

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 604 255**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.04.2008** **PCT/GB2008/001365**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2008** **WO08129263**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2008** **E 08737025 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016** **EP 2144934**

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

30 Prioridad:

18.04.2007 GB 0707505
18.04.2007 US 912474 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.03.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

MCKENZIE, ANDREW, NEIL, JAMES y
BALLANTYNE, SARAH

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 604 255 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra IL-25

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos dirigidos a interleucina 25 (IL-25). Las realizaciones preferidas de la presente invención emplean los dominios VH y/o VL del anticuerpo 2C3. En otro aspecto la invención proporciona una o más de las CDR de los dominios VH y VL desvelados en el presente documento injertadas en regiones marco conservadas VH y VL humanas, respectivamente.

Antecedentes de la Invención

El asma es un trastorno inflamatorio crónico común de las vías respiratorias. El número de personas aquejadas ha aumentado drásticamente durante las décadas recientes y la Organización Mundial de la Salud estima que aproximadamente 300 millones de personas en todo el mundo padecen asma. El asma alérgica se caracteriza por hipersensibilidad de las vías respiratorias incontrolable (AHR) inducida por diversos estímulos desencadenantes y se asocia con infiltrados inflamatorios de tipo 2 en los pulmones.

Las citocinas de tipo 2 desempeñan un papel importante en la mediación de la inmunidad protectora para infección por helmintos parasitarios, regulación de las funciones efectoras tales como crecimiento de linfocitos B y secreción de IgE, inducción de hiperplasia de células caliciformes y producción de mocos asociada, eosinofilia, mastocitosis y fibrosis (1). Son los papeles centrales desempeñados por estas citocinas en la regulación de estas funciones efectoras lo que las ha hecho dianas terapéuticas clave en asma. De hecho, los modelos de ratón en los que se sobreexpresan estas citocinas muestran características significativas de asma. Sorprendentemente, entonces, los intentos de aliviar asma experimental bloqueando citocinas de tipo 2 específicas han resultado, con la excepción de la inhibición de IL-13, ineficaces.

La inhibición de IL-13 suprime tanto AHR como inflamación de las vías respiratorias, aunque el mecanismo sigue sin estar claro (2, 3). Sin embargo, dada la patofisiología compleja y escaso entendimiento de la etiología del asma, no está claro si la dirección a rutas individuales resultará en última instancia terapéuticamente exitosa.

Reciente, se ha mostrado que la sobreexpresión de IL-25/IL-17E, un miembro de la familia de citocinas de IL-17 relacionadas estructuralmente (8) induce respuestas de tipo 2 *in vivo* (4-6) y aumenta la sensibilidad a agonistas de las vías respiratorias (7). Los ratones *IL25^{-/-}* no consiguieron expulsar los parásitos helmínticos; un indicador clave de una respuesta de tipo 2 ineficaz (9, 10).

La estructura básica de un anticuerpo se conoce bien en la técnica. Un anticuerpo de origen natural tiene habitualmente cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas conectadas por enlace disulfuro. Las cadenas ligeras y pesadas tienen cada una región constante y una región variable (o dominio). Las regiones variables son principalmente responsables de la unión a antígeno. Dentro de cada región variable, tres subregiones, conocidas como las regiones determinantes de complementariedad (CDR), entran en contacto con el antígeno. Las CDR de cada dominio variable se numeran, del extremo N terminal o C terminal, como CDR1, CDR2 y CDR3. Entre y en dirección N y C terminal con respecto a las CRD hay cuatro denominadas regiones marco conservadas, que tienen muy pocos contactos, o ninguno, con el antígeno. Se ilustran más detalles con respecto a las estructuras de anticuerpos en muchos de los documentos citados posteriormente.

Angkawekwinai *et al.*, Journal of Allergy and Clinical Immunology 119(1):S134 (2007) sugiere que IL-25 pueden desempeñar un papel importante en el inicio de respuestas alérgicas y puede ser importante en la patogénesis de enfermedades alérgicas tales como asma.

El documento US 2003/008815 se refiere a la identificación y el aislamiento de secuencias de ADN y polipeptídicas que tienen similitud de secuencia con IL-17 y proteína receptora de IL-17 y su uso en la estimulación o inhibición de la respuesta inmunitaria.

Divulgación de la Invención

Los presentes inventores han producido anticuerpos contra IL-25 y han identificado una molécula de anticuerpo que se une con alta afinidad y especificidad con IL-25. Ya que la IL-25 humana y de ratón comparten 80 % de identidad de secuencia se cree que sería improbable que fuera posible generar anticuerpos anti-IL25 útiles mediante inmunización convencional de ratones o ratas, ya que el grado de similitud produciría el número de epítomos inmunogénicos. Además, la interfaz receptor-ligando probablemente mostraría el mayor grado de conservación evitando de este modo la generación de anticuerpos capaces de bloquear la interacción de IL-25 con su receptor. Para superar estos problemas los presentes inventores inmunizaron ratones que se habían modificado técnicamente para carecer de expresión de IL-25 (IL-25^{-/-}) creyendo que este enfoque aumentaría la probabilidad de desarrollar anticuerpos dirigidos contra la interfaz de IL-25/IL-25R.

Este enfoque fue altamente exitoso en la generación de anticuerpos contra IL-25, probablemente debido a que la IL-25 en sí misma potencia la respuesta inmunitaria humoral. Sin embargo, incluso usando estos enfoques, solamente se identificaron dos anticuerpos de bloqueo de los setenta explorados, y solamente uno de estos pudo recuperarse.

5 Habiendo superado el problema de la similitud entre IL-25 murina y humana que se creía que evitaba la generación de anticuerpos de bloqueo eficaces mediante medios convencionales, se cree que esta similitud de secuencia puede permitir la generación de un anticuerpo que es igualmente eficaz en el bloqueo de IL-25 de ratón y humana que interacciona con los receptores. La presente invención muestra ahora que esto es de hecho así.

10 Aunque existen otros anticuerpos para IL-25 se cree que la presente invención es la primera demostración de anticuerpos tales capaces de bloquear la bioactividad de IL-25. En particular, la presente divulgación proporciona un ensayo realizado en modelos murinos de asma que muestran que un anticuerpo de la invención tiene propiedades ventajosas e inesperadas, especialmente su capacidad para prevenir o reducir la hipersensibilidad de las vías respiratorias *in vivo*, un síntoma clave del asma.

15 Aunque se ha indicado que la administración de una proteína de fusión IL-25R-Fc soluble reduce inflamación de las vías respiratorias de tipo 2, los efectos fueron menos drásticos que los presentados en el presente documento y no se evaluó la AHR de forma crítica (11). Los inventores demuestran ahora que IL-25 desempeña papeles críticos en la inflamación de las vías respiratorias y AHR, actuando inicialmente para potenciar la inflamación mediada por citocina de tipo 2, pero desempeñando también un papel importante en la inducción de AHR independiente de las citocinas de tipo 2 clásicas. La identificación de AHR dependiente de IL-25 ofrece la posibilidad de identificar nuevas terapias terapéuticas que quedan cadena debajo de IL-25. En la actualidad no se sabe si IL-25 actúa directamente en músculo liso de las vías respiratorias para inducir broncoconstricción o si sus efectos están mediados a través de la inducción de broncoconstrictores conocidos tales como leucotrienos. Sin embargo, la actividad bifásica de IL-25 la hace una diana terapéutica excelente para la supresión de inflamación de las vías respiratorias y la inhibición de hipersensibilidad de las vías respiratorias *in vivo*.

25 En consecuencia, la presente invención se refiere al nuevo anticuerpo, y más generalmente miembros de unión a diana que comprenden las secuencias de CDR del anticuerpo, así como el uso de miembros de unión a diana en el tratamiento de afecciones tales como asma.

30 Un anticuerpo que se une a IL-25 y que comprende un dominio VH de anticuerpo o una parte sustancial del mismo que comprende una CDR1 VH que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 5; una CDR2 VH que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 6; y una CDR3 VH que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 7, y que comprende además un dominio VL o una parte sustancial del mismo que comprende una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 8, una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos como expone en SEQ ID NO: 9; y una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos como expone en SEQ ID NO: 10.

40 Estas CDR pueden estar en el dominio VL que tienen regiones marco conservadas humanas o pueden ser el dominio VL de SEQ ID NO: 4.

45 Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a IL-25 y que comprende el dominio VH 2C3 (SEQ ID NO: 2) y/o el dominio VL 2C3 (SEQ ID NO: 4).

La invención también proporciona ácido nucleico aislado que codifica los anticuerpos de la invención, vectores que comprenden el ácido nucleico y métodos para expresar el ácido nucleico en una célula hospedadora para producir anticuerpos de la invención.

50 La invención proporciona además el uso de anticuerpos de la invención, por ejemplo, en forma de una composición farmacéutica, para el tratamiento de enfermedades, incluyendo asma.

Estos y aspectos adicionales de la invención se describen en más detalle posteriormente y con referencia a los ejemplos adjuntos.

55 Descripción de las Figuras

La figura 1 muestra neutralización de IL-25 antes de sensibilización y también durante la exposición a asma. (A) La sensibilidad a metacolina de ratones sensibilizados por OVA se determinó un día después de la última exposición a antígeno aerosolizado. Los datos se combinan a partir de los 2 experimentos y representan la media $\pm$ ETM de 14-18 ratones / grupo (*p < 0,05 frente a control de isotipo, **p < 0,01 frente a control de isotipo) (B) Se tiñeron secciones pulmonares con giemsa y se puntuaron con respecto a infiltración prevascular, n = 8 por grupo. (C) Se determinó el contenido de moco mediante tinción de Schiff ácida periódica (PAS) de secciones pulmonares, n = 8 por grupo. (D) Se midió IgE en suero específico de antígeno mediante ELISA, se convirtieron las lecturas de DO a unidades arbitrarias por comparación con un suero patrón n = 8 por grupo. (E) La proporción de eosinófilos en BAL se determinó mediante recuento celular diferencial de cytopsin teñidos con

giemsa, n = 6 por grupo. (F) Producción de citocinas inducida por antígeno de células de ganglios linfáticos mediastinales restimuladas. Se determinaron los niveles proteicos mediante ELISA, n = 6 por grupo. Los símbolos representan animales individuales y la media se representa por una barra. Los datos son representativos de al menos 2 experimentos independientes. Sens = anticuerpo administrado antes de la sensibilización, aero = anticuerpo administrado 4 horas antes de cada exposición a aerosol.

La figura 2 muestra neutralización de IL-25 durante exposición a asma solamente. (A) Se determinó la sensibilidad a metacolina de ratones sensibilizados por OVA un día después de la última exposición a antígeno aerosolizado. Se combinan datos de 2 experimentos y representa la media $\pm$ ETM de 14-18 ratones /grupo. (*p < 0,05 frente a control de isotipo, **p < 0,01 frente a control de isotipo) (B) Se tiñeron secciones pulmonares con giemsa y se puntuaron con respecto a infiltración perivascular, n = 8 por grupo. (C) Se determinó el contenido de moco mediante tinción de Schiff ácida periódica (PAS) de secciones pulmonares, n = 8 por grupo. (D) Se determinó la proporción de eosinófilos en BAL mediante recuento celular diferencial de cytopspin teñido con giemsa, n = 6 por grupo. (E) Se midió IgE en suero específico de antígeno mediante ELISA, se convirtieron las lecturas de DO a unidades arbitrarias por comparación con suero patrón n = 8 por grupo. (F) Producción de citocinas inducida por antígeno de células de ganglios linfáticos mediastinales restimuladas. Se determinaron los niveles proteicos mediante ELISA, n = 6 por grupo. Los símbolos representan animales individuales y la media se representa por una barra. Los datos son representativos de al menos 2 experimentos independientes. Sens = anticuerpo administrado antes de la sensibilización, aero = anticuerpo administrado 4 horas antes de cada exposición a aerosol.

La figura 3 muestra administración de rIL-25 a ratones sin tratamiento previo. A ratones de tipo silvestre (A), *il13^{-/-}* (B) o *il4^{-/-} il5^{-/-} il9^{-/-} il13^{-/-}* (C) se les administraron 1,8 μ g de rIL-25 o PBS por vía intranasal. La sensibilidad a metacolina se determinó 16 horas después de la exposición. *p < 0,05 frente a control de isotipo, **p < 0,01 frente a control de isotipo, n = 4-8 por grupo. Los datos son representativos de al menos 2 experimentos independientes.

Secuencias:

Los anticuerpos de la presente invención se describen adicionalmente en el presente documento con referencia a los siguientes números de identificación de secuencia:

SEQ ID NO. 1 secuencia de nucleótidos que codifica VH 2C3
 SEQ ID NO. 2 secuencia de aminoácidos de VH 2C3
 SEQ ID NO. 3 secuencia de nucleótidos que codifica VL 2C3
 SEQ ID NO. 4 secuencia de aminoácidos de VL 2C3
 SEQ ID NO. 5 secuencia de aminoácidos de CDR1 de VH 2C3
 SEQ ID NO. 6 secuencia de aminoácidos de CDR2 de VH 2C3
 SEQ ID NO. 7 secuencia de aminoácidos de CDR3 de VH 2C3
 SEQ ID NO. 8 secuencia de aminoácidos de CDR1 de VL 2C3
 SEQ ID NO. 9 secuencia de aminoácidos de CDR2 de VL 2C3
 SEQ ID NO. 10 secuencia de aminoácidos de CDR3 de VL 2C3

Se exponen secuencias adicionales en el listado de secuencias adjunto.

Descripción Detallada de la Invención

Miembro de Unión a Diana

Este describe un miembro de un par de moléculas que tienen especificidad de unión entre sí. Los miembros de un par de unión específico pueden derivar de forma natural o producirse de forma completa o parcialmente sintética. Un miembro del par de moléculas tiene un área en su superficie, o una cavidad, que se une específicamente con y es por tanto complementaria de una organización espacial y polar particular de otro miembro del par de moléculas. Por lo tanto, los miembros del par tienen la propiedad de unirse específicamente entre sí. Son ejemplos de tipos de pares de unión específicos antígeno-anticuerpo, biotina-avidina, hormona-receptor de hormona, receptor-ligando, enzima-sustrato.

La presente solicitud se refiere a reacciones de tipo antígeno-anticuerpo. En consecuencia, un anticuerpo de la invención comprenderá al menos una parte de una molécula de anticuerpo, más particularmente al menos parte del dominio de unión a antígeno de dicha molécula.

En general, la región variable de cadena pesada (dominio VH) de un anticuerpo desempeña un papel significativo en la unión de un anticuerpo con un antígeno. La región CDR3 de un dominio VH es más diversa que las regiones CDR1 y CDR2, y por lo tanto la mayoría de los anticuerpos proporciona especificidad por la diana del anticuerpo. Por lo tanto, los anticuerpos de la invención se basan de este modo alrededor de la región CDR3 VH del anticuerpo 2C3. Los anticuerpos de la invención más preferentemente comprenden las tres CDR de las regiones VH del

anticuerpo 2C3.

La estructura de un anticuerpo que comprende una CDR de la invención generalmente será de una secuencia de cadena pesada o ligera de una molécula de anticuerpo o parte sustancial de la misma en la que la CDR se localiza en una localización correspondiente a la CDR de dominios variables de anticuerpo VH y VL de origen natural codificados por genes de inmunoglobulina reordenados. Las estructuras y localizaciones de dominios variables de inmunoglobulina pueden determinarse por referencia a Kabat, E.A. *et al*, Sequences of Proteins of Immunological Interest. 4ª Edición. Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos. 1987, y actualizaciones del mismo. Están disponibles varios recursos en línea académicos y comerciales para consultar esta base de datos. Por ejemplo, véase Martin, A.C.R. Accessing the Kabat Antibody Sequence Database by Computer PROTEINS: Structure, Function and Genetics, 25 (1996), 130-133 y el recurso en línea asociado, actualmente en la dirección web de <http://www.bioinf.org.uk/abs/simkab.html>.

En general, un miembro de unión a diana comprende un dominio VH emparejado con un dominio VL para proporcionar un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo, aunque como se analiza adicionalmente posteriormente un dominio VH solo puede usarse para unirse con antígeno. En una realización preferida, el dominio VH 2C3 (SEQ ID NO. 2) se empareja con el dominio VL 2C3 (SEQ ID NO. 4), de modo que se forme un sitio de unión a antígeno de anticuerpo que comprenda los dominios tanto VH como VL 2C3. En otras realizaciones, el VH 2C3 se empareja con un dominio VL distinto del VL 2C3.

La promiscuidad de cadena ligera está bien establecida en la técnica, como se analiza adicionalmente en el presente documento.

Un miembro de unión diana puede unirse con IL-25 con una afinidad sustancialmente similar a la de 2C3, por ejemplo $\pm 10\%$. Un miembro de unión diana será en general específico para IL-25. Por lo tanto, el miembro de unión a diana no mostrará ninguna unión significativa con moléculas distintas de su compañero o sus compañeros de unión específicos. Por ejemplo, se ha descubierto que el anticuerpo 2C3 no reacciona de forma cruzada con IL-4, IL-5 e IL-13 y por lo tanto la evitación de dicha reactividad cruzada con otras citocinas implicadas en asma y procesos similares es una característica deseable de anticuerpos de la invención.

Normalmente, la especificidad puede determinarse por medio de un ensayo de unión tal como ELISA que emplea un panel de antígenos. Un anticuerpo de acuerdo con la presente invención puede reconocer IL-25 y no otros miembros de la familia IL-17, particularmente una cualquiera de IL-17A, IL-17B e IL-17C; más preferiblemente las tres de IL-17A, IL-17B e IL-17C. La unión de un anticuerpo de acuerdo con la invención con IL-25 puede anularse mediante competición con IL-25 recombinante.

La afinidad de unión y potencia de neutralización de diferentes miembros de unión a diana puede compararse en condiciones apropiadas.

Molécula de Anticuerpo

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

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

Cuando van a usarse anticuerpos biespecíficos, estos pueden ser anticuerpos biespecíficos convencionales, que pueden fabricarse de diversas maneras (Holliger, P. y Winter G. Current Opinion Biotechnol. 4, 446-449 (1993)), por ejemplo, prepararse de forma química o partir de hibridomas híbridos, o pueden ser cualquiera de los fragmentos de anticuerpo biespecíficos mencionados anteriormente. Pueden construirse diacuerpos y scFv sin una región Fc, usando solamente dominios variables, potencialmente reduciendo los efectos de la reacción anti-idiotípica.

Los diacuerpos biespecíficos, a diferencia de los anticuerpos completos biespecíficos, también pueden ser particularmente útiles porque pueden construirse y expresarse fácilmente en *E. coli*. Pueden seleccionarse fácilmente diacuerpos (y muchos otros polipéptidos tales como fragmentos de anticuerpo) de especificidades de unión apropiadas usando presentación en fagos (documento WO94/13804) de bibliotecas. Si una rama del diacuerpo debe mantenerse constante, por ejemplo, con una especificidad dirigida contra IL-25, entonces puede realizarse una biblioteca en la que la otra rama varíe y se seleccione un anticuerpo de especificidad apropiada. Los anticuerpos completos biespecíficos pueden prepararse mediante ingeniería de botones en ojales (J. B. B. Ridgeway *et al*, Protein Eng., 9, 616-621, 1996). Es posible tomar anticuerpos monoclonales y otros y usar técnicas de tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que conservan la especificidad del anticuerpo original. Dichas técnicas pueden implicar introducir ADN que codifica la región variable de inmunoglobulina, las regiones determinantes de complementariedad (CDR), de un anticuerpo con las regiones constantes, o regiones constantes más regiones marco conservadas, de una inmunoglobulina diferente. Véase, por ejemplo, documentos EP-A-184187, GB 2188638A o EP-A-239400.

Preferentemente, las regiones CDR se injertan en una región marco conservada humana. La región marco conservada humana puede seleccionarse por varios métodos, por ejemplo, comparando las secuencias de región marco conservada de ratón o región V de ratón con secuencias de región marco conservada o región V humana y seleccionando una región marco conservada humana que tiene el mayor o uno de los mayores grados de similitud o identidad de aminoácidos. Pueden realizarse modificaciones para regiones marco conservadas de secuencias humanas nativas para optimizar adicionalmente los anticuerpos con injertos de CDR resultantes.

Aunque se prefieren moléculas de anticuerpo que comprendan un par de dominios VH y VL, también se describen dominios de un único dominio de unión basado en secuencias de dominio VH o VL. Se sabe que dominios de inmunoglobulinas individuales, especialmente dominios VH, son capaces unirse con antígenos diana de una manera específica.

En el caso de uno de los dominios de unión monocatenarios, estos dominios pueden usarse para explorar con respecto a dominios complementarios capaces de formar un miembro de unión a diana de dos dominios capaz de unirse con IL-25, como se analiza adicionalmente en el presente documento posteriormente.

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

Se incluyen, por lo tanto, moléculas quiméricas que comprende un dominio de unión a diana, o equivalente, fusionado con otro polipéptido. Se describen clonación y expresión de anticuerpos quiméricos en EP-A-0120694 y EP-A-0125023.

Las regiones marco conservadas de moléculas de anticuerpo de la invención también pueden incluir secuencias de glucosilación que incluyen uno o más sitios de glucosilación. Dependiendo de la célula hospedadora en la que se expresa el miembro de unión a diana, el patrón de glucosilación puede variar. Por lo tanto, pueden modificarse construcciones de ácido nucleico que codifican sitios de glucosilación para retirar el sitio o como alternativa dichos sitios pueden introducirse en la proteína. Por ejemplo, los sitios de N-glucosilación en proteínas eucariotas se caracterizan por un triplete de aminoácidos Asn-X-Y, en el que X es cualquier aminoácido excepto Pro e Y es Ser o Thr. Las sustituciones, adiciones o supresiones apropiadas de la secuencia de nucleótidos que codifica estos tripletes darán como resultado la prevención de la unión de restos de carbohidratos en la cadena lateral de Asn. La alteración de un único nucleótido, elegido de modo que Asn se reemplace por un aminoácido diferente, por ejemplo, es suficiente para inactivar un sitio de N-glucosilación. Los procedimientos conocidos para inactivar sitios de N-glucosilación en proteínas incluyen los descritos en la Patente de Estados Unidos N.º 5.071.972 y el documento EP 276.846.

Dominio de Unión a Antígeno

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

Una parte sustancial de un dominio variable de inmunoglobulina comprenderá al menos las tres regiones CDR, junto con sus regiones marco conservadas intermedias. Preferentemente, la parte también incluirá al menos aproximadamente 50 % de una o ambas de las primera y cuarta regiones marco conservadas, siendo el 50 % el 50 % C terminal de la primera región marco conservada y el 50 % N terminal de la cuarta región marco conservada.

Los restos adicionales en el extremo N terminal o C terminal de la parte sustancial del dominio variable pueden no ser los normalmente asociados con regiones de dominio variable de origen natural. Por ejemplo, la construcción de miembros de unión a diana de la presente invención hecha por técnicas de ADN recombinante puede dar como resultado la introducción de restos N o C terminales codificados por enlazadores introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación. Otras etapas de manipulación incluyen la introducción de enlazadores para unir dominios variables de la invención a secuencias proteicas adicionales incluyendo cadenas pesadas de inmunoglobulina, otros dominios variables (por ejemplo en la producción de diacuerpos) o marcadores proteicos como se analiza en más detalle posteriormente.

Comprender

Este se usa en general en el sentido de incluir, es decir permite la presencia de una o más características o componentes.

Aislado

Esto se refiere al estado en el que los anticuerpos de la invención, o ácidos nucleicos que codifican dichos anticuerpos, estarán en general de acuerdo con la presente invención. Los anticuerpos y ácido nucleico estarán libres o sustancialmente libres de material con el que se asocien de forma natural tales como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los que se encuentran en su ambiente natural, o el ambiente en el que se preparan (por ejemplo cultivo celular) cuando dicha preparación es mediante tecnología de ADN recombinante practicada *in vitro* o *in vivo*.

Pueden formularse anticuerpos y ácido nucleico con diluyentes o adyuvantes y aún para fines prácticos aislarse, por ejemplo los miembros normalmente se mezclarán con gelatina u otros vehículos si se usan para recubrir placas de microtitulación para uso en inmunoensayos, o se mezclarán con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables cuando se usen en diagnóstico o terapia. Los anticuerpos pueden estar glucosilados, bien en forma natural o bien mediante sistemas de células eucariotas heterólogas (por ejemplo células CHO o NS0 (ECACC 85110503), o pueden estar desglucosiladas (por ejemplo si se producen mediante expresión en una célula procariota).

Características adicionales de miembros de unión a diana

Además de secuencias de anticuerpo, un miembro de unión a diana puede comprender otros aminoácidos, por ejemplo que forman un péptido o polipéptido, tal como un dominio plegado, o para transmitir a la molécula otra característica funcional además de la capacidad para unirse con antígeno. Los anticuerpos de la invención pueden portar un marcador detectable, o pueden conjugarse con una toxina o enzima (por ejemplo mediante un enlace de peptidilo o enlazador).

Los marcadores detectables incluyen radiomarcadores tales como ^{131}I o ^{99}Tc , que pueden unirse a anticuerpos de la invención usando química convencional conocida en la técnica de la captura de imágenes de anticuerpos. Los marcadores también incluyen marcadores enzimáticos tales como peroxidasa de rábano rústico. Los marcadores incluyen además restos químicos tales como biotina que puede detectarse mediante unión con un resto detectable afín específico, por ejemplo avidina marcada.

Cuando la característica adicional es un dominio o un marcador polipeptídico, el anticuerpo puede producirse mediante técnicas recombinantes, es decir mediante la expresión de ácido nucleico que codifica una fusión del anticuerpo y el dominio adicional.

Miembros de unión a diana adicionales de la invención

Variantes de secuencia

Pueden obtenerse variantes de los dominios VH y VL y CDR cuyas secuencias se exponen en el presente documento y que pueden emplearse en anticuerpos para IL-25 por medio de métodos de alteración o mutación de secuencias y exploración. Dichos métodos también se proporcionan por la presente invención.

Un miembro de unión a diana también puede ser uno que compite por la unión con antígeno con cualquier miembro de unión a diana que se une con el antígeno y comprende un miembro de unión a diana, dominio VH y/o VL desvelado en el presente documento, o CDR3 VH, de 2C3, o una variante de cualquiera de estos cuya secuencia se expone sustancialmente en el presente documento. Por lo tanto, también se describe un miembro de unión a diana que comprende un sitio de unión a antígeno de anticuerpo humano que compite con 2C3 por la unión con IL-25. La

competición entre miembros de unión puede ensayarse fácilmente *in vitro*, por ejemplo usando ELISA y/o marcando una molécula indicadora específica con un miembro de unión que puede detectarse en presencia de otro u otros miembros de unión no marcados, para permitir la identificación de miembros de unión a diana que se unen con el mismo epítipo o un epítipo solapante.

Están disponibles en la técnica diversos métodos para obtener miembros de unión a diana contra IL-25 y que pueden competir con 2C3 por la unión con IL-25.

De acuerdo con la presente invención pueden emplearse variantes de secuencia de aminoácidos de dominio variable de cualquiera de los dominios VH y VL cuyas secuencias se desvelan específicamente en el presente documento, como se analiza. Las variantes particulares pueden incluir una o más alteraciones de secuencia de aminoácidos (adición, supresión, sustitución y/o inserción de un resto de aminoácido), quizá menos de aproximadamente 20 alteraciones, menos de aproximadamente 15 alteraciones, menos de aproximadamente 10 alteraciones o menos de aproximadamente 5 alteraciones, 4, 3, 2 o 1. Pueden realizarse alteraciones en una o más regiones marco conservadas y/o una o más CDR.

En un aspecto, una secuencia de aminoácidos de CDR sustancialmente como se expone en el presente documento se porta como una CDR en un dominio variable humano o una parte sustancial del mismo. Las secuencias de CDR3 VH sustancialmente como se expone en el presente documento representan realizaciones preferidas de la presente invención y se prefiere que cada una de estas se porte como una CDR3 VH en un dominio variable de cadena pesada humana o una parte sustancial del mismo.

Por "sustancialmente como se expone" se entiende que la CDR o el dominio VH o VL relevante de la invención será idéntico o altamente similar a las regiones específicas cuya secuencia se expone en el presente documento. Por "altamente similar" se contempla que de 1 a 5, preferentemente de 1 a 4 tal como de 1 a 3 o 1 o 2, o 3 o 4, sustituciones de aminoácidos pueden realizarse en la CDR y/o dominio VH o VL.

Pueden generarse variantes de secuencia de anticuerpos de la invención llevando a cabo mutagénesis aleatoria de uno o ambos de los genes VH y/o VL de 2C3 para generar mutaciones dentro del dominio variable completo. Dicha técnica se describe en Gram *et al* (1992, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89: 3576-3580), que usó PCR propensa a errores.

Otro método que puede usarse es dirigir la mutagénesis a regiones CDR de genes VH o VL. Dichas técnicas se desvelan en Barbas *et al*, (1994, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91: 3809-3813) y Schier *et al* (1996, J. Mol. Biol. 263: 551-567).

Todas las técnicas descritas anteriormente se conocen como tales en este campo y en sí mismas no forman parte de la presente invención. El experto en la materia será capaz de usar dichas técnicas para proporcionar anticuerpos de la invención usando metodología rutinaria en este campo.

En consecuencia, en un aspecto adicional la invención proporciona un método para obtener un anticuerpo contra IL-25 que comprende:

proporcionar un ácido nucleico de partida que codifica un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias de CDR de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4;
modificar dicho ácido nucleico para alterar la secuencia o las secuencias de CDR;
expresar dicho anticuerpo modificado; y
ensayar dichos anticuerpos modificados con respecto a unión contra IL-25 y seleccionar dicho anticuerpo modificado que se une a IL-25 para obtener un anticuerpo contra IL-25.

Preferentemente la modificación se realizará en una pluralidad de moléculas de ácido nucleico de partida para proporcionar un repertorio de secuencias modificadas que tienen diversas afinidades de unión.

En un aspecto, el ácido nucleico de partida comprende las tres CDR de cadena pesada de SEQ ID NO: 2, bien en forma de SEQ ID NO: 2 en sí mismo o portadas en otra secuencia de marco conservado.

En una realización, las modificaciones pueden dirigirse a una única CDR, por ejemplo la CDR3 o las modificaciones pueden dirigirse a dos o tres regiones CDR simultáneamente.

Producción de miembros de unión a diana basados en CDR3

Pueden obtenerse dominios variables empleados en la invención de cualquier línea germinal o dominio variable humano reordenado, o puede ser un dominio variable sintético basado en secuencias consenso de dominios variables humanos conocidos. Puede introducirse una secuencia de CDR de la invención (por ejemplo CDR3) en un repertorio de dominios variables que carecen de una CDR (particularmente CDR3), usando tecnología de ADN recombinante.

Por ejemplo, Marks *et al* (Bio/Technology, 1992, 10: 779-783) describen métodos para producir repertorios de dominios variables de anticuerpos en los que se usan cebadores consenso dirigidos a o adyacentes al extremo 5' del área de dominio variable junto con cebadores para la tercera región marco conservada de genes VH humanos para proporcionar un repertorio de dominios variables VH que carezcan de una CDR3. Marks *et al* describen además cómo este repertorio puede combinarse con una CDR de un anticuerpo particular. Usando técnicas análogas, las secuencias derivadas de CDR3 de la presente invención pueden redistribuirse con repertorios de dominios VH o VL que carecen de una CDR3, y los dominios VH o VL redistribuidos completos combinarse con un dominio VL o VH afin para proporcionar miembros de unión a diana de la invención. El repertorio puede después presentarse en un sistema hospedador adecuado tal como el sistema de presentación en fagos del documento WO92/01047 de modo que pueden seleccionarse miembros de unión a diana adecuados. Un repertorio puede consistir en cualquiera desde 10^4 miembros individuales hacia arriba, por ejemplo de 10^6 a 10^8 o 10^{10} miembros.

También se desvelan técnicas de redistribución o combinatorias análogas en Stemmer (Nature, 1994, 370: 389-391), que describe la técnica en relación con un gen de β -lactamasa pero observa que el enfoque puede usarse para la generación de anticuerpos.

También se describe un método para preparar un miembro de unión a diana específico para IL-25, comprendiendo dicho método:

- (a) proporcionar un repertorio de partida de ácidos nucleicos que codifican un dominio VH que incluye una CDR3 para reemplazar o carecen de una región codificante de CDR3;
- (b) combinar dicho repertorio con un ácido nucleico donante que codifica una secuencia de aminoácidos sustancialmente como se expone en el presente documento para una CDR3 VH de modo que dicho ácido nucleico donante se inserte en la región CDR3 en el repertorio, para proporcionar un repertorio de productos de ácidos nucleicos que codifican un dominio VH;
- (c) expresar los ácidos nucleicos de dicho repertorio de producto;
- (d) seleccionar un miembro de unión a diana específico para una IL-25; y
- (e) recuperar dicho miembro de unión a diana o ácido nucleico que lo codifica.

El repertorio de productos puede co-expresarse, a partir del mismo vector o un vector diferente con un dominio VL. El dominio VL puede ser el dominio VL de la presente invención o puede ser uno o más dominios VL diferentes, como se describe posteriormente en relación con redistribución de cadenas.

Puede emplearse un método análogo en el que una CDR3 VL de la invención se combina con un repertorio de ácidos nucleicos que codifican un dominio VL que incluye una CDR3 para reemplazar o carece de una región codificante de CDR3. Como con el método anterior, el repertorio de productos VL puede co-expresarse, a partir del mismo vector o un vector diferente, con un dominio VH. El dominio VH puede ser el dominio VH de la presente invención o puede ser uno o más dominios VH diferentes, como se describe posteriormente en relación con redistribución de cadenas.

De forma similar, pueden injertarse una o más, o las tres CDR en un repertorio de dominios VH o VL que después se exploran con respecto a un miembro de unión a diana o miembros de unión a diana específicos para IL-25.

Redistribución de cadenas

Un aspecto adicional de la invención proporciona un método para obtener un dominio de unión a antígeno de anticuerpo para IL-25, comprendiendo el método proporcionar combinación de un dominio VH de un anticuerpo de la invención (incluyendo variantes como se ha analizado anteriormente) con uno o más dominios VL, y ensayar la combinación VH/VL o combinaciones para dominios de unión a antígeno-anticuerpo para IL-25.

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

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

Esto se puede conseguir mediante métodos de exploración de presentación en fagos usando el denominado enfoque combinatorio doble jerárquico como se desvela en el documento WO92/01047 en el que se usa una colonia individual que contiene un clon de cadena H o L para infectar una biblioteca completa de clones que codifican la otra cadena (L o H) y el miembro de unión a diana de dos cadenas resultantes se selecciona de acuerdo con técnicas de presentación en fagos tales como las descritas en esa referencia.

También se describe un método para selección de una molécula de anticuerpo para IL-25, comprendiendo el método:

(a) proporcionar un dominio VH que comprende un miembro de unión a diana que se une a IL-25 y que comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende una CDR3 VH con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7;

(b) combinar dicho dominio VH con una pluralidad de dominios VL de anticuerpo para proporcionar moléculas de anticuerpo;

(c) explorar dichas moléculas de anticuerpo con respecto a unión a IL-25; y

(d) seleccionar una molécula de anticuerpo que se une a IL-25.

Los dominios VH y VL pueden proporcionarse en forma de proteínas expresadas por ADN recombinante, particularmente por un ADN de fago o fagémido.

La pluralidad de dominios VL pueden ser cualquiera de 10^4 dominios individuales hacia arriba, por ejemplo de 10^6 a 10^8 o 10^{10} dominios.

IL-25

IL-25, también denominada en la técnica IL-17E, está disponible de fuentes comerciales (por ejemplo R&D Systems, MN, Estados Unidos) o puede clonarse o sintetizarse por referencia a las secuencias de IL-25 disponibles en la técnica. IL-25 murina (Proteína de NCBI NP_542767) se describe en Hurst *et al* (Ref. 7 posterior). IL-25 humana (Proteína de NCBI Q9H293) se describe en Fort *et al* (Ref. 4 posterior). Para producción de anticuerpos o uso en inmunoensayos, pueden usarse fragmentos de IL-25 recombinante, particularmente los truncados en el extremo N terminal. Por ejemplo, IL-25 humana recombinante disponible en el mercado (IL-17E) comprende la secuencia proteica madura de Tyr 33 – Gly 177 del n.º de Referencia Q9H293 y la IL-25 murina disponible en el mercado comprende los restos Val 17 - Ala 169 de IL-17E de ratón (n.º de Referencia NP_542767).

Ácidos nucleicos y vectores.

En aspectos adicionales, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un anticuerpo de acuerdo con la presente invención, y métodos para preparar un anticuerpo de la invención que comprenden expresar dicho ácido nucleico en condiciones para provocar la producción de dicho anticuerpo, y recuperarlo.

Otro aspecto de la presente invención proporciona ácido nucleico, generalmente aislado, que codifica una secuencia de CDR VH o CDR VL desvelada en el presente documento, especialmente una CDR VH seleccionada de SEQ ID NO: 5, 6 y 7, una CDR VL seleccionada de SEQ ID NO: 8, 9 y 10, más preferentemente CDR3 VH de 2C3 (SEQ ID NO: 7).

Los ácidos nucleicos de la invención pueden comprender las secuencias, o partes relevantes de las mismas (por ejemplo regiones que codifican CDR) de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3. Sin embargo, el uso codónico puede variarse, por ejemplo para optimizar la expresión de la secuencia en una célula hospedadora deseada.

La presente invención proporciona además un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo de la presente invención. El ácido nucleico incluye ADN y ARN. En un aspecto preferido, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica una CDR o dominio VH o VL de la invención como se ha definido anteriormente.

El ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede comprender ADN o ARN y puede ser total o parcialmente sintético. La referencia a una secuencia de nucleótidos como se expone en el presente documento abarca una molécula de ADN con la secuencia específica y abarca una molécula de ARN con la secuencia específica en la que T se sustituye por U, a no ser que el contexto requiera otra cosa.

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

Los vectores adecuados pueden elegirse o construirse, conteniendo secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según sea apropiado. Para más detalles véase, por ejemplo, Cloning: a Laboratory Manual: 2ª edición, Sambrook *et al.*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Los vectores de la invención también incluyen vectores virales capaces de infectar células humanas *in vivo*, por ejemplo vectores adenovirales, retrovirales y de virus adeno-asociados. Dichos vectores pueden ser útiles para la expresión de un anticuerpo de la invención en las células de un sujeto humano o animal, para proporcionar producción y suministro del anticuerpo a dicho sujeto.

Una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención estará en un aspecto unida operativamente a un promotor para efectuar la expresión del miembro de unión a diana en una célula hospedadora.

La secuencia puede incluir en su extremo 5' una secuencia líder para facilitar la expresión y/o secreción del anticuerpo en y/o de una célula hospedadora. Se conocen como tales en la técnica numerosas secuencias líder adecuadas y pueden seleccionarse por un experto habitual en la materia teniendo en cuenta la célula hospedadora.

- 5 Se describen en detalle muchas técnicas y protocolos conocidos para manipulación de ácido nucleico, por ejemplo en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas, en *Current Protocols in Molecular Biology*, Segunda Edición, Ausubel *et al.* eds., John Wiley & Sons, 1992.

10 *Células hospedadoras y producción de miembros de unión a diana*

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

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

- 20 Un aspecto adicional más proporciona un método de producción de un anticuerpo de la invención, incluyendo el método provocar expresión a partir de ácido nucleico codificante. Dicho método puede comprender cultivar células hospedadoras en condiciones para producción de dicho anticuerpo.

- 25 Después de producción mediante expresión puede aislarse y/o purificarse un dominio VH o VL, o anticuerpo, usando cualquier técnica adecuada, y después usarse según sea apropiado. Un método de producción puede comprender una etapa de aislamiento y/o purificación del producto.

- 30 Después de purificación del producto el anticuerpo puede modificarse mediante medios físicos o químicos, por ejemplo para introducir grupos protectores que alteran, por ejemplo aumentan, la estabilidad o semivida biológica de la proteína. Por ejemplo, la pegilación de proteínas para conseguir dichos efectos se conoce como tal en la técnica y los anticuerpos de la invención pueden estar en forma pegilada.

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

- 35 La presente invención también proporciona una célula hospedadora recombinante que comprende uno o más ácidos nucleicos o vectores como los anteriores. Un ácido nucleico que codifica cualquier CDR, dominio VH o VL, o anticuerpo como se proporciona forma en sí mismo un aspecto de la presente invención, como lo hace un método de producción del producto codificado, cuyo método comprende expresión a partir de ácido nucleico codificante del mismo.

- 40 Se conocen bien sistemas para clonación y expresión de un polipéptido en diversas células hospedadoras diferentes. Las células hospedadoras adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, levadura y sistemas de baculovirus. Las líneas celulares de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino, células HeLa, células de riñón de cría de hámster, células de melanoma de ratón NS0, células de mieloma de rata YB2/O y muchas otras. Un hospedador bacteriano preferido habitual es *E. coli*.

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

55 *Composiciones*

- 60 Por lo tanto las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención, y para uso de acuerdo con la presente invención, pueden comprender, además del principio activo, un excipiente, vehículo, tampón, estabilizante farmacéuticamente aceptable u otros materiales bien conocidos por los expertos en la materia. Dichos materiales deberían ser no tóxicos y no debería interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser oral, o por inyección, por ejemplo intravenosa.

- 65 Pueden prepararse formulaciones terapéuticas del anticuerpo para almacenamiento mezclando el anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables opcionales (véase por ejemplo "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20ª Edición, 2000, pub. Lippincott, Williams y Wilkins), en forma de polvo liofilizado o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e

incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como Tween, Pluronic o polietilenglicol (PEG).

Para usar el anticuerpo para administración *in vivo* este debe ser estéril. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de esterilización por filtración, antes de o después de liofilización y reconstitución. El anticuerpo habitualmente se almacenará en forma liofilizada o en solución.

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

Para inyección intravenosa, o inyección en el sitio aquejado, el principio activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que está sin pirógenos y tiene pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la materia relevantes son capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer, inyección de Ringer con Lactato. Pueden incluirse, según se requiera, conservantes, estabilizadores, tampones, antioxidantes y/u otros adyuvantes.

Usos terapéuticos de la invención

La presente invención posibilita por primera vez una demostración de que los anticuerpos contra IL-25 son eficaces en la prevención o reducción de hipersensibilidad de las vías respiratorias *in vivo*, un síntoma clave del asma. Por tanto en un aspecto la invención proporciona un anticuerpo como se define en las reivindicaciones para uso en un método para prevenir o reducir la hipersensibilidad de las vías respiratorias en un sujeto (por ejemplo un ser humano) que necesite el tratamiento. En otro aspecto la invención proporciona un anticuerpo como se define en las reivindicaciones para uso en un método para prevenir, reducir o tratar el asma en un sujeto que necesite tratamiento que comprende administrar al sujeto una molécula de anticuerpo que se una con IL-25.

Los métodos anteriores pueden practicarse con anticuerpos (incluyendo composiciones de los mismos) de acuerdo con la presente invención, que son útiles en la unión con y preferentemente antagoniza la acción de IL-25, con potencial terapéutico en diversas enfermedades y trastornos en los que IL-25 desempeña un papel. Los métodos también pueden practicarse con otros miembros de unión a diana (incluyendo composiciones de los mismos) que se unen con IL-25 que puede obtenerse como se describe posteriormente en los ejemplos adjuntos.

Pueden usarse anticuerpos (incluyendo composiciones de los mismos) de acuerdo con la invención en un método de tratamiento (incluyendo tratamiento profiláctico) o diagnóstico en un sujeto animal o humano. Dicho método de tratamiento o diagnóstico (que puede incluir tratamiento profiláctico) puede comprender administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención. Se analizan además posteriormente enfermedades y trastornos a modo de ejemplo.

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

Las indicaciones clínicas en las que puede usarse un anticuerpo anti-IL-25 para proporcionar beneficio terapéutico incluyen cualquier afección en la que IL-25 tenga consecuencias patológicas. Por lo tanto en general, el anticuerpo de la invención puede usarse en el tratamiento de cualquier afección asociada con una respuesta de Th-2 no deseada. Por ejemplo, el anticuerpo de la invención puede usarse para el tratamiento de alergia y asma, particularmente asma.

Puede proporcionarse tratamiento anti-IL-25 mediante inyección (por ejemplo por vía intravenosa) o mediante métodos de suministro local. Pueden suministrarse anti-IL-25 mediante tecnologías mediadas por genes. Estrategias de formulación alternativas pueden proporcionar preparaciones adecuadas para vía oral o de supositorio. La vía de administración puede determinarse por las características fisicoquímicas del tratamiento, por consideraciones especiales para la enfermedad, para optimizar la eficacia o para minimizar los efectos secundarios.

De acuerdo con la presente invención, pueden administrarse composiciones proporcionadas a individuos. La administración es preferentemente en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo esta suficiente para mostrar beneficio a un paciente. Dicho beneficio puede ser al menos alivio de al menos un síntoma. La cantidad real administrada, y la velocidad y ciclo temporal de administración, dependerán de la naturaleza y gravedad de lo que se trate. La prescripción de tratamiento, por ejemplo decisiones sobre dosificación, etc., está dentro de la

responsabilidad de los practicantes generales y otros doctores en medicina. Se conocen bien en la técnica dosis apropiadas de anticuerpo; véase Ledermann J.A. *et al.* (1991) *Int. J. Cancer* 47: 659-664; Bagshawe K.D. *et al.* (1991) *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals* 4: 915-922.

5 La dosis precisa dependerá de varios factores, incluyendo si el anticuerpo es para diagnóstico o para tratamiento, el tamaño y localización del área para tratar, la naturaleza precisa del anticuerpo (por ejemplo anticuerpo completo, fragmento o diacuerpo) y la naturaleza de cualquier marcador detectable u otra molécula unida al anticuerpo. Una
10 dosis de anticuerpo típica estará en el intervalo de 0,5 mg-1,0 g, y esta puede administrarse como una embolada por vía intravenosa. Otros modos de administración incluyen infusión intravenosa durante varias horas, para conseguir una dosis acumulativa total similar. Esta es una dosis para un tratamiento individual de un paciente adulto, que puede ajustarse proporcionalmente para niños y bebés, y también ajustarse para otros formatos de anticuerpo en proporción al peso molecular. Los tratamientos pueden repetirse a intervalos diarios, dos veces por semana, semanales o mensuales, a la discreción del médico.

15 Un modo adicional de administración emplea pre-recubrimiento de, o incorporación de otro modo en, dispositivos intravasculares, para los que la cantidad óptima de anticuerpo se determinará por medio de experimentos apropiados.

20 Una molécula de anticuerpo en algunas realizaciones preferidas de la invención es un fragmento monomérico, tal como F(ab) o scFv. Dichos fragmentos de anticuerpo pueden tener la ventaja de una semivida relativamente corta y menor riesgo de activación plaquetaria, que puede estar provocada por agrupamiento de receptores. El agrupamiento que da lugar a la activación plaquetaria podría ser de moléculas de IL-25 o de IL-25 con moléculas de FcγRII, por ejemplo.

25 Si se usa un anticuerpo completo, es preferentemente una forma que es incapaz de activar y/o destruir plaquetas. El isotipo IgG4 o como alternativa isotipos "de diseño" derivados de la cadena principal de IgG1 (novel Fc gene constructs WO99/58572, Clark, Armour, Williamson) son elecciones preferidas. Pueden usarse fragmentos de anticuerpo más pequeños, tales como F(ab')₂. Además pueden usarse anticuerpos completos o fragmentos (por ejemplo F(ab')₂ o diacuerpos) con especificidad epitópica doble (por ejemplo para los epitopos reconocidos por scFv 2C3). Aunque dicha realización puede promover el agrupamiento de receptores, una alta velocidad de asociación con receptores individuales puede descartar este problema.

35 Habitualmente se administrarán anticuerpos de la presente invención en forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además del anticuerpo.

40 Un anticuerpo de la invención puede administrarse solo o en combinación con otros tratamientos, bien simultáneamente o bien secuencialmente dependiendo de la afección para tratar. Otros tratamientos pueden incluir la administración de dosis adecuadas de fármacos analgésicos como fármacos antiinflamatorios no esteroideos (por ejemplo aspirina, paracetamol, ibuprofeno o ketoprofeno) u opiáceos tales como morfina; la administración de antieméticos; o la administración de al menos otro compuesto activo contra asma, en general un agente broncodilatador que produce relajación de las vías respiratorias o potencia la eliminación de moco, por ejemplo un beta-agonista (por ejemplo salbutamol, salmeterol), cromoglicato disódico, esteroides o un inhibidor de PDE_{IV}.

Métodos de ensayo

45 También se describe un método que comprende provocar o permitir la unión de un miembro de unión a diana como se proporciona en el presente documento a IL-25. Como se ha observado, dicha unión puede tener lugar *in vivo*, por ejemplo después de la administración de un miembro de unión a diana, o ácido nucleico que codifica un miembro de unión a diana, o puede tener lugar *in vitro*, por ejemplo en ELISA, transferencia de Western, inmuno-citoquímica, inmuno-precipitación o cromatografía de afinidad.

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

55 Las reactividades de anticuerpos en una muestra pueden determinarse por cualquier medio apropiado. El radioinmunoensayo (RIA) es una posibilidad. El antígeno marcado con radiactividad se mezcla con antígeno no marcado (la muestra de ensayo) y se permite que se una con el anticuerpo. El antígeno unido se separa físicamente del antígeno no unido y la cantidad de antígeno radioactivo unido con el anticuerpo se determina. Cuanto más antígeno haya en la muestra de ensayo menos antígeno radioactivo se unirá con el anticuerpo. También puede usarse un ensayo de unión competitiva con antígeno no radiactivo, usando antígeno o un análogo ligado a una molécula indicadora. La molécula indicadora puede ser un fluorocromo, fósforo o colorante de láser con características de absorción o emisión aisladas espectralmente. Los fluorocromos adecuados incluyen fluoresceína, rodamina, ficoeritrina y Texas Red. Los colorantes cromogénicos adecuados incluyen diaminobenzidina.

65 Otros indicadores incluyen partículas coloidales macromoleculares o un material en partículas tal como perlas de látex que están coloreadas, son magnéticas o paramagnéticas, y agentes activos biológica o químicamente que

pueden provocar directa o indirectamente que las señales detectables se observen visualmente, se detecten electrónicamente o se registren de otro modo. Estas moléculas pueden ser enzimas que catalizan reacciones que desarrollan o cambian colores o provocan cambios en propiedades eléctricas, por ejemplo. Pueden ser molecularmente excitables, de modo que las transiciones electrónicas entre estados de energía den como resultado absorciones o emisiones espectrales características. Pueden incluir entidades químicas usadas junto con biosensores. Pueden emplearse sistemas de detección de biotina/avidina o biotina/estreptavidina y fosfatasa alcalina.

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

También se describe el uso de un miembro de unión a diana como anteriormente para medir los niveles de antígeno en un ensayo de competición, es decir un método para medir el nivel de antígeno en una muestra empleando un miembro de unión a diana como se proporciona por la presente invención en un ensayo de competición. Esto puede ser cuando no se requiera la separación física del antígeno unido con respecto al no unido. Una posibilidad es la unión de una molécula indicadora con el miembro de unión a diana de modo que se produzca un cambio físico u óptico en la unión. La molécula indicadora puede generar directa o indirectamente señales detectables, y preferentemente medibles. El enlace de moléculas indicadoras puede ser directa o indirectamente, covalentemente, por ejemplo mediante un enlace peptídico o de forma no covalente. La unión mediante un enlace peptídico puede ser como resultado de la expresión recombinante de una fusión génica que codifica anticuerpo y molécula indicadora.

La presente divulgación también posibilita medir niveles de antígeno directamente, empleando un miembro de unión a diana de acuerdo con la invención por ejemplo en un sistema biosensor.

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

La presente divulgación se extiende además a un miembro de unión a diana que compite por la unión con IL-25 con cualquier miembro de unión a diana que se une con el antígeno y que comprende un dominio V que incluye una CDR con aminoácidos sustancialmente como se expone en el presente documento o un dominio V con secuencia de aminoácidos sustancialmente como se expone en el presente documento. La competición entre miembros de unión puede ensayarse fácilmente *in vitro*, por ejemplo marcando con una molécula indicadora específica un miembro de unión que puede detectarse en presencia de otro miembro u otros miembros de unión no marcados, para permitir la identificación del miembro de unión a diana que se unen con el mismo epítipo o un epítipo solapante. La competición puede determinarse por ejemplo usando ELISA o citometría de flujo.

Puede usarse una reacción de competición para seleccionar uno o más miembros de unión a diana tales como los derivados de 2C3, que pueden tener una o más propiedades adicionales o mejoradas. Esto es análogo al método de selección para 2C3 de acuerdo con la invención, excepto que IL-25 no se eluye de su mini-ligando sino de una molécula de anticuerpo. Esto puede ser importante ya que debería producir una mayor proporción de anticuerpos descendientes que compiten directamente con el parental. De hecho, dichos anticuerpos descendientes como se seleccionan pueden tener una mayor afinidad por el antígeno que el parental (permitiendo potenciaciones de la avidez que pueden resultar de la presentación de más de una molécula de anticuerpo por fago). Los métodos actuales para seleccionar anticuerpos de fagos "descendientes" de afinidad mejorada incluyen:

usar concentraciones de antígeno diana (marcado) menores que la constante de disociación del anticuerpo parental original;

usar antígeno diana no marcado en exceso como un competidor como se demuestra en Hawkins *et al* (1992). Sin embargo, no especifican necesariamente que el anticuerpo "mejorado" deba desplazar/ocupar el mismo epítipo que el parental. La incorporación de la etapa de elución debería producir una mayor proporción de anticuerpos descendientes que sí desplazan al parental. Los anticuerpos descendientes seleccionados de esta manera pueden unirse con un epítipo muy similar al del anticuerpo parental, pero con mayor afinidad.

En el ensayo con respecto a competición puede emplearse un fragmento peptídico del antígeno, especialmente un péptido que incluye un epítipo de interés. Puede usarse un péptido que tiene la secuencia epitópica más uno o más aminoácidos en uno de los extremos. Puede decirse que dicho péptido "consiste esencialmente" en la secuencia especificada. Los miembros de unión a diana de acuerdo con la presente invención pueden ser tales que su unión con el antígeno se inhiba por un péptido con o que incluya la secuencia proporcionada. Al ensayar esto, puede usarse un péptido con una de las secuencias más uno o más aminoácidos.

Pueden aislarse miembros de unión a diana que se unen con un péptido específico por ejemplo de una biblioteca de presentación en fagos seleccionando con el péptido o los péptidos.

Ejemplos

Se ilustrarán ahora aspectos y realizaciones de la presente invención como ejemplo con referencia a la siguiente experimentación.

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos contra IL-25

Se exploró un gran panel de anticuerpos, generado en ratones *il25^{-/-}* inmunizados contra IL-25 murina (R&D Systems). Se descubrió que uno de estos anticuerpos anti-IL-25 (2C3) inhibía tanto la interacción entre rmlL-25 y una proteína de fusión mIL-25R-Fc soluble dependiente de la dosis como la producción dependiente de IL-25 de IL-13 mediante células no B, no T de ratón primarias en un bioensayo *in vitro*. El anticuerpo también inhibió la interacción entre hIL-25 y una fusión de hIL-25R-Fc. La combinación de estas propiedades se investigó adicionalmente en sistemas *in vivo* para demostrar la utilidad en el tratamiento del asma.

Ejemplo 2: Modelo experimental de asma alérgica

Los ratones BALB/c se sensibilizaron en primer lugar con el antígeno ovoalbúmina (OVA), antes de exponerse a OVA aerosolizado. Los ratones BALB/c sensibilizados y expuestos desarrollaron un fenotipo de asma distintivo. Este se caracterizó por mayor AHR después de exposición al agente provocador metacolina, infiltración de eosinófilos de las vías respiratorias, hiperplasia de células caliciformes y secreción de IgE en suero, en comparación con ratones BALB/c de control expuestos con PBS (Fig. 1).

Por el contrario, la administración de mAb anti-IL-25 antes de cada sensibilización y aerosolización con OVA dio como resultado una anulación notable en AHR después de exposición a metacolina aerosolizada con valores de resistencia comparables a los ratones de control de PBS (Fig. 1A). La administración de un mAb de control de isotipo coincidente no suprimió AHR (Fig. 1A).

El mAb anti-IL-25 también redujo significativamente los niveles de infiltración celular alrededor de la vasculatura pulmonar (Fig. 1B y 3A), hiperplasia de células caliciformes en las vías respiratorias (Fig. 1C y 3B) y niveles de IgE en suero específico de antígeno (Fig. 1D).

El análisis del lavado broncoalveolar (BAL) demostró que la infiltración de eosinófilos también se suprimía significativamente después de administración de mAb anti-IL-25 en comparación con los ratones tratados con control de isotipo (Fig. 1E). Ya que se sabe que las citocinas de tipo 2 regulan estas funciones efectoras se determinaron los niveles de citocinas secretadas a partir de células aisladas de los ganglios linfáticos mediastinales de drenaje después de reestimulación de antígenos. A diferencia de los niveles elevados de citocinas de tipo 2, IL-4, IL-5 e IL-13, inducidos por sensibilización de OVA y exposición en ratones BALB/c, la administración de mAb anti-IL-25 dio como resultado una reducción significativa en los niveles de estas citocinas (Fig. 1F).

Estos datos apoyan la hipótesis de que bloqueando la señalización de IL-25 se ha restringido la producción de citocinas de tipo 2 lo que conduce a la anulación de las funciones efectoras de tipo 2, incluyendo inflamación y AHR. Por lo tanto, los antagonistas de IL-25 suprimen eficazmente la inflamación de tipo 2 si se administran desde el inicio de la respuesta.

Materiales y métodos:

Ratones

Se obtuvieron ratones BALB/c de Harlan Reino Unido y se mantuvieron en el SABU/CBS o instalaciones del Instituto de Corazón y Pulmón Nacional en ambientes sin patógenos específicos. Todos los experimentos animales defendidos en este informe se llevaron a cabo con la aprobación del Ministerio del Interior del Reino Unido.

Sensibilidad y exposición a alérgenos

Los ratones BALB/c (6-12 semanas) se sensibilizaron mediante administración intraperitoneal de ovoalbúmina (20 µg/inyección) en complejo con alumbre, o solamente alumbre (controles), los días 0 y 12. La administración de aerosol de ovoalbúmina al 1 % se llevó a cabo los días 19, 20, 21 durante 20 minutos al día. El día 22 los animales se analizaron usando pletismografía para evaluar AHR.

Administración de anticuerpos monoclonales anti-rmlL-25

Se indujo hipersensibilidad de las vías respiratorias (AHR) como se ha descrito y se administró mAb anti-IL-25 (500 µg/dosis) por vía intraperitoneal el día antes de cada sensibilización de OVA intraperitoneal, el día antes de la exposición a OVA inicial en los pulmones y 4 horas antes de cada aerosolización de OVA. En experimentos adicionales se administró mAb anti-IL-25 (500 µg/dosis) por vía intraperitoneal solamente el día antes de cada aerosolización. Los ratones de control recibieron solución salina o control de isotipo (500 µg/dosis) en lugar de mAb

anti-IL25. El control de isotipo fue anti-c-myc (IgG1 de ratón, clon 9E10.2).

Medición de sensibilidad de las vías respiratorias

Los animales se anestesiaron, se les realizaron traqueotomías y se les colocó en un ventilador (serie SAR-830, CWE Inc) a una velocidad de 150 respiraciones/min, con un volumen corriente de 0,2 ml. Los ratones se supervisaron en un pletismógrafo de cuerpo completo (EMKA Technologies, París) y se evaluó la presión transpulmonar mediante un transductor en línea. Después de registrar la resistencia pulmonar de línea basal estable, se administraron concentraciones crecientes de cloruro de acetil- β -metilcolina (metacolina) (Sigma, Dorset, Reino Unido) mediante aerosol durante 15 s a cada concentración con un nebulizador ultrasónico y se registró la resistencia pulmonar durante un periodo 5 min. Se usó software IOX para analizar la resistencia de las vías respiratorias, la distensibilidad y los parámetros pulmonares convencionales.

Lavado broncoalveolar (BAL)

Se sacrificaron ratones por dislocación cervical y se inyectaron 4 alícuotas x 500 μ l de PBS a través de la traqueotomía y se recuperaron. Se realizaron recuentos celulares diferenciales en 150 células en cytopspin teñidos con giemsa.

Ejemplo 3: Administración antes de la exposición

También se evaluó si el mAb anti-IL-25 era eficaz cuando se administraba solamente antes de la exposición a aerosolización de OVA. El tratamiento con el mAb anti-IL-25 redujo drásticamente la resistencia de las vías respiratorias inducida por provocación de metacolina incluso cuando se proporcionó más tarde en la respuesta (Fig. 2A). Por el contrario, la administración del mAb de isotipo coincidente de control no anuló AHR.

Significativamente, el análisis de secciones histológicas pulmonares no mostró cambios significativos en los niveles de infiltrado celular alrededor de los vasos sanguíneos (Fig. 2B) o hiperplasia de células caliciformes de las vías respiratorias (Fig. 2C) entre ratones tratados con mAb anti-IL-25 y los controles de BALB/c expuestos a OVA o los controles tratados con mAb de isotipo coincidente.

Además, no hubo reducción observable en la proporción de eosinófilos en el fluido de BAL (Fig. 2D) o los niveles de IgE de suero específico de antígeno (Fig. 2E), después de administración de mAb anti-IL-25. Sorprendentemente, los niveles de las citocinas de tipo 2 IL-5 e IL-13 permanecieron comparables a los de los controles de BALB/c expuestos a OVA o los controles tratados con mAb de isotipo coincidente después de reestimulación de antígeno (Fig. 2F) y los niveles de IL-13 en el BAL también permanecieron sin cambios. Por lo tanto, la administración de anti-IL-25 durante la fase de exposición de la respuesta puede anular específicamente AHR incluso cuando las citocinas de tipo 2 y sus efectores corriente abajo no están regulados negativamente. Estos hallazgos sugieren que IL-25 puede iniciar AHR mediante una ruta que es independiente de la respuesta de tipo 2 clásica.

Materiales y métodos

Los materiales y métodos fueron como se ha descrito anteriormente para el ejemplo 2, con la adición de:

Recogida e histología de tejido pulmonar

Se fijaron pulmones en formalina (formaldehído 10 % en solución salina 0,9 %) para análisis histológico. Las secciones pulmonares se tiñeron con giemsa para infiltrado inflamatorio y Schiff ácido periódico (PAS) para células caliciformes. Se midieron células caliciformes teñidas con PAS en epitelio de las vías respiratorias con ocultación usando un sistema de puntuación numérico (0: <5 % de células caliciformes; 1: 5-25 %, 2: 25-50 %, 3: 50-75 %, 4: >75 %). La suma de las puntuaciones de vías respiratorias de cada pulmón se dividió por el número de vías respiratorias examinadas, 20-40 vías respiratorias/ratón, y se expresaron como una puntuación PAS en unidades arbitrarias. La inflamación se evaluó usando un sistema de puntuación numérico para evaluar los números de células de infiltración alrededor de vasos sanguíneos (0: capa de células inflamatorias de infiltración < 2 células de grosor alrededor del vaso; 1: 2-4 células de grosor, 2: 5-8 células de grosor, 3: > 8 células de grosor). La suma de puntuaciones de vías respiratorias de cada pulmón se dividió por el número de vasos examinados, 20-40 vías respiratorias/ratón y se expresó en unidades arbitrarias.

Ejemplo 4: IL-25 actúan mediante una ruta independiente de tipo 2

Se evaluó si rmlL-25 administrado de forma exógena podría inducir AHR potenciada incluso en ausencia de sensibilización o exposición al antígeno. Tan pronto como 16 horas después de la administración intranasal de rmlL-25 a ratones BALB/c se detectó resistencia de las vías respiratorias significativamente elevada (Fig. 3A). Informes previos han indicado el papel central desempeñado por IL-13 en fenotipo de asma y particularmente AHR. Para determinar si IL-25 estaba mediando su papel en AHR mediante IL-13 se administró rmlL-25 a ratones *il13^{-/-}*. De nuevo se observó AHR elevada después de tratamiento de rmlL-25 (Fig. 3B). Ya que también se ha mostrado que

las otras citocinas de tipo 2 contribuyen al genotipo de asma también se evaluó la respuesta de *il4^{-/-}il5^{-/-}il9^{-/-}il13^{-/-}* a rIL-25 administrada por vía intranasal. Incluso en ausencia de todas las citocinas de tipo 2 clásicas el tratamiento con IL-25 potenció AHR después de la provocación por metacolina (Fig. 3C). Estos datos apoyan un papel para IL-25 en el agravamiento de AHR mediante una ruta independiente de citocinas de tipo 2.

Materiales y métodos

Los materiales y métodos fueron como se ha descrito anteriormente para los ejemplos 2 y 3, con la adición de.

Ratones

Los ratones transgénicos *il4^{-/-}il5^{-/-}il9^{-/-}il13^{-/-}* (P. G. Fallon *et al.*, 2002. *Immunity* 17, 7) y ratones *il13^{-/-}* (G. J. McKenzie *et al.*, 1998. *Curr Biol.* 8, 339) en un fondo de BALB/c fueron como se ha descrito. Los ratones IL25^{-/-} en un fondo de C57BL/6 x 129 F2 fueron como se ha descrito (P. G. Fallon *et al.* 2006. *J. Exp. Med.* 203, 1105).

Administración de IL-25 intranasal

Se administraron a los ratones 1,8 µg de rIL-25 (R&D Systems) o 1,8 µg de rIL-13 (Peprotech) en 40 µl PBS por ratón por vía intranasal el día 0. Los animales de control recibieron solamente PBS.

Ejemplo 5: Clonación de dominios variables de 2C3

Se aisló ARN de tres subclones de 2c3 y se preparó ADNc por una reacción de transcripción inversa.

El ADNc de cadena pesada de inmunoglobulina (IgH) se amplificó por PCR usando un cebador de región VH 5' conservado, MHV7 (SEQ ID NO: 11) en combinación con un cebador de región constante IgG1 MHCG1 (SEQ ID NO: 12).

De forma similar, se amplificó cadena ligera de inmunoglobulina (IgK) usando un cebador de región IgK 5' conservado MKV9 (SEQ ID NO: 13) en combinación con el cebador de región constante kappa MKC (SEQ ID NO: 14).

La polimerasa termoestable Phusion (NEB F-531L) se usó durante el experimento para reacciones de PCR.

Los productos de amplificación de 2c3 de VH7 + MHCG1- iniciaron las reacciones de PCR a partir de tres ADNc independientes, se ligaron directamente en el vector pCRII®Blunt-TOPO® usando el kit de clonación TOPO-blunt® (Cat 45-0245), como lo hicieron los productos de amplificación de la reacción de amplificación de cadena ligera. Se clonaron bacterias *E. coli* TOP10 transformadas con las construcciones de vector pCRII-blunt ligado en placas de agar de LB-ampicilina-XGal, seleccionando colonias blancas en una rejilla de agar y en la mezcla de exploración de PCR. Los insertos de plásmido clonado se amplificaron por PCR. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en gel y se identificaron los productos predichos. Se procesaron cultivos de una noche (5 ml) de cada clon, produciendo el producto de amplificación por PCR del tamaño correcto, usando el Protocolo de Kit de Miniprep de Centrifugación QIAprep (cat 27106), para producir minipreps de plásmidos de ADN.

Los plásmidos se secuenciaron usando el Kit de Reacción Listo para Secuenciación en Ciclo BigDye® Terminator v3.0 (ABI cat. 4390242). Cada plásmido seleccionado se secuenció en ambas direcciones usando cebadores directo e inverso M13 sometidos a ciclos en una máquina de PCR GeneAmp9600. El análisis de secuencia electroforético se realizó en un secuenciador capilar ABI.

El ciclo completo de RT-PCR, clonación y análisis de secuencia de ADN se repitió para obtener tres conjuntos completamente independientes de información de secuencia para cada cadena de inmunoglobulina.

La secuencia de nucleótidos deducida completa de los genes de VH y V kappa se muestran como SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16, respectivamente. Estas secuencias incluyen las secuencias líderes al comienzo de cada segmento génico variable que codifica una secuencia señal que se usa para transportar las cadenas de anticuerpo de nueva síntesis al retículo endoplásmico; y no están presentes en las cadenas pesadas y ligeras finales.

Referencias

1. P. G. Fallon *et al.*, *Immunity* 17, 7 (Jul, 2002).
2. G. Grunig *et al.*, *Science* 282, 2261 (1998).
3. M. Wills-Karp *et al.*, *Science* 282, 2258 (1998).
4. M. M. Fort *et al.*, *Immunity* 15, 985 (Dec, 2001).
5. M. R. Kim *et al.*, *Blood* 100, 2330 (Oct 1, 2002).
6. G. Pan *et al.*, *J Immunol* 167, 6559 (Dic 1, 2001).
7. S. D. Hurst *et al.*, *J Immunol* 169, 443 (Jul 1, 2002).

8. T. A. Moseley, D. R. Haudenschild, L. Rose, A. H. Reddi, Cytokine Growth Factor Rev 14, 155 (Abr, 2003).
 9. P. G. Fallon *et al.*, J Exp Med 203, 1105 (17 Abr, 2006).
 10. A. M. Owyang *et al.*, J Exp Med 203, 843 (17 Abr, 2006).
 11. T. Tamachi *et al.*, J Allergy Clin Immunol 118, 606 (Sep, 2006).

5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Medical Research Council McKenzie, Andrew NJ Ballantyne, Sarah

10

<120> Anticuerpos contra IL-25

<130> AHB/CP6539118

15

<150> GB 0707505.4

<151> 18-04-2007

<150> US 60/912.474

<151> 18-04-2007

20

<160> 16

<170> PatentIn versión 3.3

25

<210> 1

<211> 363

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

30

<400> 1

gagggtccagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggagcttc aatgaagata 60

tcctgcaagg cttctggtta ctccttact gactacacca tgaactgggt gaagcagagc 120

catggaaaga accttgagtg gattggactt attaatacctt acaatgggtg tactagctac 180

aaccagaact tcaagggcaa ggccacatta actgtagaca agtcatccag cacagcctac 240

atggagctcc tcagtctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagagagggc 300

tatgatgggtt acctttactt tgctatggac tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc 360

tcc 363

35

<210> 2

<211> 121

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 2

ES 2 604 255 T3

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

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

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

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

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
115 120

<210>3
<211> 321
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400>3

gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60
atcagttgca gtgcaagtca gggcattagc aattatttaa actggtatca gcagaaagca 120
gatggaactg ttgaactcct gatctattac acatcaagtt tacactcagg agtcccatca 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagat tattctctca ccatcagcaa cctggaacct 240
gaagatattg ccacttacta ttgtcagcag tatagtaagc ttccgtacac gttcggaggg 300
gggaccaagc tggaaataaa a 321

<210>4
<211> 107
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
<400> 4

5

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 604 255 T3

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

 Asp Tyr Thr Met Asn
 1 5

 10
 <210>6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 15
 <400> 6

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

 Gly

 20
 <210>7
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 25
 <400> 7

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

 30
 <210>8
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 8

 Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln
 1 5 10 15
 35

 <210>9
 <211>7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 40
 <400> 9

 Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser
 1 5
 45
 <210> 10
 <211> 9

<212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 10

5

Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 11
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Secuencia sintética: cebador 5' VH

15

<400> 11
 atggratgga gckggrtctt tmtctt 26

<210> 12
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Secuencia sintética: Cebador de región constante de cadena pesada

25

<400> 12
 cagtggatag acagatgggg g 21

<210> 13
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Secuencia sintética: cebador 5' Vkappa

35

<400> 13
 atggrtrccw casctcagtt ccttg 25

40

<210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Secuencia sintética: Cebador de región constante de cadena ligera

<400> 14
 actggatggt gggaagatgg 20

50

<210> 15
 <211> 420
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

55

<400> 15

atggratgga gckgggtctt tmtcttcttc ctgtcgggaa ctgcaggtgt ccactctgag 60
gtccagctgc aacagtctgg acctgagctg gtgaagcctg gagcttcaat gaagatatcc 120
tgcaaggctt ctgggtactc cttcactgac tacaccatga actgggtgaa gcagagccat 180
ggaaagaacc ttgagtggat tggacttatt aatccttaca atggtggtac tagctacaac 240
cagaacttca agggcaaggc cacattaact gtagacaagt catccagcac agcctacatg 300
gagctcctca gtctgacatc tgaggactct gcagtctatt actgtgcaag agagggctat 360
gatggttacc tttactttgc tatggactac tgggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc 420

<210> 16
<211> 381
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 16

atggtrtccw casctcagtt ccttgggtctc ctgttgctct gttttcaagg taccagatgt 60
gatatccaga tgacacagac tacatctctc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 120
atcagttgca gtgcaagtca gggcattagc aattatttaa actggtatca gcagaaagca 180
gatggaactg ttgaactcct gatctattac acatcaagtt tacactcagg agtcccatca 240
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagat tattctctca ccatcagcaa cctggaacct 300
gaagatattg ccacttacta ttgtcagcag tataagtaagc ttccgtacac gttcggaggg 360
gggaccaagc tggaaataaa a 381

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une a IL-25 y que comprende un dominio VH de anticuerpo o una parte sustancial del mismo con una CDR1 VH que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 5; una CDR2 VH que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 6; y una CDR3 VH que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 7, y que comprende además un dominio VL o una parte sustancial del mismo con una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 8; una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 9; y una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 10.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1 en el que:
 - (a) el dominio VH o parte sustancial del mismo comprende una región marco conservada humana;
 - (b) el dominio VH o parte sustancial del mismo comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 2; o
 - (c) el dominio VH o parte sustancial del mismo comprende una región marco conservada humana y el anticuerpo comprende además un dominio VL que comprende una región marco conservada humana.
3. El anticuerpo de la reivindicaciones 1 o 2 en el que el dominio VL comprende:
 - (a) una región marco conservada humana; o
 - (b) una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 4.
4. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que es un fragmento de anticuerpo Fab, F(ab')₂ o scFv.
- 5 El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende una región constante de anticuerpo, en el que opcionalmente
 - (a) la región constante es una región constante IgG1 o IgG4; o
 - (b) el anticuerpo comprende un anticuerpo completo.
6. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
7. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 6 unido operativamente a un promotor.
8. Una célula hospedadora que porta el vector de expresión de la reivindicación 7.
9. Un método para producir un anticuerpo, comprendiendo el método:

cultivar células hospedadoras de acuerdo con la reivindicación 8 en condiciones para la producción de dicho anticuerpo,

comprendiendo opcionalmente el método además aislar dicho anticuerpo; y

comprendiendo opcionalmente el método además formular el anticuerpo en una composición que incluye al menos un componente adicional.
10. Un método para obtener un anticuerpo contra IL-25 que comprende:
 - a) combinar el dominio VH de l anticuerpo de la reivindicación 1 con uno o más dominios VL para producir una o más combinaciones VH/VL; ensayar la o las combinaciones VH/VL con respecto a unión con IL-25, y seleccionar una o más combinaciones que se unen con IL-25 para obtener un anticuerpo contra IL-25;
 - o
 - b) proporcionar una molécula de ácido nucleico de partida que codifica el anticuerpo de la reivindicación 1;

modificar dicho ácido nucleico para alterar la secuencia o las secuencias de CDR;

expresar dicho anticuerpo modificado; ensayar dicho anticuerpo modificado con respecto a unión contra IL-25; y

seleccionar dicho anticuerpo modificado que se une con IL-25 para obtener un anticuerpo contra IL-25.
11. Una composición que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, estando dicha composición opcionalmente en forma de un polvo liofilizado.
12. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o la composición de la reivindicación 11 para uso en el tratamiento o la prevención de asma.

Figura 1

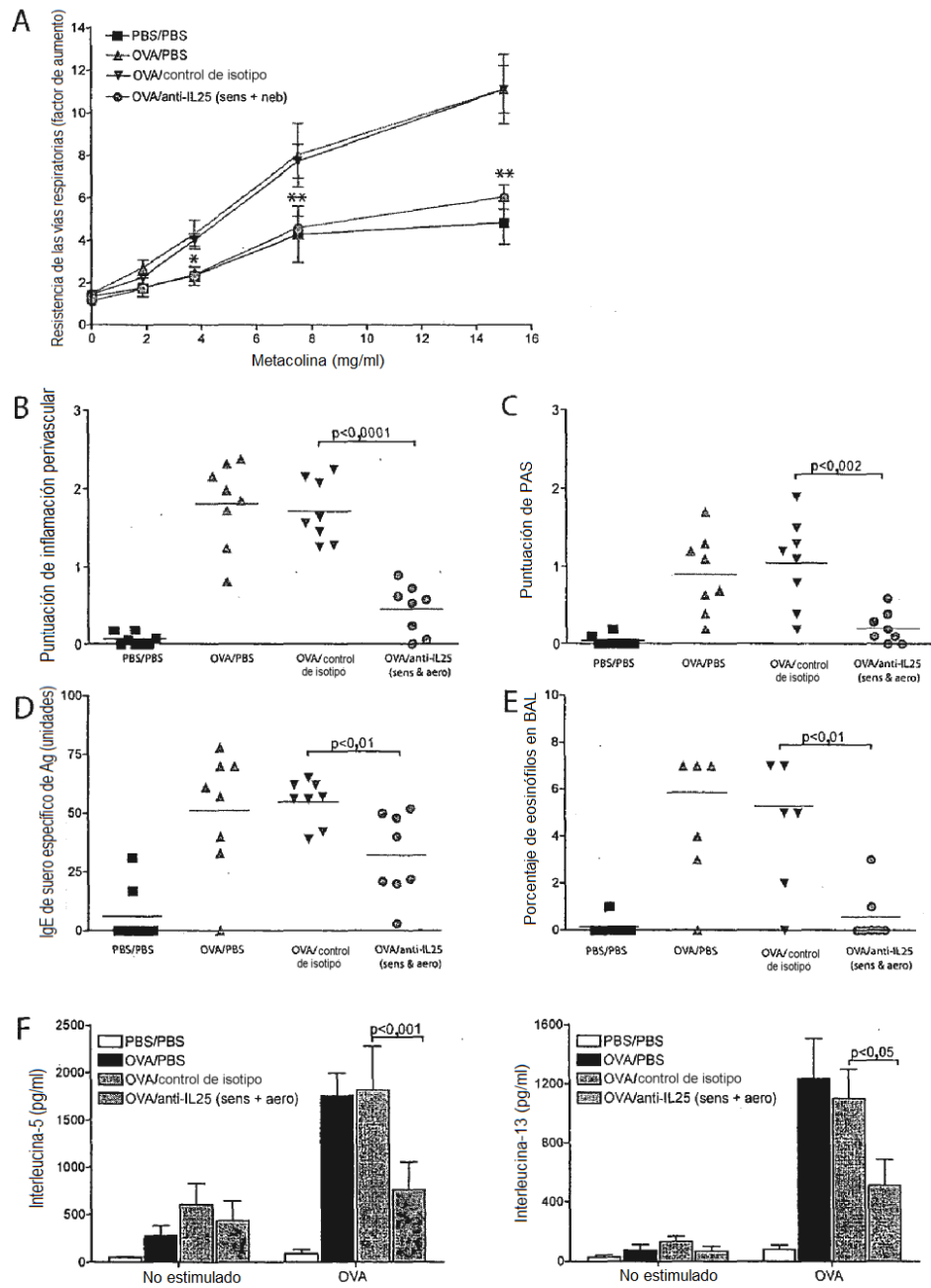


Figura 2

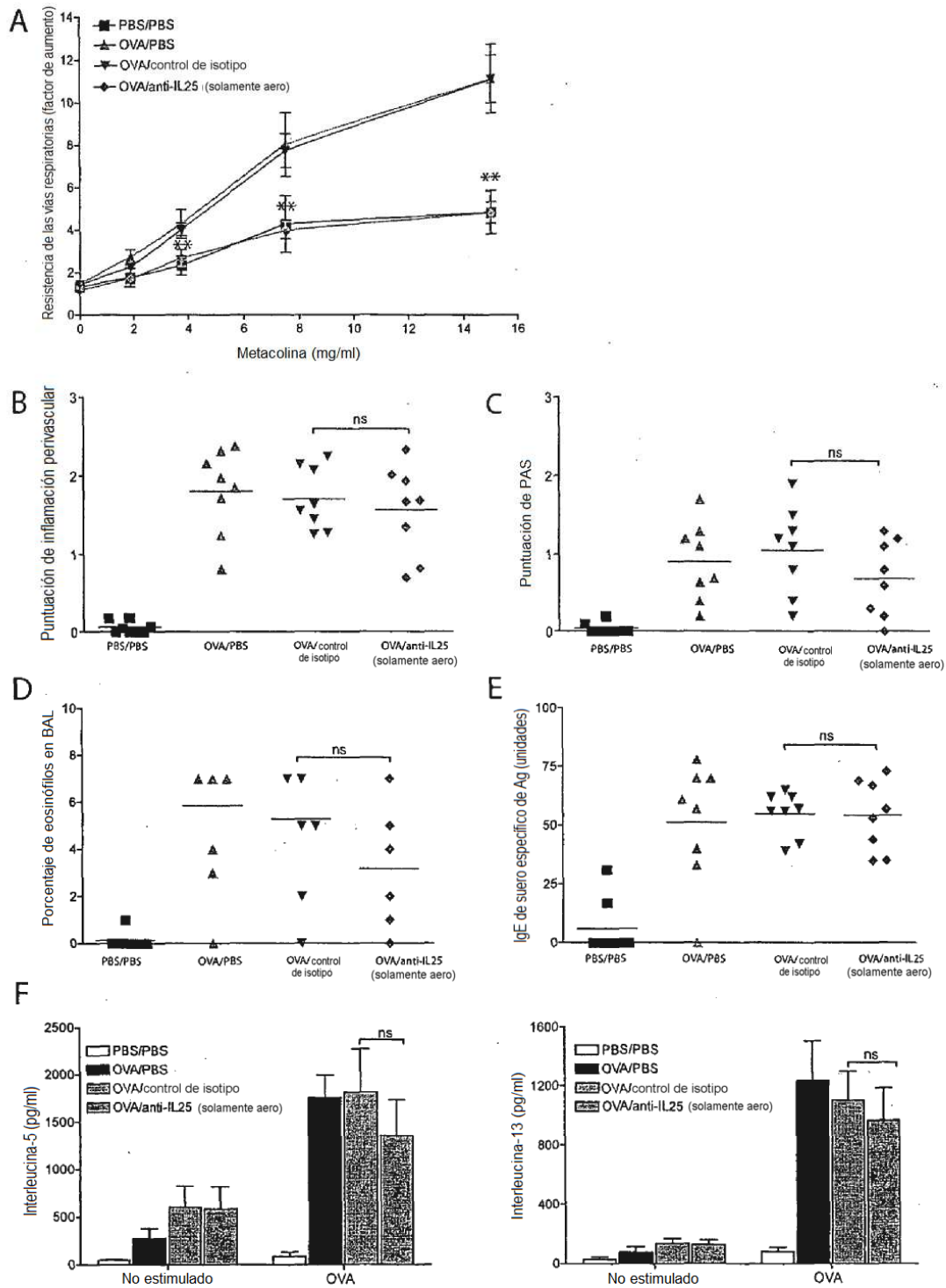


Figura 3

