En ejemplos adicionales, el antagonista(s) de IL-4 se administran solos o en combinación con otros agentes útiles para tratar la afección que padece el paciente. Los ejemplos de dichos agentes incluyen tanto fármacos proteínicos como no proteínicos. Cuando se co-administran múltiples terapéuticos, las dosificaciones pueden ajustarse de acuerdo con esto, como se reconoce en la técnica pertinente. Las terapias de "co-administración" y combinación no están limitadas a la administración simultánea sino que incluyen regímenes de tratamiento en los que un antagonista de IL-4 se administra al menos una vez durante el curso del tratamiento que implica administrar al menos un agente terapéutico más al paciente.

Los ejemplos de otros agentes que pueden co-administrarse con antagonistas de IL-4 son otros anticuerpos, citoquinas o receptores de citoquinas que se eligen según la afección particular que se va a tratar. Alternativamente,

fármacos no proteínicos que son útiles para tratar una de las afecciones particulares discutidas anteriormente pueden co-administrarse con un antagonista de IL-4.

Para tratar afecciones mediadas por IgE, un antagonista de IL-4 puede co-administrarse con un antagonista de IgE. Un ejemplo es un anticuerpo anti-IgE. Los anticuerpos monoclonales anti-IgE humanizados se describen en Presta et al. *(J. Immunol*. 151(5): 2623-2632, 1993) y Adelroth et al. (*J. Allergy Clin. Immunol*. 106(2): 253-259, 2000), por ejemplo.

Los antagonistas de IL-4 pueden co-administrarse con un antagonista de IL-5, que puede ser una molécula que interfiere con la unión de IL-5 a un receptor de IL-5, tal como un anticuerpo anti-IL-5 (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-IL-5 humano o humanizado) o un receptor tal como un polipéptido de receptor de IL-5 humano soluble. IL-5 se ha implicado en jugar un papel en la mediación de las respuestas alérgicas. Así, la administración de antagonista(s) de IL-4 e IL-5 se contempla para el tratamiento de reacciones alérgicas, incluyendo pero no limitado a asma alérgico.

Los antagonistas de IL-4 pueden emplearse conjuntamente con otro u otros agentes para tratar las afecciones particulares inducidas por IL-4 discutidas anteriormente. Por ejemplo, los fármacos empleados actualmente para tratar las afecciones pueden co-administrarse con uno o más antagonistas de IL-4.

Para tratar el asma, un antagonista de IL-4 puede co-administrarse con otras medicaciones anti-asma, tales como corticosteroides inhalados, beta agonistas, antagonistas de leucotrieno, xantinas, fluticasona, salmeterol, albuterol, agentes no esteroideos tales como cromolina, y semejantes. Los antagonistas de IL-4 pueden co-administrarse con otras medicaciones anti-alergia para tratar reacciones alérgicas.

Un ejemplo descrito está dirigido a la co-administración de un antagonista de IL-4 (tal como un IL-4R humano soluble) y fluticasona y salmeterol para tratar un trastorno tal como asma. En la presente memoria se proporcionan composiciones que comprenden un inhibidor de IL-4 (por ejemplo, IL-4R humano soluble), fluticasona y salmeterol. Advair Diskus (Glaxo Wellcome) comprende propionato de fluticasona y xinafoato de salmeterol. Para tratar asma, Advair Diskus y el antagonista de IL-4 se administran preferiblemente por inhalación.

Otro ejemplo de terapia de combinación comprende la co-administración de un antagonista de IL-4 y un antagonista de IL-9 a un paciente que tiene asma. Puede emplearse cualquier antagonista de IL-9 adecuado, tal como un receptor de IL-9 (preferiblemente una forma soluble de éste), un anticuerpo que interfiere con la unión de IL-9 a un receptor de la superficie celular (en el que el anticuerpo puede producirse frente a IL-9 o a un polipéptido del receptor de IL-9) u otro compuesto que inhibe la actividad biológica inducida por IL-9. Los receptores de IL-9 incluyen los descritos en WO 93/18047 y en las Patentes U.S. 5.789.237 y 5.962.269.

En un ejemplo adicional de terapia de combinación, un método para tratar colitis ulcerosa comprende la co-administración de al menos un antagonista de IL-4 y al menos un antagonista de IL-1. Los ejemplos de antagonistas de IL-1 incluyen el receptor de IL-1 de tipo I, el receptor de IL-1 de tipo II, antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra), anticuerpos antagonistas (bloqueantes) dirigidos frente a IL-1 y anticuerpos antagonistas dirigidos frente a un receptor de IL-1. Pueden emplearse varias formas de los receptores, tales como fragmentos, variantes y fusiones análogas a las descritas anteriormente para el receptor de IL-4. Un antagonista de IL-1 preferido es una forma soluble del receptor de IL-1 de tipo II, que se describe en la Patente U.S. 5.350.683.

Un método comprende la co-administración de antagonista(s) de IL-4 y antagonista(s) de IL-13 a un paciente que tiene nefrosis de cambio mínimo. Los ejemplos alternativos implican la administración de antagonista(s) de IL-4 solo o antagonista(s) de IL-13 solo, a un paciente con nefrosis de cambio mínimo. El antagonista(s) de IL-4 y/o antagonista(s) de IL-13 pueden administrarse para reducir la gravedad de la enfermedad.

Otro método descrito en la presente memoria es un método para tratar varias afecciones inflamatorias alérgicas, que comprende la co-administración de antagonista(s) de IL-4 y antagonista(s) de IL-13. Las afecciones tales como asma, alergias y enfermedades pulmonares crónicas tales como fibrosis quística y enfermedad pulmonar obstructiva crónica se tratan con dicho método.

Puede emplearse cualquier antagonista de IL-13 adecuado, incluyendo pero no limitado a receptores de IL-13 (preferiblemente formas solubles de éstos), antagonistas del receptor de IL-13, anticuerpos dirigidos frente a IL-13 o un receptor de IL-13, otras proteínas que interfieren con la unión de IL-13 a un receptor de IL-13 y compuestos que inhiben la transducción de la señal mediada por IL-13. Los receptores de IL-13 y los heterodímeros que comprenden polipéptidos IL-13R como componentes de éstos se describen anteriormente. Los anticuerpos que se producen frente a IL-4R pueden cribarse para la capacidad de funcionar también como antagonistas de IL-13, como se ha discutido anteriormente.

Un método para tratar o prevenir una afección caracterizada por una función de barrera epitelial reducida comprende co-administrar antagonista(s) de IL-4 y uno o más antagonistas de IL-13. Dichas afecciones se discuten anteriormente. En un ejemplo, la afección es asma. Los ejemplos particulares están dirigidos a la co-administración de uno o más antagonistas de IL-4 y uno o más antagonistas de IL-13 a un paciente que tiene una afección que implica la reducción de la función de la barrera epitelial pulmonar o la función de la barrera epitelial intestinal, en el

que tanto IL-4 como IL-13 juegan un papel en la función de barrera reducida. El método inhibe así tanto la reducción de la función de la barrera inducida por IL-4 como la reducción de la función de la barrera inducida por IL-13. El efecto adverso de IL-13 en la función de la barrera epitelial pulmonar e intestinal puede confirmarse usando técnicas de ensayo tales como las descritas en el ejemplo 7 más adelante. (Véase también Zund et al., *J. Biol. Chem.* 271(13): 7460-7464, 1996).

Otro método proporcionado en la presente memoria comprende co-administrar antagonista(s) de IL-4 e interferón-γ (IFN-γ) a un paciente que tiene una afección que implica la reducción de la función de la barrera epitelial pulmonar. Opcionalmente, dicho método comprende además la co-administración de uno o más antagonistas de IL-13 al paciente (es decir, la co-administración de un antagonista de IL-4, IFN-γ y un antagonista de IL-13). Otros métodos comprenden administrar IFN-γ como un único agente, o co-administrar IFN-γ y un antagonista de IL-13, a un paciente que tiene una afección que implica la reducción de la función de la barrera epitelial pulmonar. En un ejemplo, el paciente tiene asma. Para tratar el asma, el antagonista de IL-4, IFN-γ y/o el antagonista de IL-13 se administran preferiblemente por inhalación.

Un método descrito en la presente memoria para tratar asma comprende administrar un antagonista de IL-4 e interferón-γ a un ser humano que tiene asma. Otro método para tratar asma comprende co-administrar un antagonista de IL-4, IFN-γ un antagonista de IL-13 a un ser humano que tiene asma. En un ejemplo, IFN-γ se co-administra a un asmático, junto con un anticuerpo que funciona como un antagonista tanto de IL-4 como de IL-13. Dichos anticuerpos se describen en otro lugar en la presente memoria.

Un único agente puede funcionar como un antagonista de IL-4 y un antagonista de IL-13, como se ha discutido anteriormente. Como un ejemplo de dicho agente, algunos anticuerpos producidos frente a IL-4Rα pueden interferir con la unión de los complejos de receptor tanto de IL-4 como de IL-13, debido al componente compartido IL-4Rα en dichos complejos de receptor multi-subunidad (discutido anteriormente). Así, puede emplearse un único agente en un método para inhibir la reducción de la función de la barrera.

Los antagonistas pueden co-administrarse con uno o más antagonistas del receptor de leucotrieno para tratar trastornos tales como enfermedades inflamatorias alérgicas, por ejemplo, asma y alergias. Los ejemplos de antagonistas del receptor de leucotrieno incluyen pero no están limitados a montelukast, pranlukast y zafirlukast. Los fármacos que funcionan como inhibidores de 5-lipoxigenasa pueden co-administrarse con un antagonista de IL-4 para tratar asma.

Los métodos descritos en la presente memoria comprenden administrar uno o más de los siguientes a los pacientes con Síndrome de Churg-Strauss: antagonista(s) de IL-4, antagonista(s) de IL-5, antagonista(s) de IL-13 o antagonista(s) de IgE. Un ejemplo de dicho método implica co-administrar antagonista(s) de IL-4 y antagonista(s) de IL-5 a un paciente con Síndrome de Churg-Strauss. En otro ejemplo, los antagonista(s) de IL-4 y los antagonista(s) de IgE se co-administran al paciente. En otro ejemplo más, los antagonista(s) de IL-4 y los antagonista(s) de IL-13 se co-administran al paciente.

La hormona relaxina puede co-administrarse con un antagonista de IL-4 para tratar escleroderma (esclerosis sistémica), fibrosis pulmonar idiopática, o cualquier otro trastorno caracterizado por fibrosis pulmonar, tal como las afecciones que implican fibrosis del pulmón que se han discutido anteriormente. La relaxina humana recombinante se prefiere para usarse para tratar seres humanos.

Un método para tratar hiperplasia benigna de la próstata comprende co-administrar antagonista(s) de IL-4 y uno o más agentes anti-inflamatorios adicionales. Los ejemplos de agentes que inhiben la inflamación incluyen antagonistas del factor de necrosis tumoral (TNF) y antagonistas de IL-17.

Puede emplearse cualquier antagonista de IL-17 adecuado, incluyendo pero no limitado a un receptor de IL-17 (preferiblemente formas solubles de éstos), antagonistas del receptor de IL-17, anticuerpos dirigidos frente a IL-17 o un receptor de IL-17, otras proteínas que interfieren con la unión de IL-17 a un receptor de IL-17 y compuestos que inhiben la transducción de la señal mediada por IL-17. Un receptor de IL-17, incluyendo formas solubles de éste y oligómeros de éste, se describe en WO 96/29408, incorporado por referencia por la presente. Un método alternativo descrito en la presente memoria comprende administrar un antagonista de IL-17 para tratar a un paciente con hiperplasia benigna de próstata.

Asimismo, puede emplearse cualquier antagonista de TNF adecuado, incluyendo pero no limitado a un receptor de TNF (preferiblemente formas solubles de éste), proteínas de fusión que comprenden un receptor de TNF (o que comprenden la parte de unión a TNF de un receptor de TNF), antagonistas del receptor de TNF, anticuerpos dirigidos frente a TNF o un receptor de TNF, otras proteínas que interfieren con la unión de TNF a un receptor de TNF, y compuestos que inhiben la transducción de la señal mediada por TNF. Los ejemplos adicionales de inhibidores de TNF son los fármacos talidomida y pentoxifilina. La proteína receptor de TNF conocida como p75 o p80 TNF-R se emplea preferiblemente. Un antagonista de TNF preferido es un receptor de TNF humano soluble (sTNF-R) en forma dimérica, tales como dímeros de proteínas de fusión sTNF-R/Fc. Uno de dichos dímeros es etanercept (Enbrel®, Immunex Corporation, Seattle, WA). p75/p80 TNF-R, incluyendo los fragmentos solubles y otras formas de éste, se describe en WO 91/03553.

Un antagonista de IL-4 puede co-administrarse con un antagonista de TNF para tratar cualquier afección en la que juegan un papel respuestas inmunes no deseadas inducidas por IL-4 e inducidas por TNF, tales como inflamación. Un método descrito en la presente memoria comprende co-administrar un antagonista de IL-4 y un antagonista de TNF a un paciente con enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa. Otros ejemplos están dirigidos a un método que comprende co-administrar un antagonista de IL-4 y un antagonista de TNF a un paciente que tiene Enfermedad de Kawasaki, anemia hemolítica autoinmune, uveoretinitis autoinmune, síndrome linfoproliferativo autoinmune, síndrome de Sjogren, síndrome de fatiga crónica o hepatotoxicidad inducido por un fármaco tal como diclofenac.

Otro método descrito en la presente memoria comprende co-administrar un antagonista de IL-4 y un antagonista de TNF a una mujer embarazada que ha desarrollado pre-eclampsia. La administración del antagonista de IL-4 y el antagonista de TNF continúa preferiblemente durante la duración del embarazo.

Las dosificaciones adecuadas de etanercept (Enbrel®, Immunex Corporation, Seattle, WA) variarán según la naturaleza de la enfermedad que se va a tratar, gravedad de la enfermedad, el tamaño del paciente (por ejemplo, adulto o niño) y otros factores, como se reconoce en el campo pertinente. En una realización de los métodos proporcionados en la presente memoria, Enbrel® se administra dos veces a la semana por inyección subcutánea a una dosis de 1 a 25 mg. Un ejemplo de una dosificación pediátrica es 0,4 mg/kg. Los métodos particulares proporcionados en la presente memoria comprenden la co-administración de un antagonista de IL-4 y Enbrel® a un paciente que tiene síndrome linfoproliferativo autoinmune o síndrome de Sjogren, en el que Enbrel® se proporciona por inyección subcutánea a una dosis de 1 a 25 mg.

Para tratar la enfermedad de injerto frente a huésped, un antagonista de IL-4 se co-administra con al menos uno de los agentes siguientes: un antagonista de TNF, un antagonista de IL-1, esteroides o corticosteroides. El inhibidor de TNF es preferiblemente Enbrel®. Un antagonista de IL-1 preferido es una forma soluble de receptor de IL-1 de tipo II, que se describe en la Patente U.S. 5.350.683. En un ejemplo, el GVHD está asociado con (por ejemplo, se desarrolla posteriormente a) trasplante de médula ósea. Un antagonista de IL-4 puede emplearse en combinación con al menos uno de los agentes listados anteriormente, en métodos para suprimir una respuesta inmune dirigida frente a células trasplantadas, tejido y/o aloantígeno.

En la presente memoria se describen varios antagonistas de citoquinas y otros agentes/fármacos como útiles para terapia de combinación (por ejemplo, co-administración con un antagonista de IL-4) para tratar enfermedades particulares. Debe entenderse que dichos antagonistas, agentes o fármacos también encuentran uso como agentes únicos para tratar estas enfermedades. También debe entenderse que la descripción de métodos que implican la administración de un antagonista de una citoquina particular, para tratar una enfermedad, engloba la administración de un tipo de antagonista y también engloba la administración de dos o más antagonistas diferentes para esta citoquina, a no ser que se especifique otra cosa.

Los ejemplos siguientes se ofrecen como ilustración y no como limitación.

Ejemplo 1: Preparación de Anticuerpos Monoclonales

Los polipéptidos de receptor de IL-4 pueden emplearse como inmunógenos para generar anticuerpos monoclonales por técnicas convencionales, por ejemplo, las técnicas descritas en la Patente U.S. 5.599.905, incorporado por referencia en la presente. Se reconoce que los polipéptidos en varias formas pueden emplearse como inmunógenos, por ejemplo, proteínas de longitud completa, fragmentos de éstas, proteínas de fusión de éstas tales como fusiones Fc, células que expresan la proteína recombinante en la superficie celular, etc.

Para resumir un ejemplo de dicho procedimiento, un inmunógeno IL-4R emulsionado en adyuvante completo de Freund se inyecta subcutáneamente en ratas Lewis, en cantidades que varían de 10-100 μl. Tres semanas después, los animales inmunizados se refuerzan con inmunógeno adicional emulsionado en adyuvante incompleto de Freund y se refuerzan cada tres semanas desde ese momento. Periódicamente se toman muestras de suero por sangrado retro-orbital o escisión de la punta de la cola para ensayar por ensayo de hibridación sobre mancha, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima) o inhibición de la unión de ^{125}I-IL-4 a los extractos de células que expresan IL-4R. Después de la detección de la titulación de un anticuerpo apropiado, se proporcionó a los animales positivos una inyección intravenosa final de antígeno en disolución salina. De tres a cuatro días después, los animales se sacrifican, se recogen los esplenocitos, y se fusionan con la línea celular de mieloma murino AG8653. Las líneas celulares de hibridoma resultantes se siembran en placas en placas de microtitulación múltiples en un medio HAT selectivo (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de las células no fusionadas, híbridos de mieloma e híbridos de células de bazo.

Los clones de hibridoma así generados se criban para reactividad con IL-4R. El cribado inicial de los sobrenadantes de los hibridomas utiliza un anticuerpo de captura y la unión del receptor ^{125}I-IL-4 parcialmente purificado. Los hibridomas que son positivos en este método de cribado se ensayan con un anticuerpo de captura modificado para detectar las líneas celulares de hibridoma que están produciendo el anticuerpo bloqueante. Así, se detectan los hibridomas que secretan un anticuerpo monoclonal capaz de inhibir la unión de ^{125}I-IL-4 a las células que expresan IL-4R. Dichos hibridomas se inyectan en las cavidades peritoneales de ratones desnudos para producir ascites que

contienen altas concentraciones (>1 mg/ml) de anticuerpo monoclonal anti-IL-4R. Los anticuerpos monoclonales resultantes pueden purificarse por precipitación con sulfato de amonio seguido de cromatografía de exclusión en gel y/o cromatografía de afinidad basada en la unión del anticuerpo a Proteína G.

Ejemplo 2: Generación de ratones Cmu diana

Este ejemplo describe procedimientos para generar ratones transgénicos. En los Ejemplos 3 y 4 se describen procedimientos adicionales para generar ratones transgénicos y el uso de dichos ratones para preparar anticuerpos humanos.

Construcción de un vector de direccionamiento CMD. El plásmido pICEmu contiene un fragmento EcoRI/XhoI del locus de la cadena pesada de Ig murino, que cubre el gen mu, que se obtuvo de una biblioteca de fago lambda genómica Balb/C (Marcu et al. *Cell* 22: 187, 1980). Este fragmento genómico se subclonó en los sitios XhoI/EcoRI del plásmido pICEMI9H (Marsh et al; *Gene* 32: 481-485, 1984). Las secuencias de cadena pesada incluidas en pICEmu se extienden en 3' del sitio EcoRI localizado justo 3' del amplificador intrónico mu, hasta el sitio XhoI localizado aproximadamente 1 kb en 3' del último exón transmembrana del gen mu; sin embargo, gran parte de la región repetida switch de mu se ha delecionado por el paso en *E. coli*.

El vector de direccionamiento se construyó como sigue. (Véanse las Figuras 2A-2C, que representan más detalles). Un fragmento HindIII/SmaI de 1,3 kb se escindió de pICEmu y se subclonó en pBluescript digerido con HindIII/SmaI (Stratagene, La Jolla, CA). Este fragmento pICEmu se extiende desde el sitio HindIII localizado aproximadamente 1 kb 5' de Cmu1 hasta el sito SmaI localizado en Cmu1. El plásmido resultante se digirió con SmaI/SpeI y se insertó el fragmento SmaI/XbaI de aproximadamente 4 kb de pICEmu, que se extiende desde el sitio SmaI en Cmu1 3' hasta el sitio XbaI localizado justo en 3' del último exón de Cmu. El plásmido resultante, pTAR1, se linealizó en el sitio SmaI y se insertó un casete de expresión neo. Este casete consiste en el gen neo bajo el control transcripcional del promotor de la fosfoglicerato quinasa (pgk) de ratón (fragmento XbaI/TaqI; Adra et al. (1987) *Gene* 60: 65-74) y que contiene el sitio de poliadenilación pgk (fragmento PvuII/HindIII; Boer et al. (1990) *Biochemical Genetics* 28: 299-308). Este casete se obtuvo a partir del plásmido pKJ1 (descrito por Tybulewicz et al. (1991) *Cell* 65: 1153-1163) a partir del cual se escindió el casete neo como un fragmento EcoRI/HindIII y se subclonó en pGEM-7Zf (+) digerido con EcoRI/HindIII para generar pGEM-7 (KJ1). El casete neo se escindió de pGEM-7 (KJ1) por digestión con EcoRI/SalI, con extremos romos y se subclonó en el sitio SmaI del plásmido pTAR1, en la orientación opuesta de las secuencias Cmu genómicas.

El plásmido resultante se linealizó con NotI y se insertó un casete de timidina quinasa (tk) de virus herpes simple para permitir el enriquecimiento de los clones ES que presentan recombinantes homólogos, como se describe por Mansour et al. (1988) *Nature* 336: 348-352. Este casete consiste en las secuencias codificadoras del gen tk flanqueadas por el promotor pgk y sitio de poliadenilación de ratón, como se describe por Tybulewicz et al. (1991) *Cell* 65: 1153-1163.

El vector de direccionamiento CMD resultante contiene un total de aproximadamente 5,3 kb de homología con el locus de la cadena pesada y se designa para generar un gen mu mutante en el que se ha insertado un casete de expresión neo en el único sitio SmaI del primer exón Cmu. El vector de direccionamiento se linealizó con PvuI, que corta en las secuencias de plásmido, antes de electroporación en células ES.

Generación y análisis de células ES diana. Se crecieron células AB-1 ES (McMahon, A.P. y Bradley, A., (1990) *Cell* 62: 1073-1085) en capas de soporte de células SNL76/7 mitóticamente inactivo (ibid.), esencialmente como se describe en *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach*, E.J. Robertson, Ed., Oxford: IRL Press, 1987, p. 71-112. El vector de direccionamiento CMD linealizado se electroporó en células AB-1 por los métodos descritos en Hasty et al. (1991) *Nature* 350: 243-246. Las células electroporadas se sembraron en placas en placas de 100 mm a una densidad de 1-2 x 10^6 células/placa. Después de 24 horas, se añadieron G418 (200 microgramos/ml de componente activo) y FIAU (5 x 10^{-7} M) al medio y se permitió que los clones resistentes a fármaco se desarrollaran durante 8-9 días. Los clones se tomaron, se tripsinizaron, se dividieron en dos partes y se expandieron más. La mitad de las células obtenidas de cada clon se congeló y la otra mitad se analizó para recombinación homóloga entre el vector y las secuencias diana.

El análisis de ADN se llevó a cabo por hibridación de transferencia Southern. El ADN se aisló de los clones como se describe por Laird et al., (1991) *Nucleic Acids Res*. 19: 4293). El ADN genómico aislado se digirió con SpeI y se ensayó con un fragmento SacI de 915 pb, sonda A (Figura 2C), que hibrida con una secuencia entre el amplificador intrónico mu y la región switch mu. La sonda A detecta un fragmento SpeI de 9,9 kb del locus de tipo salvaje y una banda diagnóstico de 7,6 kb de un locus mu que se ha recombinado de manera homóloga con el vector de direccionamiento CMD (el casete de expresión neo contiene un sitio SpeI).

De los 1.132 clones resistentes a G418 y FIAU cribados por análisis de transferencia Southern, 3 presentaron la banda SpeI de 7,6 kb indicativa de recombinación homóloga en el locus mu. Estos 3 clones se digirieron adicionalmente con las enzimas BglI, BstXI y EcoRI para verificar que el vector se integraba de manera homóloga en el gen mu. Cuando se hibrida con la sonda A, las transferencias Southern del ADN de tipo salvaje digerido con BglI, BstXI o EcoRI producen fragmentos de 15,7, 7,3 y 12,5 kb, respectivamente, mientras que la presencia de un alelo

mu diana se indica por los fragmentos de 7,7, 6,6 y 14,3 kb, respectivamente. Los 3 clones positivos detectados por el digerido SpeI mostraron los fragmentos de restricción BglI, BstXI y EcoRI esperados diagnóstico de inserción del casete neo en el exón Cmu1.

Generación de ratones que presentan el gen mu mutado. Los tres clones ES diana, designados con el número 264, 272 y 408, se descongelaron y se inyectaron en blastocitos C57BL/6J como se describe por A. Bradley en *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach*, E.J. Robertson, Ed., Oxford: IRL Press, 1987, p. 113-151. Los blastocitos inyectados se transfirieron al útero de hembras pseudopreñadas para generar ratones quimera que representan una mezcla de células obtenidas de la entrada de células ES y el blastocito del huésped. El grado de la contribución de las células ES a la quimera puede estimarse visualmente por la cantidad de coloración agouti del pelaje, obtenida de la línea celular ES, en el fondo negro de C57BL/6J. Los clones 272 y 408 produjeron sólo un bajo porcentaje de quimeras (es decir, porcentaje bajo de pigmentación agouti) pero el clon 264 produjo un porcentaje alto de quimeras macho. Estas quimeras se criaron con hembras C57BL/6J y se generaron crías agouti, indicativo de transmisión por la línea germinal del genoma de células ES. El cribado para el gen mu diana se llevó a cabo por análisis por transferencia Southern del ADN digerido con BglI de biopsias de cola (como se ha descrito anteriormente para el análisis del ADN de células ES). Aproximadamente el 50% de las crías agouti mostró una banda BglI que hibrida de 7,7 kb además de la banda de 15,7 kb de tipo salvaje, lo que demuestra una transmisión por la línea germinal del gen mu diana.

Análisis de los ratones transgénicos para la inactivación funcional del gen mu. Para determinar si la inserción del casete neo en Cmu1 ha inactivado el gen de cadena pesada de Ig, una quimera del clon 264 se crió con un ratón homocigoto para la mutación JHD, que inactiva la expresión de la cadena pesada como resultado de la deleción de los segmentos génicos JH (Chen et al, (1993) *Immunol.* 5: 647-656). Se generaron cuatro crías agouti. Se obtuvo suero de estos animales a la edad de 1 mes y se ensayó por ELISA para la presencia de IgM murina. Dos de las cuatro crías carecían completamente de IgM (Tabla 1). El genotipado de los cuatro animales por análisis por transferencia Southern del ADN de biopsias de cola por digestión con BglI e hibridación con la sonda A (Figura 2C) y por digestión con StuI e hibridación con un fragmento EcoRI/StuI de 475 pb (ibid.) demostró que los animales que no expresaban IgM sérica son aquellos en los que un alelo del locus de la cadena pesada porta la mutación JHD, el otro alelo la mutación Cmu1. Los ratones heterocigotos para la mutación JHD presentan niveles de tipo salvaje de Ig sérica. Estos datos demuestran que la mutación Cmu1 inactiva la expresión del gen mu.

La Tabla 1 presenta el nivel de IgM sérica, detectado por ELISA, para ratones que portan las dos mutaciones CMD y JHD (CMD/JHD), para ratones heterocigotos para la mutación JHD (+/JHD), para ratones de tipo salvaje (129Sv x C57BL/6J)F1 (+/+) y para ratones deficientes en células B homocigotos para la mutación JHD (JHD/JHD).

TABLA 1

Ratón	IgM sérica (microgramos/ml)	Genotipo de la cadena H de Ig
42	<0,002	CMD/JHD
43	196	+/JHD
44	<0,002	CMD/JHD
45	174	+/JHD
129 x BL6F1	153	+/+
JHD	<0,002	JHD/JHD

Ejemplo 3: Generación de ratones transgénicos

El transgén de la cadena pesada humana HCo12. El transgén HCo12 se generó por coinyección del inserto de 80 kb de pHC2 (Taylor et al., 1994, *Int. Immunol.*, 6: 579-591) y el inserto de 25 kb de pVx6. El plásmido pVx6 se construyó como se describe más adelante.

Un fragmento de ADN HindIII/SalI de 8,5 kb, que comprende el gen VH1-18 humano de la línea germinal (DP-14) junto con aproximadamente 2,5 kb de secuencia genómica 5' flanqueante y 5 kb de de secuencia genómica 3' flanqueante se subclonó en el vector plasmídico pSP72 (Promega, Madison, WI) para generar el plásmido p343.7.16. Un fragmento de ADN BamHI/HindIII de 7 kb, que comprende el gen VH5-51 humano de la línea germinal (DP-73) junto con aproximadamente 5 kb de secuencia genómica 5' flanqueante y 1 kb de de secuencia genómica 3' flanqueante se clonó en el vector de clonación pGP1f basado en el plásmido pBR322 (Taylor et al. 1992, Nucleic Acids Res. 20: 6287-6295) para generar el plásmido p251f.

Un vector de clonación nuevo obtenido de pGP1f, pGP1k (cuya secuencia se presenta en las Figuras 3A y 3B y SEQ ID NO:4), se digirió con EcoRV/BamHI y se ligó en un fragmento de ADN EcoRV/BamHI de 10 kb, que comprende el gen VH3-23 humano de la línea germinal (DP47) junto con aproximadamente 4 kb de secuencia genómica 5' flanqueante y 5 kb de de secuencia genómica 3' flanqueante. El plásmido resultante, p112.2RR.7, se digirió con

BamHI/SalI y se ligó en el inserto BamHI/SalI purificado de 7 kb de p251f. El plásmido resultante, pVx4, se digirió con XhoI y se ligó con el inserto XhoI/SalI de p343.7.16 de 8,5 kb. Se obtuvo un clon con el gen VH1-18 en la misma orientación que los otros dos genes V. Este clon, designado pVx6, se digirió con NotI y el inserto purificado de 26 kb se coinyectó, junto con el inserto NotI purificado de 80 kb de pHC2 en una proporción molar 1:1, en el pronúcleo de embriones de medio día (C57BL/6J x DBA/2J)F2 como se describe por Hogan et al. (B. Hogan et al. Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual, 2ª edición, 1994, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview NY).

Se establecieron tres líneas independientes de ratones transgénicos que comprenden las secuencias tanto de Vx6 como de HC2 de ratones que se desarrollaron a partir de los embriones inyectados. Estas líneas se designan (HCo12)14881, (HCo12)15083 y (HCo12)15087. Cada una de las tres líneas se crió con ratones que comprenden la mutación CMD descrita en el Ejemplo 2, la mutación JKD (Chen et al. 1993, EMBO J: 12: 811-820) y el transgén (KCo5)9272 (Fishwild et al. 1996, Nature Biotechnology 14: 845-851). Los ratones resultantes expresan los transgenes de la cadena pesada y ligera kappa humana en un fondo homocigoto para disrupción de los loci endógenos de la cadena pesada y ligera kappa de ratón.

Cepas de ratón transgénico adicionales Las cepas de ratones particulares que pueden usarse para generar anticuerpos monoclonales reactivos con IL-4R son la cepa ((CMD)++; (JKD)++; (HCo7)11952+/++; (KCo5)9272+/++) y la cepa ((CMD)++; (JKD)++; (HCo12)15087+/++; (KCo5)9272+/++). Cada una de estas cepas transgénicas es homocigota para disrupciones de los loci endógenos de la cadena pesada (CMD) y la cadena ligera kappa (JKD). Ambas cepas también comprenden un transgén de cadena ligera kappa humana (HCo7), con animales individuales bien hemicigotos u homocigotos para la inserción #11952. Las dos cepas se diferencian en el transgén de cadena pesada humana usado. Los ratones eran hemicigotos u homocigotos bien para el transgén HCo7 o HCo12. La mutación CMD se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2. La generación de ratones (HCo12)15087 se ha descrito anteriormente (en este ejemplo). La mutación JKD (Chen et al. 1993, EMBO J. 12: 811-820) y los ratones (KCo5)9272 (Fishwild et al. 1996, Nature Biotechnology 14: 845-851) y (HCo7)11952, se describen en la Patente U.S. 5.770.429, que se incorpora por referencia por la presente.

Ejemplo 4: Generación de Anticuerpos Monoclonales Anti-IL-4R Humanos

Ratones transgénicos La cepa ((CMD)++; (JKD)++; (HCo7)11952+/++; (KCo5)9272+/++) que es homocigota para disrupciones de los loci endógenos de la cadena pesada (CMD) y la cadena ligera kappa (JKD) (véase el ejemplo 3) se usó para generar anticuerpos monoclonales reactivos con IL-4R. Esta cepa también comprende un transgén de cadena ligera kappa humana (HCo7) con animales individuales bien hemicigotos u homocigotos para la inserción #11952. Los ratones eran hemicigotos u homocigotos para el transgén HCo7. La mutación CMD se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2. La mutación JKD (Chen et al. 1993, EMBO J. 12: 811-820) y los ratones (KCo5)9272 (Fishwild et al. 1996, Nature Biotechnology 14: 845-851) y (HCo7)11952, se describen en la Patente U.S. 5.770.429, que se incorpora por referencia por la presente.

Inmunización. Los ratones transgénicos se inmunizaron inicialmente i.p. con 25 ug de proteína IL-4R en adyuvante (Titermax, disponible en Cytrx Corporation, Norcross, GA). El inmunógeno fue un polipéptido IL-4R humano que comprende el dominio extracelular de la proteína de SEQ ID NO:2. Los ratones inmunizados se reforzaron posteriormente cada 4 semanas i.p. con el inmunógeno IL-4R en adyuvante incompleto de freund. Los animales se mantuvieron en protocolo durante 2 a 5 meses. Antes de la fusión, los animales se reforzaron i.v. en los días -4 y -3 con 5 a 8 ug de inmunógeno.

Fusiones. Las células del bazo de los ratones inmunizados se fusionaron con células de mieloma de ratón NS-1 por procedimientos estándar (Harlow y Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Nueva York; Kennett et al. 1980, Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analysis. Plenum, Nueva York; Oi y Hertzenberg, 1980, Immunoglobulin Producing Hybrid Cell Lines, en Selected Methods in Cellular Immunology, ed. Mishell y Shilgi, p. 357-372. Freeman, San Francisco). Las células se cultivaron en DMEM, 10% FBS, OPI (Sigma O-5003), BME (Gibco 21985-023), 3% Origen Hybridoma Cloning Factor (Igen IG50-0615) y 5% medio condicionado P388d1 (ATCC TIB 63). Se añadió suplemento HAT o HT al medio durante el crecimiento inicial y selección.

Cribado de Hibridomas. Para identificar los hibridomas que secretan anticuerpos humanos frente a IL-4R, se recubrieron placas de ELISA (Nunc MaxiSorp) toda la noche a 4ºC con 100 ul/pocillo de IL-4R humano a 2,0 ug/ml en PBS. Las placas se lavaron con 100 ul/pocillo de PBS-Tween (PBST) que contiene 1% BSA. Se añadieron cincuenta ul de sobrenadante de cultivo celular seguido de 1,0 hora de incubación. Las placas se lavaron y se incubaron durante una hora con 100 ul/pocillo de IgG de cabra anti-humano conjugada con peroxidasa de rábano (Sigma #A-3813, o #A-7164). Las placas se lavaron tres veces en PBS-Tween entre cada etapa.

Los pocillos que se leyeron positivos por ELISA se cribaron para su capacidad de bloquear la unión de IL-4 a IL-4R. Las placas de ELISA se recubrieron toda la noche con un anticuerpo de ratón no neutralizante anti-IL-4R humano M10 a 2 ug/ml. Las placas se lavaron 3X con PBST. Se añadieron 100 ul de IL-4R humano a 10 ng/ml en PBST y se incubó durante 1,0 hora. Las placas se lavaron 4X con PBST y se añadieron 100 ul de muestras de sobrenadante y se incubó durante 1,0 hora. Los pocillos se lavaron 4X con PBST. Se añadieron 5,0 ng/ml de IL-4 biotinilada en PBST y se incubó durante 1,0 hora. Se añadieron 100 ul/pocillo de peroxidasa de rábano poly80 (RDI) a 1:5.000 en

PBST y se incubó durante 45 minutos. Las placas se lavaron 5X con PBST y se añadió un agente colorimétrico (3,3',5,5' tetrametilbencidina, disponible en Kirkegaard y Perry) a 100 ul/pocillo hasta que apareció color. La reacción se paró con 100 ul de ácido fosfórico y las placas se leyeron a 450 nm. La señal ausente o reducida se interpretó como la unión del anticuerpo al receptor de una manera que bloqueaba la unión de IL-4 al receptor. Los pocillos que parecía que bloqueaban la unión se expandieron y se ensayaron para bloqueo de IL-4 e IL-13 en un ensayo de expresión de CD23 (véase el ejemplo 5).

Ejemplo 5: Ensayo para evaluar la actividad bloqueante

Este ensayo se basa en la capacidad tanto de IL-4 como de IL-13 de aumentar la expresión del antígeno de superficie asociado a activación CD23 en células B humanas. Los anticuerpos se ensayan para la capacidad de inhibir la expresión de CD23 inducida por IL-4 y por IL-13.

Los anticuerpos producidos frente a IL-4R humano (huIL-4R) se ensayaron en la forma de sobrenadantes de hibridoma o de proteína purificada. Antes de la adición a los cultivos, los anticuerpos se cambiaron de tampón frente a medio de cultivo (RPMI 1640 más 10% suero fetal bovino inactivado con calor) por centrifugación, usando dispositivos de filtro Centricon (Amicon) con un punto de corte de 10 kDa.

Las células B de sangre periférica humana se purificaron como se ha descrito previamente (Morris et al., *J. Biol. Chem*. 274: 418-423, 1999). Las células B ($3x10^5$/pocillo) en medio de cultivo se pusieron en placas de microtitulación de fondo redondo de 96 pocillos y se preincubaron a temperatura ambiente durante 30 min con los anticuerpos de ensayo a las concentraciones finales indicadas. Se añadió a los cultivos IL-4 o IL-13 humana recombinante a las concentraciones indicadas y las células se cultivaron durante 20-24 horas a 37ºC en una atmósfera humidificada de 5% CO_2. Al final del periodo de cultivo, las células se lavaron una vez en PBS + 0,02% NaN_3 en la placa se cultivo de 96 pocillos y se resuspendieron en tampón de bloqueo (2% suero de conejo normal + 1% suero de cabra normal en PBS + NaN_3). Se añadió anticuerpo monoclonal (Mab) CD23 conjugado con ficoeritrina (PE) o mAb de isotipo control conjugado con PE (ambos de Pharmingen) a las células a una dilución final de 1:10. Las células se incubaron durante 30 minutos a 4ºC, se lavaron x3 en PBS + NaN_3 y se analizaron en un FacScan (Becton Dickinson) para expresión de CD23.

En todos los experimentos, se incluyeron controles negativos que consistieron en células cultivadas con medio de crecimiento de hibridoma o anticuerpo anti-hIL-4R humano no bloqueante del mismo isotipo. Un mAb anti-huIL-4R murino (R&D Systems) que previamente se había mostrado que bloqueaba la unión y función tanto de hIL-4 como de hIL-13 se usó como un control positivo para la neutralización de la inducción de CD23 por IL-4 e IL-13.

Ejemplo 6: Línea Celular de Hibridoma

Una línea celular de hibridoma generada por los procedimientos descritos anteriormente (véase el ejemplo 4) se designa 6-2. El anticuerpo monoclonal anti-IL-4R secretado por este hibridoma es un anticuerpo bloqueante, como se determina en un ensayo de unión en placa convencional y funciona así como un antagonista de IL-4. El anticuerpo monoclonal producido por 6-2 también presenta la capacidad de reducir una actividad biológica inducida por IL-13.

Una realización de la invención está dirigida a una línea celular de hibridoma producida como se ha descrito anteriormente, en la que el hibridoma secreta un MAb de isotipo IgM dirigido frente a IL-4R humano. En la presente memoria, también se proporcionan anticuerpos monoclonales IgG1 obtenidos de los anticuerpos monoclonales IgM.

La secuencia de ADN de la región variable de la cadena ligera de MAb 6-2 se ha determinado y se presenta en SEQ ID NO:5; la secuencia de aminoácidos codificada por ésta se presenta en SEQ ID NO:6. Las regiones determinantes de la complementariedad 1 a 3 (CDR 1-3) se cree que corresponden a los aminoácidos 24-35, 51-57 y 90-97 de SEQ ID NO:6, respectivamente.

La secuencia de ADN de la región variable de la cadena pesada de MAb 6-2 se ha determinado y se presenta en SEQ ID NO:7; la secuencia de aminoácidos codificada por ésta se presenta en SEQ ID NO:8. Las regiones determinantes de la complementariedad 1 a 3 (CDR 1-3) se cree que corresponden a los aminoácidos 31-35, 50-56 y 99-107 de SEQ ID NO:8, respectivamente.

Ejemplo 7: Ensayos para Medir la Pérdida de la Función de Barrera

Un método proporcionado en la presente memoria implica el uso de antagonistas de IL-4 para inhibir el daño en el epitelio inducido por IL-4, incluyendo pero no limitado a epitelio pulmonar o epitelio intestinal. El daño en el epitelio puede resultar en la pérdida de la función de barrera. Se conocen varias técnicas para determinar si una capa de epitelio está intacta. Los siguientes son ejemplos de técnicas que pueden emplearse para evaluar la capacidad de un antagonista de IL-4 para inhibir el daño en el epitelio y la pérdida de la función de barrera epitelial inducidos por IL-4.

Las células que pueden emplearse para preparar modelos *in vitro* de epitelio (barreras epiteliales) son conocidas. Por ejemplo, las células epiteliales pulmonares humanas Calu-3 son adecuadas para usarse en estudios de función

de barrera. Otra línea celular adecuada es la línea celular epitelial intestinal humana designada T84. Las células T84 se cultivan bajo condiciones que resultan en la formación de una monocapa de células epiteliales en un soporte permeable, como se describe en Madara, J. y K. Dharmsathaphorn (*J. Cell Biol*., 101: 2124-2133, 1985), Madara, J. y J. Stafford (*J. Clin. Invest*. 83: 724-727, 1989) y Youakim, A. y M. Ahdieh (*Am. J. Physiol*. 276 (*Gastrointest. Liver Physiol*. 39):G1279-G1288, 1999). Las monocapas cultivadas se ensayan para propiedades tales como resistencia al flujo iónico transepitelial pasivo (indicando dicha resistencia una monocapa intacta que realiza una función de barrera). La monocapa epitelial así generada simula la barrera epitelial intestinal.

Un tipo de ensayo determina si un compuesto marcado radiactivamente particular es capaz de cruzar una monocapa epitelial (por ejemplo, una monocapa generada como se ha descrito anteriormente). El transporte del compuesto marcado radiactivamente a través de la monocapa indica que la barrera es permeable en lugar de intacta. Un procedimiento así es el análisis de flujo de manitol, que evalúa el movimiento de manitol marcado radiactivamente (por ejemplo, ^{3}H manitol) a través de una monocapa (véase Madara y Stafford, *supra*).

Los métodos para la formación de imágenes de una monocapa se identifican en Madara y Stafford, *supra*. Dichos métodos de formación de imágenes son una alternativa para evaluar la condición de una capa epitelial, después de exposición a IL-4 con o sin un antagonista.

Youakim y Ahdieh, *supra*, discuten proteínas que son parte de complejos de "unión firme" en barreras epiteliales intestinales intactas e indican estudios del efecto de IFN-γ en proteínas asociadas con uniones firmes. Se describen otras técnicas para estudiar el efecto de una citoquina en la función de barrera. Por ejemplo, el efecto de una citoquina en la permeabilidad de una monocapa puede evaluarse por medidas de la resistencia eléctrica transepitelial, usando técnicas descritas en la referencia.

La patente U.S. 6.033.688 también describe procedimientos que pueden emplearse en estudios de la permeabilidad de la barrera; véanse especialmente los ejemplos 1 y 4 de la patente. Se cultivaron células epiteliales de tráquea humana bajo condiciones que rindieron una monocapa que presenta resistencia eléctrica transepitelial. La resistencia transepitelial (que indica una barrera intacta) se determinó usando un voltímetro. El efecto de un reactivo particular (HGH) en la monocapa epitelial se evaluó exponiendo la monocapa a HGH y midiendo las actividades de transporte de iones en cámaras Ussing, por métodos estándar (columna 8, líneas 40-56). Se realizaron estudios similares en monocapas que se generaron de células epiteliales bronquiales de un paciente con fibrosis quística humana (ejemplo 4, columna 11).

Usando cualquiera de los procedimientos de ensayo de la función de barrera descritos anteriormente, una monocapa epitelial se expone a IL-4 sola o se expone a IL-4 en presencia de un antagonista de IL-4. Se evalúa así la capacidad del antagonista para inhibir la reducción de la función de barrera inducida por IL-4.

En uno de dichos ensayos, una monocapa de células T84 sirvió como un modelo *in vitro* de una barrera epitelial intestinal, como se ha discutido anteriormente. Se encontró que IL-4 añadida en el lado basolateral de células epiteliales polarizadas reducía la función de barrera un 70% en las 48-72 horas de tratamiento. Cuando un polipéptido receptor de IL-4 se añadió al mismo tiempo que IL-4, la reducción de la función de barrera se evitó y la barrera se mantuvo al mismo nivel que en las células no tratadas (control). En el ensayo se empleó un polipéptido receptor de IL-4 humano soluble.

El procedimiento del ensayo también se realizó en una monocapa obtenida de células epiteliales pulmonares, que sirvió como un modelo *in vitro* de una barrera epitelial pulmonar. Se encontró que IL-4 añadida en el lado basolateral de células epiteliales pulmonares polarizadas reducía la función de barrera un 50% en las 48-72 horas de tratamiento. Cuando un polipéptido receptor de IL-4 se añadió al mismo tiempo que IL-4, la reducción de la función de barrera se evitó y la barrera se mantuvo al mismo nivel que en las células no tratadas (control).

Ejemplo 8: Anticuerpo Monoclonal designado 12B5

Por el siguiente procedimiento se preparó un anticuerpo monoclonal humano dirigido frente al receptor de IL-4 humano. El anticuerpo monoclonal, que se designa 12B5, es un anticuerpo bloqueante que funciona como un antagonista de IL-4 y como un antagonista de IL-13.

El procedimiento empezó con la inmunización de un ratón transgénico con un polipéptido de receptor de IL-4 humano soluble. Se empleó la cepa de ratón ((CMD)++; (JKD)++; (HCo7)11952+/++; (KCo5)9272+/++), descrita en el ejemplo 3 anterior. El antígeno para la inmunización fue IL-4R soluble purificado, que comprende el dominio extracelular del receptor de IL-4 humano (500 ug/ml). El ratón se inmunizó inicialmente con 50 ug de antígeno emulsionado en Adyuvante Completo de Freund, seguido de dos inmunizaciones más con Adyuvante Incompleto de Freund a 50 ug y a 25 ug. La inmunización fue cada dos semanas por inyección intraperitoneal. Se realizó por ELISA una titulación de IgG anti-IL-4R humano específica a partir del suero, ocho días después de la última inyección. Se detectó una buena titulación frente a la diana y el ratón se reforzó IV/IP con 25 ug cada una en el día 3 (es decir, 3 días antes de que el ratón se sacrificara) y 15 ug IV en el día 2.

El ratón se sacrificó y se extrajeron las células del bazo y se fusionaron con la línea celular de mieloma murino P3x63Ag8.653 (ATCC CRL 1580). Se siguió un protocolo convencional de fusión PEG. La fusión se cribó para

HuIgG y HuKappa, seguido de un recribado para gamma y kappa humana específica para IL-4R. Los clones positivos se evaluaron y el clon 12B5 se identificó como un anticuerpo bloqueante. El clon se subclonó; se aisló una línea celular de hibridoma que produce MAb 12B5; y el MAb 12B5 se purificó del sobrenadante.

Se determinó que 12B5 era un anticuerpo IgG1 y que era completamente humano. Los anticuerpos de otras subclases, tales como anticuerpos monoclonales IgG4 o IgM, pueden obtenerse de 12B5. Las técnicas para alterar (cambiar) la subclase/isotipo de un anticuerpo son conocidas. La región constante de 12B5 puede reemplazarse, por ejemplo, con una región constante obtenida de un anticuerpo IgG4 humano. La información de la secuencia para una cadena pesada IgG4 humana se presenta, por ejemplo, en Ellison et al. (*DNA* Vol. 1, no. 1, p. 11-18, 1981) que se incorpora por referencia por la presente en la presente memoria.

El ADN que codifica la región variable de la cadena ligera de MAb 12B5 se aisló y la secuencia de nucleótidos de éste se determinó. La secuencia de ADN para la región variable de la cadena ligera se presenta como SEQ ID NO:9; la secuencia de aminoácidos codificada por ésta se presenta en SEQ ID NO:10. Se cree que las regiones determinantes de la complementariedad 1 a 3 (CDR 1-3) corresponden a los aminoácidos 24-35, 51-57 y 90-99 de SEQ ID NO:10, respectivamente.

El ADN que codifica la región variable de la cadena pesada de MAb 12B5 se aisló y la secuencia de nucleótidos de éste se determinó. La secuencia de ADN para la región variable de la cadena pesada se presenta como SEQ ID NO:11; la secuencia de aminoácidos codificada por éste se presenta en SEQ ID NO:12. Se cree que CDR-1 de la cadena pesada corresponde a los aminoácidos 31-35, CDR-2 a los aminoácidos 50-65; y CDR-3 a los aminoácidos 98-104 de SEQ ID NO:12.

Ejemplo 9: Anticuerpos Monoclonales Adicionales que inhiben tanto IL-4 como IL-13

Se produjeron anticuerpos monoclonales humanos adicionales frente al receptor de IL-4 humano, mediante la inmunización de ratones transgénicos con un polipéptido IL-4R humano soluble. Los ratones transgénicos empleados se seleccionaron de las cepas de ratón transgénico descritas en el ejemplo 3.

Se identificaron y aislaron líneas celulares de hibridoma que secretan anticuerpos monoclonales humanos que se unen específicamente a IL-4R humano y que son capaces de funcionar como antagonistas de IL-4 y antagonistas de IL-13. Los MAb se designaron 27A1, 5A1 y 63. Otro MAb, designado 1B7, se obtuvo de MAb 63 y se diferencia del anticuerpo parental sólo en la cadena ligera. 1B7 retiene la capacidad de unirse a IL-4R y de funcionar como un antagonista de IL-4 y un antagonista de IL-13.

La secuencia de ADN de la región variable de la cadena ligera de MAb 27A1 se presenta en SEQ ID NO:13; y la secuencia de aminoácidos codificada se presenta en SEQ ID NO:14. Las regiones determinantes de la complementariedad 1 a 3 (CDR 1-3) se cree que corresponden a los aminoácidos 24-35, 51-57 y 90-99 de SEQ ID NO:14, respectivamente.

La secuencia de ADN de la región variable de la cadena pesada de MAb 27A1 se presenta como SEQ ID NO:15; y la secuencia de aminoácidos codificada se presenta en SEQ ID NO:16. Las regiones determinantes de la complementariedad 1 a 3 (CDR 1-3) se cree que corresponden a los aminoácidos 31-35, 50-66 y 99-105 de SEQ ID NO:16, respectivamente.

La secuencia de ADN de la región variable de la cadena ligera de MAb 5A1 se presenta en SEQ ID NO:17; y la secuencia de aminoácidos codificada se presenta en SEQ ID NO:18. Las regiones determinantes de la complementariedad 1 a 3 (CDR 1-3) se cree que corresponden a los aminoácidos 24-34, 50-56 y 89-97 de SEQ ID NO:18, respectivamente.

La secuencia de ADN de la región variable de la cadena pesada de MAb 5A1 se presenta como SEQ ID NO:19; y la secuencia de aminoácidos codificada se presenta en SEQ ID NO:20. Las regiones determinantes de la complementariedad 1 a 3 (CDR 1-3) se cree que corresponden a los aminoácidos 31-35, 50-65 y 98-112 de SEQ ID NO:20, respectivamente.

La secuencia de ADN de la región variable de la cadena ligera de MAb 63 se presenta en SEQ ID NO:21; y la secuencia de aminoácidos codificada se presenta en SEQ ID NO:22. Las regiones determinantes de la complementariedad 1 a 3 (CDR 1-3) se cree que corresponden a los aminoácidos 24-34, 50-56 y 89-97 de SEQ ID NO:22, respectivamente.

La secuencia de ADN de la región variable de la cadena pesada de MAb 63 se presenta como SEQ ID NO:23; y la secuencia de aminoácidos codificada se presenta en SEQ ID NO:24. Las regiones determinantes de la complementariedad 1 a 3 (CDR 1-3) se cree que corresponden a los aminoácidos 31-35, 50-66 y 99-106 de SEQ ID NO:24, respectivamente.

La secuencia de ADN de la región variable de la cadena ligera de MAb 1B7 se presenta en SEQ ID NO:25; y la secuencia de aminoácidos codificada se presenta en SEQ ID NO:26. Las regiones determinantes de la

complementariedad 1 a 3 (CDR 1-3) se cree que corresponden a los aminoácidos 24-34, 50-56 y 89-97 de SEQ ID NO:26, respectivamente.

MAb 1B7 se obtuvo de MAb 63 y las cadenas pesadas de los dos MAb son idénticas. Así, la secuencia de ADN para la región variable de la cadena pesada de MAb 1B7 se presenta como SEQ ID NO:23; y la secuencia de aminoácidos codificada se presenta en SEQ ID NO:24. Las regiones determinantes de la complementariedad 1 a 3 (CDR 1-3) se cree que corresponden a los aminoácidos 31-35, 50-66 y 99-106 de SEQ ID NO:24, respectivamente.

Listado de secuencias

<110> Pluenneke, John

<120> USO DE ANTAGONISTAS DE INTERLEUQUINA-4 Y COMPOSICIONES DE ÉSTOS

<130> 3005-WO

<140> --para asignarse--
<141> 25-05-2001

<150> 09/579,808
<151> 26-05-2000

<150> 09/665,343
<151> 19-09-2000

<150> 09/785,934
<151> 15-02-2001

<150> 09/847,816
<151> 01-05-2001

<160> 26

<170> PatentIn versión 3.0

<210> 1
<211> 2478
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2475)

<220>
<221> mat-péptido
<222> (76)..()

<400> 1

```
atg ggg tgg ctt tgc tct ggg ctc ctg ttc cct gtg agc tgc ctg gtc       48
Met Gly Trp Leu Cys Ser Gly Leu Leu Phe Pro Val Ser Cys Leu Val
-25                 -20                 -15                 -10

ctg ctg cag gtg gca agc tct ggg aac atg aag gtc ttg cag gag ccc       96
Leu Leu Gln Val Ala Ser Ser Gly Asn Met Lys Val Leu Gln Glu Pro
                -5              -1  1               5

acc tgc gtc tcc gac tac atg agc atc tct act tgc gag tgg aag atg      144
Thr Cys Val Ser Asp Tyr Met Ser Ile Ser Thr Cys Glu Trp Lys Met
        10                  15                  20

aat ggt ccc acc aat tgc agc acc gag ctc cgc ctg ttg tac cag ctg      192
Asn Gly Pro Thr Asn Cys Ser Thr Glu Leu Arg Leu Leu Tyr Gln Leu
    25                  30                  35

gtt ttt ctg ctc tcc gaa gcc cac acg tgt atc cct gag aac aac gga      240
Val Phe Leu Leu Ser Glu Ala His Thr Cys Ile Pro Glu Asn Asn Gly
40                  45                  50                  55
```

```
ggc gcg ggg tgc gtg tgc cac ctg ctc atg gat gac gtg gtc agt gcg      288
Gly Ala Gly Cys Val Cys His Leu Leu Met Asp Asp Val Val Ser Ala
                60                  65                  70

gat aac tat aca ctg gac ctg tgg gct ggg cag cag ctg ctg tgg aag      336
Asp Asn Tyr Thr Leu Asp Leu Trp Ala Gly Gln Gln Leu Leu Trp Lys
            75                  80                  85

ggc tcc ttc aag ccc agc gag cat gtg aaa ccc agg gcc cca gga aac      384
Gly Ser Phe Lys Pro Ser Glu His Val Lys Pro Arg Ala Pro Gly Asn
        90                  95                  100

ctg aca gtt cac acc aat gtc tcc gac act ctg ctg ctg acc tgg agc      432
Leu Thr Val His Thr Asn Val Ser Asp Thr Leu Leu Leu Thr Trp Ser
    105                 110                 115

aac ccg tat ccc cct gac aat tac ctg tat aat cat ctc acc tat gca      480
Asn Pro Tyr Pro Pro Asp Asn Tyr Leu Tyr Asn His Leu Thr Tyr Ala
120                 125                 130                 135

gtc aac att tgg agt gaa aac gac ccg gca gat ttc aga atc tat aac      528
Val Asn Ile Trp Ser Glu Asn Asp Pro Ala Asp Phe Arg Ile Tyr Asn
                140                 145                 150

gtg acc tac cta gaa ccc tcc ctc cgc atc gca gcc agc acc ctg aag      576
Val Thr Tyr Leu Glu Pro Ser Leu Arg Ile Ala Ala Ser Thr Leu Lys
            155                 160                 165

tct ggg att tcc tac agg gca cgg gtg agg gcc tgg gct cag tgc tat      624
Ser Gly Ile Ser Tyr Arg Ala Arg Val Arg Ala Trp Ala Gln Cys Tyr
        170                 175                 180

aac acc acc tgg agt gag tgg agc ccc agc acc aag tgg cac aac tcc      672
Asn Thr Thr Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Thr Lys Trp His Asn Ser
    185                 190                 195

tac agg gag ccc ttc gag cag cac ctc ctg ctg ggc gtc agc gtt tcc      720
Tyr Arg Glu Pro Phe Glu Gln His Leu Leu Leu Gly Val Ser Val Ser
200                 205                 210                 215

tgc att gtc atc ctg gcc gtc tgc ctg ttg tgc tat gtc agc atc acc      768
Cys Ile Val Ile Leu Ala Val Cys Leu Leu Cys Tyr Val Ser Ile Thr
                220                 225                 230

aag att aag aaa gaa tgg tgg gat cag att ccc aac cca gcc cgc agc      816
Lys Ile Lys Lys Glu Trp Trp Asp Gln Ile Pro Asn Pro Ala Arg Ser
            235                 240                 245

cgc ctc gtg gct ata ata atc cag gat gct cag ggg tca cag tgg gag      864
Arg Leu Val Ala Ile Ile Ile Gln Asp Ala Gln Gly Ser Gln Trp Glu
        250                 255                 260

aag cgg tcc cga ggc cag gaa cca gcc aag tgc cca cac tgg aag aat      912
Lys Arg Ser Arg Gly Gln Glu Pro Ala Lys Cys Pro His Trp Lys Asn
    265                 270                 275

tgt ctt acc aag ctc ttg ccc tgt ttt ctg gag cac aac atg aaa agg      960
Cys Leu Thr Lys Leu Leu Pro Cys Phe Leu Glu His Asn Met Lys Arg
280                 285                 290                 295
```

```
gat gaa gat cct cac aag gct gcc aaa gag atg cct ttc cag ggc tct     1008
Asp Glu Asp Pro His Lys Ala Ala Lys Glu Met Pro Phe Gln Gly Ser
                300                 305                 310

gga aaa tca gca tgg tgc cca gtg gag atc agc aag aca gtc ctc tgg     1056
Gly Lys Ser Ala Trp Cys Pro Val Glu Ile Ser Lys Thr Val Leu Trp
            315                 320                 325

cca gag agc atc agc gtg gtg cga tgt gtg gag ttg ttt gag gcc ccg     1104
Pro Glu Ser Ile Ser Val Val Arg Cys Val Glu Leu Phe Glu Ala Pro
        330                 335                 340

gtg gag tgt gag gag gag gag gag gta gag gaa gaa aaa ggg agc ttc     1152
Val Glu Cys Glu Glu Glu Glu Glu Val Glu Glu Glu Lys Gly Ser Phe
    345                 350                 355

tgt gca tcg cct gag agc agc agg gat gac ttc cag gag gga agg gag     1200
Cys Ala Ser Pro Glu Ser Ser Arg Asp Asp Phe Gln Glu Gly Arg Glu
360                 365                 370                 375

ggc att gtg gcc cgg cta aca gag agc ctg ttc ctg gac ctg ctc gga     1248
Gly Ile Val Ala Arg Leu Thr Glu Ser Leu Phe Leu Asp Leu Leu Gly
                380                 385                 390

gag gag aat ggg ggc ttt tgc cag cag gac atg ggg gag tca tgc ctt     1296
Glu Glu Asn Gly Gly Phe Cys Gln Gln Asp Met Gly Glu Ser Cys Leu
            395                 400                 405

ctt cca cct tcg gga agt acg agt gct cac atg ccc tgg gat gag ttc     1344
Leu Pro Pro Ser Gly Ser Thr Ser Ala His Met Pro Trp Asp Glu Phe
        410                 415                 420

cca agt gca ggg ccc aag gag gca cct ccc tgg ggc aag gag cag cct     1392
Pro Ser Ala Gly Pro Lys Glu Ala Pro Pro Trp Gly Lys Glu Gln Pro
    425                 430                 435

ctc cac ctg gag cca agt cct cct gcc agc ccg acc cag agt cca gac     1440
Leu His Leu Glu Pro Ser Pro Pro Ala Ser Pro Thr Gln Ser Pro Asp
440                 445                 450                 455

aac ctg act tgc aca gag acg ccc ctc gtc atc gca ggc aac cct gct     1488
Asn Leu Thr Cys Thr Glu Thr Pro Leu Val Ile Ala Gly Asn Pro Ala
                460                 465                 470

tac cgc agc ttc agc aac tcc ctg agc cag tca ccg tgt ccc aga gag     1536
Tyr Arg Ser Phe Ser Asn Ser Leu Ser Gln Ser Pro Cys Pro Arg Glu
            475                 480                 485

ctg ggt cca gac cca ctg ctg gcc aga cac ctg gag gaa gta gaa ccc     1584
Leu Gly Pro Asp Pro Leu Leu Ala Arg His Leu Glu Glu Val Glu Pro
        490                 495                 500

gag atg ccc tgt gtc ccc cag ctc tct gag cca acc act gtg ccc caa     1632
Glu Met Pro Cys Val Pro Gln Leu Ser Glu Pro Thr Thr Val Pro Gln
    505                 510                 515

cct gag cca gaa acc tgg gag cag atc ctc cgc cga aat gtc ctc cag     1680
Pro Glu Pro Glu Thr Trp Glu Gln Ile Leu Arg Arg Asn Val Leu Gln
520                 525                 530                 535
```

```
cat ggg gca gct gca gcc ccc gtc tcg gcc ccc acc agt ggc tat cag     1728
His Gly Ala Ala Ala Ala Pro Val Ser Ala Pro Thr Ser Gly Tyr Gln
                540                 545                 550

gag ttt gta cat gcg gtg gag cag ggt ggc acc cag gcc agt gcg gtg     1776
Glu Phe Val His Ala Val Glu Gln Gly Gly Thr Gln Ala Ser Ala Val
            555                 560                 565

gtg ggc ttg ggt ccc cca gga gag gct ggt tac aag gcc ttc tca agc     1824
Val Gly Leu Gly Pro Pro Gly Glu Ala Gly Tyr Lys Ala Phe Ser Ser
        570                 575                 580

ctg ctt gcc agc agt gct gtg tcc cca gag aaa tgt ggg ttt ggg gct     1872
Leu Leu Ala Ser Ser Ala Val Ser Pro Glu Lys Cys Gly Phe Gly Ala
    585                 590                 595

agc agt ggg gaa gag ggg tat aag cct ttc caa gac ctc att cct ggc     1920
Ser Ser Gly Glu Glu Gly Tyr Lys Pro Phe Gln Asp Leu Ile Pro Gly
600                 605                 610                 615

tgc cct ggg gac cct gcc cca gtc cct gtc ccc ttg ttc acc ttt gga     1968
Cys Pro Gly Asp Pro Ala Pro Val Pro Val Pro Leu Phe Thr Phe Gly
                620                 625                 630

ctg gac agg gag cca cct cgc agt ccg cag agc tca cat ctc cca agc     2016
Leu Asp Arg Glu Pro Pro Arg Ser Pro Gln Ser Ser His Leu Pro Ser
            635                 640                 645

agc tcc cca gag cac ctg ggt ctg gag ccg ggg gaa aag gta gag gac     2064
Ser Ser Pro Glu His Leu Gly Leu Glu Pro Gly Glu Lys Val Glu Asp
        650                 655                 660

atg cca aag ccc cca ctt ccc cag gag cag gcc aca gac ccc ctt gtg     2112
Met Pro Lys Pro Pro Leu Pro Gln Glu Gln Ala Thr Asp Pro Leu Val
    665                 670                 675

gac agc ctg ggc agt ggc att gtc tac tca gcc ctt acc tgc cac ctg     2160
Asp Ser Leu Gly Ser Gly Ile Val Tyr Ser Ala Leu Thr Cys His Leu
680                 685                 690                 695

tgc ggc cac ctg aaa cag tgt cat ggc cag gag gat ggt ggc cag acc     2208
Cys Gly His Leu Lys Gln Cys His Gly Gln Glu Asp Gly Gly Gln Thr
                700                 705                 710

cct gtc atg gcc agt cct tgc tgt ggc tgc tgc tgt gga gac agg tcc     2256
Pro Val Met Ala Ser Pro Cys Cys Gly Cys Cys Cys Gly Asp Arg Ser
            715                 720                 725

tcg ccc cct aca acc ccc ctg agg gcc cca gac ccc tct cca ggt ggg     2304
Ser Pro Pro Thr Thr Pro Leu Arg Ala Pro Asp Pro Ser Pro Gly Gly
        730                 735                 740

gtt cca ctg gag gcc agt ctg tgt ccg gcc tcc ctg gca ccc tcg ggc     2352
Val Pro Leu Glu Ala Ser Leu Cys Pro Ala Ser Leu Ala Pro Ser Gly
    745                 750                 755

atc tca gag aag agt aaa tcc tca tca tcc ttc cat cct gcc cct ggc     2400
Ile Ser Glu Lys Ser Lys Ser Ser Ser Ser Phe His Pro Ala Pro Gly
760                 765                 770                 775
```

```
aat gct cag agc tca agc cag acc ccc aaa atc gtg aac ttt gtc tcc      2448
Asn Ala Gln Ser Ser Ser Gln Thr Pro Lys Ile Val Asn Phe Val Ser
                780                 785                 790

gtg gga ccc aca tac atg agg gtc tct tat                           2478
Val Gly Pro Thr Tyr Met Arg Val Ser
            795                 800
```

<210> 2
<211> 825
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

```
Met Gly Trp Leu Cys Ser Gly Leu Leu Phe Pro Val Ser Cys Leu Val
-25                 -20                 -15                 -10

Leu Leu Gln Val Ala Ser Ser Gly Asn Met Lys Val Leu Gln Glu Pro
                -5                  -1  1                   5

Thr Cys Val Ser Asp Tyr Met Ser Ile Ser Thr Cys Glu Trp Lys Met
        10                  15                  20

Asn Gly Pro Thr Asn Cys Ser Thr Glu Leu Arg Leu Leu Tyr Gln Leu
    25                  30                  35

Val Phe Leu Leu Ser Glu Ala His Thr Cys Ile Pro Glu Asn Asn Gly
40                  45                  50                  55

Gly Ala Gly Cys Val Cys His Leu Leu Met Asp Asp Val Val Ser Ala
                60                  65                  70

Asp Asn Tyr Thr Leu Asp Leu Trp Ala Gly Gln Gln Leu Leu Trp Lys
            75                  80                  85

Gly Ser Phe Lys Pro Ser Glu His Val Lys Pro Arg Ala Pro Gly Asn
        90                  95                  100

Leu Thr Val His Thr Asn Val Ser Asp Thr Leu Leu Leu Thr Trp Ser
    105                 110                 115

Asn Pro Tyr Pro Pro Asp Asn Tyr Leu Tyr Asn His Leu Thr Tyr Ala
120                 125                 130                 135

Val Asn Ile Trp Ser Glu Asn Asp Pro Ala Asp Phe Arg Ile Tyr Asn
                140                 145                 150
```

```
Val Thr Tyr Leu Glu Pro Ser Leu Arg Ile Ala Ala Ser Thr Leu Lys
            155                 160                 165

Ser Gly Ile Ser Tyr Arg Ala Arg Val Arg Ala Trp Ala Gln Cys Tyr
        170                 175                 180

Asn Thr Thr Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Thr Lys Trp His Asn Ser
    185                 190                 195

Tyr Arg Glu Pro Phe Glu Gln His Leu Leu Leu Gly Val Ser Val Ser
200                 205                 210                 215

Cys Ile Val Ile Leu Ala Val Cys Leu Leu Cys Tyr Val Ser Ile Thr
                220                 225                 230

Lys Ile Lys Lys Glu Trp Trp Asp Gln Ile Pro Asn Pro Ala Arg Ser
            235                 240                 245

Arg Leu Val Ala Ile Ile Ile Gln Asp Ala Gln Gly Ser Gln Trp Glu
        250                 255                 260

Lys Arg Ser Arg Gly Gln Glu Pro Ala Lys Cys Pro His Trp Lys Asn
    265                 270                 275

Cys Leu Thr Lys Leu Leu Pro Cys Phe Leu Glu His Asn Met Lys Arg
280                 285                 290                 295

Asp Glu Asp Pro His Lys Ala Ala Lys Glu Met Pro Phe Gln Gly Ser
                300                 305                 310

Gly Lys Ser Ala Trp Cys Pro Val Glu Ile Ser Lys Thr Val Leu Trp
            315                 320                 325

Pro Glu Ser Ile Ser Val Val Arg Cys Val Glu Leu Phe Glu Ala Pro
        330                 335                 340

Val Glu Cys Glu Glu Glu Glu Glu Val Glu Glu Glu Lys Gly Ser Phe
    345                 350                 355

Cys Ala Ser Pro Glu Ser Ser Arg Asp Asp Phe Gln Glu Gly Arg Glu
360                 365                 370                 375

Gly Ile Val Ala Arg Leu Thr Glu Ser Leu Phe Leu Asp Leu Leu Gly
                380                 385                 390
```

Glu Glu Asn Gly Gly Phe Cys Gln Gln Asp Met Gly Glu Ser Cys Leu
395 400 405

Leu Pro Pro Ser Gly Ser Thr Ser Ala His Met Pro Trp Asp Glu Phe
410 415 420

Pro Ser Ala Gly Pro Lys Glu Ala Pro Pro Trp Gly Lys Glu Gln Pro
425 430 435

Leu His Leu Glu Pro Ser Pro Pro Ala Ser Pro Thr Gln Ser Pro Asp
440 445 450 455

Asn Leu Thr Cys Thr Glu Thr Pro Leu Val Ile Ala Gly Asn Pro Ala
460 465 470

Tyr Arg Ser Phe Ser Asn Ser Leu Ser Gln Ser Pro Cys Pro Arg Glu
475 480 485

Leu Gly Pro Asp Pro Leu Leu Ala Arg His Leu Glu Glu Val Glu Pro
490 495 500

Glu Met Pro Cys Val Pro Gln Leu Ser Glu Pro Thr Thr Val Pro Gln
505 510 515

Pro Glu Pro Glu Thr Trp Glu Gln Ile Leu Arg Arg Asn Val Leu Gln
520 525 530 535

His Gly Ala Ala Ala Ala Pro Val Ser Ala Pro Thr Ser Gly Tyr Gln
540 545 550

Glu Phe Val His Ala Val Glu Gln Gly Gly Thr Gln Ala Ser Ala Val
555 560 565

Val Gly Leu Gly Pro Pro Gly Glu Ala Gly Tyr Lys Ala Phe Ser Ser
570 575 580

Leu Leu Ala Ser Ser Ala Val Ser Pro Glu Lys Cys Gly Phe Gly Ala
585 590 595

Ser Ser Gly Glu Glu Gly Tyr Lys Pro Phe Gln Asp Leu Ile Pro Gly
600 605 610 615

Cys Pro Gly Asp Pro Ala Pro Val Pro Val Pro Leu Phe Thr Phe Gly
620 625 630

```
Leu Asp Arg Glu Pro Pro Arg Ser Pro Gln Ser Ser His Leu Pro Ser
            635                 640                 645

Ser Ser Pro Glu His Leu Gly Leu Glu Pro Gly Glu Lys Val Glu Asp
        650                 655                 660

Met Pro Lys Pro Pro Leu Pro Gln Glu Gln Ala Thr Asp Pro Leu Val
    665                 670                 675

Asp Ser Leu Gly Ser Gly Ile Val Tyr Ser Ala Leu Thr Cys His Leu
680                 685                 690                 695

Cys Gly His Leu Lys Gln Cys His Gly Gln Glu Asp Gly Gly Gln Thr
                700                 705                 710

Pro Val Met Ala Ser Pro Cys Cys Gly Cys Cys Cys Gly Asp Arg Ser
            715                 720                 725

Ser Pro Pro Thr Thr Pro Leu Arg Ala Pro Asp Pro Ser Pro Gly Gly
        730                 735                 740

Val Pro Leu Glu Ala Ser Leu Cys Pro Ala Ser Leu Ala Pro Ser Gly
    745                 750                 755

Ile Ser Glu Lys Ser Lys Ser Ser Ser Ser Phe His Pro Ala Pro Gly
760                 765                 770                 775

Asn Ala Gln Ser Ser Ser Gln Thr Pro Lys Ile Val Asn Phe Val Ser
                780                 785                 790

Val Gly Pro Thr Tyr Met Arg Val Ser
            795                 800
```

<210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido FLAG

<400> 3

```
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1               5
```

<210> 4
<211> 3159
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> "Vector de clonación pGP1k"

<400> 4

aattagcggc cgctgtcgac aagcttcgaa ttcagtatcg atgtggggta cctactgtcc 60

cgggattgcg gatccgcgat gatatcgttg atcctcgagt gcggccgcag tatgcaaaaa 120

aaagcccgct cattaggcgg gctcttggca gaacatatcc atcgcgtccg ccatctccag 180

cagccgcacg cggcgcatct cgggcagcgt tgggtcctgg ccacgggtgc gcatgatcgt 240

gctcctgtcg ttgaggaccc ggctaggctg gcggggttgc cttactggtt agcagaatga 300

atcaccgata cgcgagcgaa cgtgaagcga ctgctgctgc aaaacgtctg cgacctgagc 360

aacaacatga atggtcttcg gtttccgtgt ttcgtaaagt ctggaaacgc ggaagtcagc 420

gccctgcacc attatgttcc ggatctgcat cgcaggatgc tgctggctac cctgtggaac 480

acctacatct gtattaacga agcgctggca ttgaccctga gtgatttttc tctggtcccg 540

ccgcatccat accgccagtt gtttaccctc acaacgttcc agtaaccggg catgttcatc 600

atcagtaacc cgtatcgtga gcatcctctc tcgtttcatc ggtatcatta cccccatgaa 660

cagaaattcc cccttacacg gaggcatcaa gtgaccaaac aggaaaaaac cgcccttaac 720

atggcccgct ttatcagaag ccagacatta acgcttctgg agaaactcaa cgagctggac 780

gcggatgaac aggcagacat ctgtgaatcg cttcacgacc acgctgatga gctttaccgc 840

agctgcctcg cgcgtttcgg tgatgacggt gaaaacctct gacacatgca gctcccggag 900

acggtcacag cttgtctgta agcggatgcc gggagcagac aagcccgtca gggcgcgtca 960

gcgggtgttg gcgggtgtcg gggcgcagcc atgacccagt cacgtagcga tagcggagtg 1020

tatactggct taactatgcg gcatcagagc agattgtact gagagtgcac catatgcggt 1080

gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat caggcgctct tccgcttcct 1140

cgctcactga ctcgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa 1200

aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa 1260

aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcgttt ttccataggc 1320

tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaacccga 1380

caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc 1440

cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt 1500

ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct 1560

gtgtgcacga accccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg 1620

agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccaggcgc gccttggcct 1680

aagaggccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct 1740

tgaagtggtg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc 1800

tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg 1860

ctggtagcgg tggtttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc 1920

aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt 1980

aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa 2040

aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat 2100

gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc atagttgcct 2160

gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggctt accatctggc cccagtgctg 2220

caatgatacc gcgagaccca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag 2280

ccggaagggc cgagcgcaga agtggtcctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta 2340

attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgcgc aacgttgttg 2400

ccattgctgc aggcatcgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg 2460

gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat cccccatgtt gtgcaaaaaa gcggttagct 2520

ccttcggtcc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggtta 2580

tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg 2640

gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc 2700

cggcgtcaac acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg 2760

gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga 2820

tgtaacccac tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg 2880

ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat 2940

gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc 3000

tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca 3060

catttccccg aaaagtgcca cctgacgtct aagaaaccat tattatcatg acattaacct 3120

ataaaaatag gcgtatcacg aggccctttc gtcttcaag 3159

<210> 5
<211> 321
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(321)

<400> 5

```
gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca ggg       48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc acc agc       96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser
            20                  25                  30

tac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc      144
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
        35                  40                  45

atc tat ggt gca tcc agc agg gcc act ggc atc cca gac agg ttc agt      192
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
    50                  55                  60

ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag      240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65                  70                  75                  80

cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag tat ggt agt tca ccg      288
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
                85                  90                  95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa                         321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 6
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 7
<211> 354
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(354)

<400> 7

```
cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg        48
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1               5                   10                  15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc gcc ttc agt agc tat        96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

gct att cag tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg       144
Ala Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

gca gtt ata tca tat gat gga agc aag aaa tac tat gca gac tcc gtg       192
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aat acg ctg tat       240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

ttg caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg tat tac tgt       288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gcg aga gag ggg aga cgt ggg tcg ttt gac tac tgg ggc cag gga acc       336
Ala Arg Glu Gly Arg Arg Gly Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

ctg gtc acc gtc tcc tca                                              354
Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 8
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Gly Arg Arg Gly Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 9
<211> 327
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(327)

<400> 9

gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc agc 96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

tac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc 144
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

atc ttt ggt gca tcc agc agg gcc act ggc atc cca gac agg ttc agt 192
Ile Phe Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag 240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag tat ggt agc tca cct 288
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

ccg tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 327
Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 10
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

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

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

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

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

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

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

Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 11
<211> 345
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(345)

<400> 11

```
gag gtt cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ttg gta cat cct ggg ggg       48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca ggc tct gga ttc acc ttc agt aga aat       96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn
            20                  25                  30

gct atg ttc tgg gtt cgc cag gct cca gga aaa ggt ctg gag tgg gta      144
Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
```

```
tca ggt att ggt act ggt ggt gcc aca aac tat gca gac tcc gtg aag      192
Ser Gly Ile Gly Thr Gly Gly Ala Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60

ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac tcc ttg tat ctt      240
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65                  70                  75                  80

caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac atg gct gtg tat tac tgt gca      288
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

aga ggg agg tac tac ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc      336
Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
            100                 105                 110

gtc tcc tca                                                         345
Val Ser Ser
        115
```

<210> 12
<211> 115
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

```
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

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

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

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

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

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

Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
            100                 105                 110

Val Ser Ser
        115
```

<210> 13
<211> 327
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(327)

<400> 13

```
gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca ggg        48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc agc        96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
            20                  25                  30

tac tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc       144
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
        35                  40                  45

atc tat ggt gca tcc agc agg gcc act ggc atc cca gac agg ttc agt       192
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
    50                  55                  60

ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag       240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65                  70                  75                  80

cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag tat ggt agc tca cct       288
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
                85                  90                  95

ccg tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa                   327
Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 14
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

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

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

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

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

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

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

Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 15
<211> 348
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(348)

<400> 15

cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg 48
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt tca gcg tct gga ttc acc ttc agt aga tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc agg ggg ctg gag tgg gtg 144
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

gca att ata tgg ttt gaa gga aat aat caa tac tat gca gac tcc gtg 192
Ala Ile Ile Trp Phe Glu Gly Asn Asn Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

aag ggc cga ttc acc gtc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ctg gaa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcg aga ggg aag tac tac ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc 336
Ala Arg Gly Lys Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

acc gtc tcc tca 348
Thr Val Ser Ser
115

<210> 16
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Lys Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 17
<211> 321
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(321)

<400> 17

```
gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg      48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac      96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc     144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

tat cat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc     192
Tyr His Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
```

```
agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65                  70                  75                  80

gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg cct ctc      288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
                85                  90                  95

act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa                         321
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 18
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 19
<211> 369
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(369)

<400> 19

```
gag gtg caa ctg gtg cag tct ggg gga ggc ttg gta cat cct ggg ggg        48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

tcc ctg aga ctc acc tgt gca ggc tct gga ttc acc ttc agt aac ttt        96
Ser Leu Arg Leu Thr Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
            20                  25                  30

gtt atg cac tgg gtt cgc cag act cca gga caa ggt ctg gag tgg gtt       144
Val Met His Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

tca gct att ggt act ggt ggt ggc aca tac tat gca gac tcc gtg aag       192
Ser Ala Ile Gly Thr Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60

ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag agc tcc tta tat ctt       240
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr Leu
65                  70                  75                  80

caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac atg gct gtg tat tac tgt gca       288
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

aga gat cgg cct atg gtt cgg gga gtc att ata gac tac ttt gac tac       336
Arg Asp Arg Pro Met Val Arg Gly Val Ile Ile Asp Tyr Phe Asp Tyr
            100                 105                 110

tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca                          369
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 20
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

```
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

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

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

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

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

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

Arg Asp Arg Pro Met Val Arg Gly Val Ile Ile Asp Tyr Phe Asp Tyr
            100                 105                 110

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

<210> 21
<211> 321
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(321)

<400> 21

```
gac atc cag atg acc cag tct cca tct tcc gtg tct gca tct gta gga      48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc acc tgg      96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Thr Trp
            20                  25                  30

tta gcc tgg tat cag cat aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc     144
Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

tat gtt gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc     192
Tyr Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct     240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

gaa gat ttt gca act tac tat tgt caa cag gct aat agt ttc cca ttc     288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Phe
                85                  90                  95

act ttc ggc cct ggg acc aaa gtg gat atc aaa                         321
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
            100                 105
```

<210> 22
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Thr Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

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

<210> 23
<211> 351
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(351)

<400> 23

gag gtg cag gtg ttg gag tcg ggg gga aac ttg gta cag cct ggg ggg 48
Glu Val Gln Val Leu Glu Ser Gly Gly Asn Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt agc agc tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

gcc atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

tct tct att act ggt agt ggg ggt agc aca tac tac gca gac tcc gtg 192
Ser Ser Ile Thr Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc att ttt tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Phe Tyr Cys
85 90 95

gcg aaa gat aac cgg gga ttc ttt cac tat tgg ggc cag gga acc ctg 336
Ala Lys Asp Asn Arg Gly Phe Phe His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

gtc acc gtc tcc tca 351
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 24
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp Asn Arg Gly Phe Phe His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 25
<211> 321
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(321)

<400> 25

gaa att gtg ttg aca cag tct cca tct tcc gtg tct gca tct gta gga 48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

```
gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc aat cgg       96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Arg
            20                  25                  30

tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gga aaa gcc cct aaa ctc ctc atc      144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

tat att gca tcc att ttg caa agg ggg gtc cca tca aga ttc agc ggc      192
Tyr Ile Ala Ser Ile Leu Gln Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc acc agg ctg cag cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Arg Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

gaa gat ttt gca acc tac tat tgt caa cag gca aac agt ttc cca ttc      288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Phe
                85                  90                  95

act ttc ggc cct ggg acc aaa gtg gat atc aaa                         321
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
            100                 105
```

<210> 26
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

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

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

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

Tyr Ile Ala Ser Ile Leu Gln Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

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

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal humano capaz de inhibir una actividad biológica inducida por IL-4 que compite con un anticuerpo de referencia para la unión a una célula que expresa el receptor de IL-4 (IL-4R) humano, en el que:

a) la cadena ligera del anticuerpo de referencia comprende la secuencia de SEQ ID NO:10 y la cadena pesada del anticuerpo de referencia comprende la secuencia de SEQ ID NO:12; o

b) la cadena ligera del anticuerpo de referencia comprende la secuencia de SEQ ID NO:14 y la cadena pesada del anticuerpo de referencia comprende la secuencia de SEQ ID NO:16; o

c) la cadena ligera del anticuerpo de referencia comprende la secuencia de SEQ ID NO:18 y la cadena pesada del anticuerpo de referencia comprende la secuencia de SEQ ID NO:20; o

d) la cadena ligera del anticuerpo de referencia comprende la secuencia de SEQ ID NO:22 y la cadena pesada del anticuerpo de referencia comprende la secuencia de SEQ ID NO:24.

2. Un anticuerpo según se reivindica en la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es capaz además de inhibir una actividad biológica inducida por IL-13.

3. El anticuerpo según se reivindica en la reivindicación 1 o reivindicación 2 para uso en un método para tratar dermatitis, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, o asma.

4. El anticuerpo para uso según se reivindica en la reivindicación 3, en el que dicho anticuerpo está en la forma de una composición que comprende además un diluyente, excipiente, o vehículo.

5. El anticuerpo según se reivindica en la reivindicación 1 o reivindicación 2, o para uso según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, en el que el IL-4R comprende los aminoácidos 1 a 197 de SEQ ID NO:2.

6. Un ácido nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo según se reivindica en la reivindicación 1 o reivindicación 2.

7. Un ácido nucleico que codifica la cadena pesada del anticuerpo según se reivindica en la reivindicación 1 o reivindicación 2.

8. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 6 o reivindicación 7.

FIGURA 1A

```
ATG GGG TGG CTT TGC TCT GGG CTC CTG TTC CCT GTG AGC TGC CTG -31
Met Gly Trp Leu Cys Ser Gly Leu Leu Phe Pro Val Ser Cys Leu -11

GTC CTG CTG CAG GTG GCA AGC TCT GGG AAC ATG AAG GTC TTG CAG  15
Val Leu Leu Gln Val Ala Ser Ser Gly Asn Met Lys Val Leu Gln   5

GAG CCC ACC TGC GTC TCC GAC TAC ATG AGC ATC TCT ACT TGC GAG  60
Glu Pro Thr Cys Val Ser Asp Tyr Met Ser Ile Ser Thr Cys Glu  20

TGG AAG ATG AAT GGT CCC ACC AAT TGC AGC ACC GAG CTC CGC CTG 105
Trp Lys Met Asn Gly Pro Thr Asn Cys Ser Thr Glu Leu Arg Leu  35

TTG TAC CAG CTG GTT TTT CTG CTC TCC GAA GCC CAC ACG TGT ATC 150
Leu Tyr Gln Leu Val Phe Leu Leu Ser Glu Ala His Thr Cys Ile  50

CCT GAG AAC AAC GGA GGC GCG GGG TGC GTG TGC CAC CTG CTC ATG 195
Pro Glu Asn Asn Gly Gly Ala Gly Cys Val Cys His Leu Leu Met  65

GAT GAC GTG GTC AGT GCG GAT AAC TAT ACA CTG GAC CTG TGG GCT 240
Asp Asp Val Val Ser Ala Asp Asn Tyr Thr Leu Asp Leu Trp Ala  80

GGG CAG CAG CTG CTG TGG AAG GGC TCC TTC AAG CCC AGC GAG CAT 285
Gly Gln Gln Leu Leu Trp Lys Gly Ser Phe Lys Pro Ser Glu His  95

GTG AAA CCC AGG GCC CCA GGA AAC CTG ACA GTT CAC ACC AAT GTC 330
Val Lys Pro Arg Ala Pro Gly Asn Leu Thr Val His Thr Asn Val 110

TCC GAC ACT CTG CTG CTG ACC TGG AGC AAC CCG TAT CCC CCT GAC 375
Ser Asp Thr Leu Leu Leu Thr Trp Ser Asn Pro Tyr Pro Pro Asp 125

AAT TAC CTG TAT AAT CAT CTC ACC TAT GCA GTC AAC ATT TGG AGT 420
Asn Tyr Leu Tyr Asn His Leu Thr Tyr Ala Val Asn Ile Trp Ser 140

GAA AAC GAC CCG GCA GAT TTC AGA ATC TAT AAC GTG ACC TAC CTA 465
Glu Asn Asp Pro Ala Asp Phe Arg Ile Tyr Asn Val Thr Tyr Leu 155

GAA CCC TCC CTC CGC ATC GCA GCC AGC ACC CTG AAG TCT GGG ATT 510
Glu Pro Ser Leu Arg Ile Ala Ala Ser Thr Leu Lys Ser Gly Ile 170

TCC TAC AGG GCA CGG GTG AGG GCC TGG GCT CAG TGC TAT AAC ACC 555
Ser Tyr Arg Ala Arg Val Arg Ala Trp Ala Gln Cys Tyr Asn Thr 185

ACC TGG AGT GAG TGG AGC CCC AGC ACC AAG TGG CAC AAC TCC TAC 600
Thr Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Thr Lys Trp His Asn Ser Tyr 200

AGG GAG CCC TTC GAG CAG CAC CTC CTG CTG GGC GTC AGC GTT TCC 645
Arg Glu Pro Phe Glu Gln His Leu Leu Leu Gly Val Ser Val Ser 215

TGC ATT GTC ATC CTG GCC GTC TGC CTG TTG TGC TAT GTC AGC ATC 690
Cys Ile Val Ile Leu Ala Val Cys Leu Leu Cys Tyr Val Ser Ile 230

ACC AAG ATT AAG AAA GAA TGG TGG GAT CAG ATT CCC AAC CCA GCC 735
Thr Lys Ile Lys Lys Glu Trp Trp Asp Gln Ile Pro Asn Pro Ala 245
```

FIGURA 1B

```
CGC AGC CGC CTC GTG GCT ATA ATA ATC CAG GAT GCT CAG GGG TCA  780
Arg Ser Arg Leu Val Ala Ile Ile Ile Gln Asp Ala Gln Gly Ser  260

CAG TGG GAG AAG CGG TCC CGA GGC CAG GAA CCA GCC AAG TGC CCA  825
Gln Trp Glu Lys Arg Ser Arg Gly Gln Glu Pro Ala Lys Cys Pro  275

CAC TGG AAG AAT TGT CTT ACC AAG CTC TTG CCC TGT TTT CTG GAG  870
His Trp Lys Asn Cys Leu Thr Lys Leu Leu Pro Cys Phe Leu Glu  290

CAC AAC ATG AAA AGG GAT GAA GAT CCT CAC AAG GCT GCC AAA GAG  915
His Asn Met Lys Arg Asp Glu Asp Pro His Lys Ala Ala Lys Glu  305

ATG CCT TTC CAG GGC TCT GGA AAA TCA GCA TGG TGC CCA GTG GAG  960
Met Pro Phe Gln Gly Ser Gly Lys Ser Ala Trp Cys Pro Val Glu  320

ATC AGC AAG ACA GTC CTC TGG CCA GAG AGC ATC AGC GTG GTG CGA 1005
Ile Ser Lys Thr Val Leu Trp Pro Glu Ser Ile Ser Val Val Arg  335

TGT GTG GAG TTG TTT GAG GCC CCG GTG GAG TGT GAG GAG GAG GAG 1050
Cys Val Glu Leu Phe Glu Ala Pro Val Glu Cys Glu Glu Glu Glu  350

GAG GTA GAG GAA GAA AAA GGG AGC TTC TGT GCA TCG CCT GAG AGC 1095
Glu Val Glu Glu Glu Lys Gly Ser Phe Cys Ala Ser Pro Glu Ser  365

AGC AGG GAT GAC TTC CAG GAG GGA AGG GAG GGC ATT GTG GCC CGG 1140
Ser Arg Asp Asp Phe Gln Glu Gly Arg Glu Gly Ile Val Ala Arg  380

CTA ACA GAG AGC CTG TTC CTG GAC CTG CTC GGA GAG GAG AAT GGG 1185
Leu Thr Glu Ser Leu Phe Leu Asp Leu Leu Gly Glu Glu Asn Gly  395

GGC TTT TGC CAG CAG GAC ATG GGG GAG TCA TGC CTT CTT CCA CCT 1230
Gly Phe Cys Gln Gln Asp Met Gly Glu Ser Cys Leu Leu Pro Pro  410

TCG GGA AGT ACG AGT GCT CAC ATG CCC TGG GAT GAG TTC CCA AGT 1275
Ser Gly Ser Thr Ser Ala His Met Pro Trp Asp Glu Phe Pro Ser  425

GCA GGG CCC AAG GAG GCA CCT CCC TGG GGC AAG GAG CAG CCT CTC 1320
Ala Gly Pro Lys Glu Ala Pro Pro Trp Gly Lys Glu Gln Pro Leu  440

CAC CTG GAG CCA AGT CCT CCT GCC AGC CCG ACC CAG AGT CCA GAC 1365
His Leu Glu Pro Ser Pro Pro Ala Ser Pro Thr Gln Ser Pro Asp  455

AAC CTG ACT TGC ACA GAG ACG CCC CTC GTC ATC GCA GGC AAC CCT 1410
Asn Leu Thr Cys Thr Glu Thr Pro Leu Val Ile Ala Gly Asn Pro  470

GCT TAC CGC AGC TTC AGC AAC TCC CTG AGC CAG TCA CCG TGT CCC 1455
Ala Tyr Arg Ser Phe Ser Asn Ser Leu Ser Gln Ser Pro Cys Pro  485

AGA GAG CTG GGT CCA GAC CCA CTG CTG GCC AGA CAC CTG GAG GAA 1500
Arg Glu Leu Gly Pro Asp Pro Leu Leu Ala Arg His Leu Glu Glu  500

GTA GAA CCC GAG ATG CCC TGT GTC CCC CAG CTC TCT GAG CCA ACC 1545
Val Glu Pro Glu Met Pro Cys Val Pro Gln Leu Ser Glu Pro Thr  515
```

FIGURA 1C

```
ACT GTG CCC CAA CCT GAG CCA GAA ACC TGG GAG CAG ATC CTC CGC 1590
Thr Val Pro Gln Pro Glu Pro Glu Thr Trp Glu Gln Ile Leu Arg  530

CGA AAT GTC CTC CAG CAT GGG GCA GCT GCA GCC CCC GTC TCG GCC 1635
Arg Asn Val Leu Gln His Gly Ala Ala Ala Ala Pro Val Ser Ala  545

CCC ACC AGT GGC TAT CAG GAG TTT GTA CAT GCG GTG GAG CAG GGT 1680
Pro Thr Ser Gly Tyr Gln Glu Phe Val His Ala Val Glu Gln Gly  560

GGC ACC CAG GCC AGT GCG GTG GTG GGC TTG GGT CCC CCA GGA GAG 1725
Gly Thr Gln Ala Ser Ala Val Val Gly Leu Gly Pro Pro Gly Glu  575

GCT GGT TAC AAG GCC TTC TCA AGC CTG CTT GCC AGC AGT GCT GTG 1770
Ala Gly Tyr Lys Ala Phe Ser Ser Leu Leu Ala Ser Ser Ala Val  590

TCC CCA GAG AAA TGT GGG TTT GGG GCT AGC AGT GGG GAA GAG GGG 1815
Ser Pro Glu Lys Cys Gly Phe Gly Ala Ser Ser Gly Glu Glu Gly  605

TAT AAG CCT TTC CAA GAC CTC ATT CCT GGC TGC CCT GGG GAC CCT 1860
Tyr Lys Pro Phe Gln Asp Leu Ile Pro Gly Cys Pro Gly Asp Pro  620

GCC CCA GTC CCT GTC CCC TTG TTC ACC TTT GGA CTG GAC AGG GAG 1905
Ala Pro Val Pro Val Pro Leu Phe Thr Phe Gly Leu Asp Arg Glu  635

CCA CCT CGC AGT CCG CAG AGC TCA CAT CTC CCA AGC AGC TCC CCA 1950
Pro Pro Arg Ser Pro Gln Ser Ser His Leu Pro Ser Ser Ser Pro  650

GAG CAC CTG GGT CTG GAG CCG GGG GAA AAG GTA GAG GAC ATG CCA 1995
Glu His Leu Gly Leu Glu Pro Gly Glu Lys Val Glu Asp Met Pro  665

AAG CCC CCA CTT CCC CAG GAG CAG GCC ACA GAC CCC CTT GTG GAC 2040
Lys Pro Pro Leu Pro Gln Glu Gln Ala Thr Asp Pro Leu Val Asp  680

AGC CTG GGC AGT GGC ATT GTC TAC TCA GCC CTT ACC TGC CAC CTG 2085
Ser Leu Gly Ser Gly Ile Val Tyr Ser Ala Leu Thr Cys His Leu  695

TGC GGC CAC CTG AAA CAG TGT CAT GGC CAG GAG GAT GGT GGC CAG 2130
Cys Gly His Leu Lys Gln Cys His Gly Gln Glu Asp Gly Gly Gln  710

ACC CCT GTC ATG GCC AGT CCT TGC TGT GGC TGC TGC TGT GGA GAC 2175
Thr Pro Val Met Ala Ser Pro Cys Cys Gly Cys Cys Cys Gly Asp  725

AGG TCC TCG CCC CCT ACA ACC CCC CTG AGG GCC CCA GAC CCC TCT 2220
Arg Ser Ser Pro Pro Thr Thr Pro Leu Arg Ala Pro Asp Pro Ser  740

CCA GGT GGG GTT CCA CTG GAG GCC AGT CTG TGT CCG GCC TCC CTG 2265
Pro Gly Gly Val Pro Leu Glu Ala Ser Leu Cys Pro Ala Ser Leu  755

GCA CCC TCG GGC ATC TCA GAG AAG AGT AAA TCC TCA TCA TCC TTC 2310
Ala Pro Ser Gly Ile Ser Glu Lys Ser Lys Ser Ser Ser Ser Phe  770

CAT CCT GCC CCT GGC AAT GCT CAG AGC TCA AGC CAG ACC CCC AAA 2355
His Pro Ala Pro Gly Asn Ala Gln Ser Ser Ser Gln Thr Pro Lys  785

ATC GTG AAC TTT GTC TCC GTG GGA CCC ACA TAC ATG AGG GTC TCT 2400
Ile Val Asn Phe Val Ser Val Gly Pro Thr Tyr Met Arg Val Ser  800
```

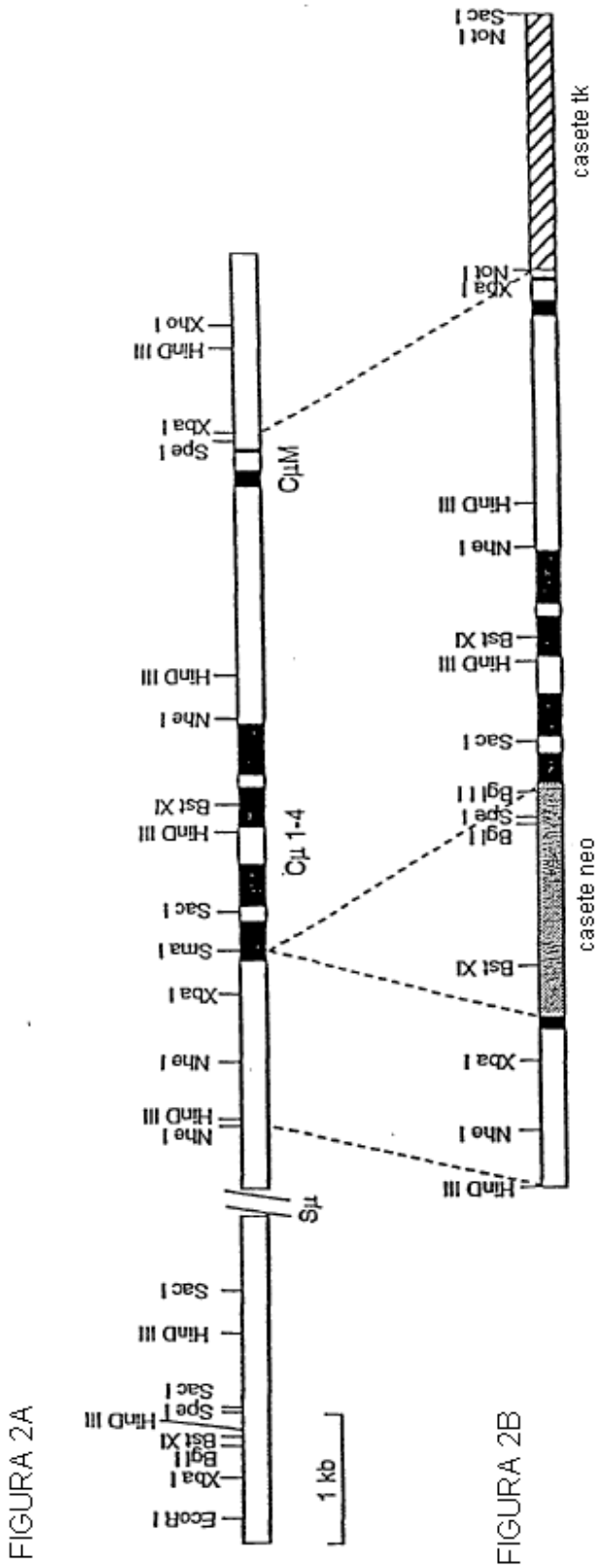

FIGURA 2A

FIGURA 2B

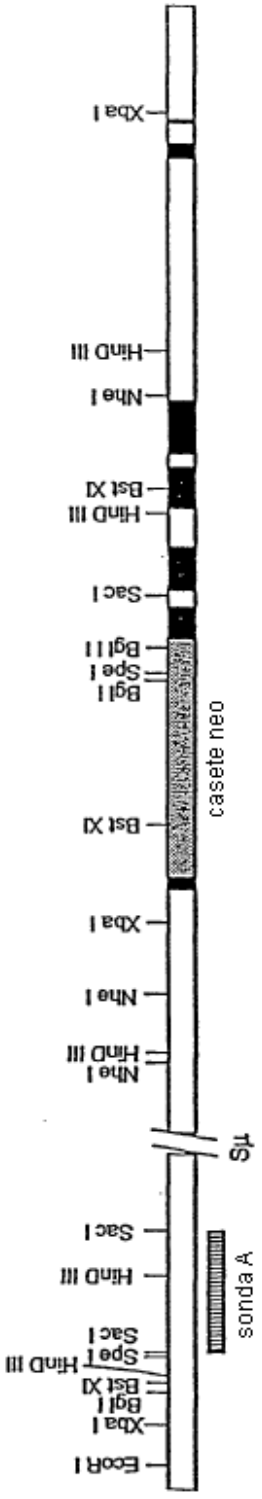

FIGURA 2C

FIGURA 3A

```
AATTAGCGGC CGCTGTCGAC AAGCTTCGAA TTCAGTATCG ATGTGGGGTA    50
CCTACTGTCC CGGGATTGCG GATCCGCGAT GATATCGTTG ATCCTCGAGT   100
GCGGCCGCAG TATGCAAAAA AAAGCCCGCT CATTAGGCGG GCTCTTGGCA   150
GAACATATCC ATCGCGTCCG CCATCTCCAG CAGCCGCACG CGGCGCATCT   200
CGGGCAGCGT TGGGTCCTGG CCACGGGTGC GCATGATCGT GCTCCTGTCG   250
TTGAGGACCC GGCTAGGCTG GCGGGGTTGC CTTACTGGTT AGCAGAATGA   300
ATCACCGATA CGCGAGCGAA CGTGAAGCGA CTGCTGCTGC AAAACGTCTG   350
CGACCTGAGC AACAACATGA ATGGTCTTCG GTTTCCGTGT TTCGTAAAGT   400
CTGGAAACGC GGAAGTCAGC GCCCTGCACC ATTATGTTCC GGATCTGCAT   450
CGCAGGATGC TGCTGGCTAC CCTGTGGAAC ACCTACATCT GTATTAACGA   500
AGCGCTGGCA TTGACCCTGA GTGATTTTTC TCTGGTCCCG CCGCATCCAT   550
ACCGCCAGTT GTTTACCCTC ACAACGTTCC AGTAACCGGG CATGTTCATC   600
ATCAGTAACC CGTATCGTGA GCATCCTCTC TCGTTTCATC GGTATCATTA   650
CCCCCATGAA CAGAAATTCC CCCTTACACG GAGGCATCAA GTGACCAAAC   700
AGGAAAAAAC CGCCCTTAAC ATGGCCCGCT TTATCAGAAG CCAGACATTA   750
ACGCTTCTGG AGAAACTCAA CGAGCTGGAC GCGGATGAAC AGGCAGACAT   800
CTGTGAATCG CTTCACGACC ACGCTGATGA GCTTTACCGC AGCTGCCTCG   850
CGCGTTTCGG TGATGACGGT GAAAACCTCT GACACATGCA GCTCCCGGAG   900
ACGGTCACAG CTTGTCTGTA AGCGGATGCC GGGAGCAGAC AAGCCCGTCA   950
GGGCGCGTCA GCGGGTGTTG GCGGGTGTCG GGGCGCAGCC ATGACCCAGT  1000
CACGTAGCGA TAGCGGAGTG TATACTGGCT TAACTATGCG GCATCAGAG   1050
AGATTGTACT GAGAGTGCAC CATATGCGGT GTGAAATACC GCACAGATGC  1100
GTAAGGAGAA AATACCGCAT CAGGCGCTCT TCCGCTTCCT CGCTCACTGA  1150
CTCGCTGCGC TCGGTCGTTC GGCTGCGGCG AGCGGTATCA GCTCACTCAA  1200
AGGCGGTAAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG GGGATAACGC AGGAAAGAAC  1250
ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCGTAAAA AGGCCGCGTT  1300
GCTGGCGTTT TTCCATAGGC TCCGCCCCCC TGACGAGCAT CACAAAAATC  1350
GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA AAGATACCAG  1400
GCGTTTCCCC CTGGAAGCTC CCTCGTGCGC TCTCCTGTTC CGACCCTGCC  1450
GCTTACCGGA TACCTGTCCG CCTTTCTCCC TTCGGGAAGC GTGGCGCTTT  1500
CTCATAGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT CGGTGTAGGT CGTTCGCTCC  1550
AAGCTGGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCGTT CAGCCCGACC GCTGCGCCTT  1600
ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAGACAC GACTTATCGC  1650
CACTGGCAGC AGCCAGGCGC GCCTTGGCCT AAGAGGCCAC TGGTAACAGG  1700
ATTAGCAGAG CGAGGTATGT AGGCGGTGCT ACAGAGTTCT TGAAGTGGTG  1750
GCCTAACTAC GGCTACACTA GAAGGACAGT ATTTGGTATC TGCGCTCTGC  1800
TGAAGCCAGT TACCTTCGGA AAAAGAGTTG GTAGCTCTTG ATCCGGCAAA  1850
CAAACCACCG CTGGTAGCGG TGGTTTTTTT GTTTGCAAGC AGCAGATTAC  1900
GCGCAGAAAA AAAGGATCTC AAGAAGATCC TTTGATCTTT TCTACGGGGT  1950
CTGACGCTCA GTGGAACGAA AACTCACGTT AAGGGATTTT GGTCATGAGA  2000
TTATCAAAAA GGATCTTCAC CTAGATCCTT TTAAATTAAA AATGAAGTTT  2050
TAAATCAATC TAAAGTATAT ATGAGTAAAC TTGGTCTGAC AGTTACCAAT  2100
GCTTAATCAG TGAGGCACCT ATCTCAGCGA TCTGTCTATT TCGTTCATCC  2150
ATAGTTGCCT GACTCCCCGT CGTGTAGATA ACTACGATAC GGGAGGGCTT  2200
ACCATCTGGC CCCAGTGCTG CAATGATACC GCGAGACCCA CGCTCACCGG  2250
CTCCAGATTT ATCAGCAATA AACCAGCCAG CCGGAAGGGC CGAGCGCAGA  2300
AGTGGTCCTG CAACTTTATC CGCCTCCATC CAGTCTATTA ATTGTTGCCG  2350
GGAAGCTAGA GTAAGTAGTT CGCCAGTTAA TAGTTTGCGC AACGTTGTTG  2400
```

FIGURA 3B

```
CCATTGCTGC AGGCATCGTG GTGTCACGCT CGTCGTTTGG TATGGCTTCA 2450
TTCAGCTCCG GTTCCCAACG ATCAAGGCGA GTTACATGAT CCCCCATGTT 2500
GTGCAAAAAA GCGGTTAGCT CCTTCGGTCC TCCGATCGTT GTCAGAAGTA 2550
AGTTGGCCGC AGTGTTATCA CTCATGGTTA TGGCAGCACT GCATAATTCT 2600
CTTACTGTCA TGCCATCCGT AAGATGCTTT TCTGTGACTG GTGAGTACTC 2650
AACCAAGTCA TTCTGAGAAT AGTGTATGCG GCGACCGAGT TGCTCTTGCC 2700
CGGCGTCAAC ACGGGATAAT ACCGCGCCAC ATAGCAGAAC TTTAAAAGTG 2750
CTCATCATTG GAAAACGTTC TTCGGGGCGA AAACTCTCAA GGATCTTACC 2800
GCTGTTGAGA TCCAGTTCGA TGTAACCCAC TCGTGCACCC AACTGATCTT 2850
CAGCATCTTT TACTTTCACC AGCGTTTCTG GGTGAGCAAA AACAGGAAGG 2900
CAAAATGCCG CAAAAAAGGG AATAAGGGCG ACACGGAAAT GTTGAATACT 2950
CATACTCTTC CTTTTTCAAT ATTATTGAAG CATTTATCAG GGTTATTGTC 3000
TCATGAGCGG ATACATATTT GAATGTATTT AGAAAAATAA ACAAATAGGG 3050
GTTCCGCGCA CATTTCCCCG AAAAGTGCCA CCTGACGTCT AAGAAACCAT 3100
TATTATCATG ACATTAACCT ATAAAAATAG GCGTATCACG AGGCCCTTTC 3150
GTCTTCAAG                                             3159
```

FIGURA 4

```
1B7Vk   EIVLTQSPSS VSASVGDRVT ITCRASQGIS N.RLAWYQQK PGKAPKLLIY IASILQRGVP
63Vk    D-QM------ ---------- ---------- T-W-----H- ---------- V--S--S---
12B5Vk  --------GT L-L-P-E-A- LS-------- SV- SSY----- --Q--R---F G--SRAT-I-
6-2Vk   --------GT L-L-P-E-A- LS-------- SV- TSY----- --Q--R---- G--SRAT-I-
5A1Vk   --------AT L-L-P-E-A- LS-------- SV- .SY----- --Q--R---- H--NRAT-I-
27A1Vk  --------GT L-L-P-E-A- LS-------- SV- SSY----- --Q--R---- G--SRAT-I-

1B7Vk   SRFSGSGSGT DFTLTITRLQ PEDEATYYCQ Q.ANSFPFTF GPGTKVDIK
63Vk    ---------- ------SS-- ---------- ---------- ---------
12B5Vk  D--------- ------S--E -----V---- -YGS-P-W-- -Q----E--
6-2Vk   D--------- ------S--E -----V---- -YGS-P.--- -Q----E--
5A1Vk   A--------- ------SS-E -----V---- --RSNW-L-- -G----E--
27A1Vk  D--------- ------S--E -----V---- -YGS-P-W-- -Q----E--
```

FIGURA 5

```
1B7VH   EVQVLESGGN LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKGLEWVSS ITGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNS
#63VH   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -----
12B5VH  ---LVQ---G --H------- ---G------ RN--F----- ---------G -.-T--A-N- ---------- ----A
6-2VH   Q--LV----G V----R---- --------A-- ---IQ----- --------AV -SYD-SKK-- ---------- -----
5A1VH   ---LVQ---G --H------- T--G------ NFV-H----T --Q------A -.-T--G--- ---------- ----A
27A1VH  Q--LV----G V----R---- --S------- R-G-H----- --R-----AI -WFE-NNQ-- ---------- -----

1B7VH   KNTLYLQMNS LRAEDTAIFY CAKDNR.G.. ....FFHYWG QGTLVTVSS
#63VH   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------
12B5VH  --S------- -----M-VY- --RGR.-.-- ---YY-D--- ---------
6-2VH   ---------- --------VY- --REG-R--- -----S-D--- ---------
5A1VH   -SS------- ------M-VY- --R-RPMVRG VIIDY-D--- ---------
27A1VH  ------E--- --------VY- --R.GKY.-- ----Y-D--- ---------
```