

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 978**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2010 PCT/GB2010/000432**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.09.2010 WO2010103274**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2010 E 10714046 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2406283**

54 Título: **Moléculas de anticuerpo que tienen especificidad de unión por IL-13 humana**

30 Prioridad:

11.03.2009 GB 0904214

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

09.06.2017

73 Titular/es:

UCB BIOPHARMA SPRL (100.0%)

Allée de la Recherche 60

1070 Brussels, BE

72 Inventor/es:

GOZZARD, NEIL;

LAWSON, ALASTAIR, DAVID, GRIFFITHS;

LIGHTWOOD, DANIEL, JOHN;

PALFRAMAN, ROGER, THOMAS;

SMITH, BRYAN, JOHN y

TYSON, KERRY, LOUISE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 615 978 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

Moléculas de anticuerpo que tienen especificidad de unión por IL-13 humana

La presente invención se refiere a anticuerpos de IL-13 y a sus fragmentos tales como sus fragmentos de unión, a composiciones que los comprenden, y específicamente a su utilización en la prevención y/o el tratamiento de diversas enfermedades que incluyen asma, alergia, EPOC, fibrosis y/o cáncer.

Antecedentes de la invención

La IL-13 es una citoquina de cadena corta que comparte una identidad de secuencias del 25% con la IL-4. Comprende aproximadamente 132 aminoácidos, que forman una estructura secundaria de cuatro hélices que abarcan los residuos 10-21 (hélice A), 43-52 (hélice B), 61-69 (hélice C) y 92-110 (hélice D), junto con dos cadenas β que abarcan los residuos 33-36 y 87-90. La estructura de solución de IL-13 ha sido resuelta, y revela la conformación de haz de cuatro hélices arriba-arriba-abajo-abajo anticipada también observada con IL-4 (Eisenmesser 2001).

La IL-13 humana es una glicoproteína de 17 kDa clonada a partir de células T activadas (Zurawski & de Vries 1994 Immunol Today 15 19-26), y es producida por células T activadas de linaje Th2, si bien las células CD4+ T Th0 y Th1, las células CD8+ T y diversas poblaciones de células no T tales como los mastocitos también producen IL-13 (Zurawski & de Vries 1994 Immunology Today 13 19-26).

La función de la IL-13 incluye:

- la conmutación de isotipos de inmunoglobulina a IgE en las células B humanas (Punnonen, Aversa et al. 1993 Proc Natl Acad Sci USA 90 3730-4) y
- la supresión de las citoquinas inflamatorias tanto en humanos como en ratones (de Waal Malefyt, Figdor et al. 1993 J Immunol 151 6370-81; Doherty, Kastelein et al. 1993 J Immunol 151 7151-60).

La IL-13 se une con sus receptores de la superficie celular, IL-13 Ralfa1 e IL-13 Ralfa2. La IL-13Ralfal interactúa con la IL-13 con una baja afinidad (KD -10 nM), seguido por reclutamiento de elevada afinidad (KD ~ 0,4 nM) de complejos receptores heterodiméricos de señalización (Aman, Tayebi et al. 1996 J Biol Chem 271 29265-70; Hilton, Zhang et al. 1996 Proc Natl Acad Sci U S A 93 497-501).

El complejo IL-4R/IL-13Ralfa1 se expresa en muchos tipos de células tales como células B, monocitos/macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, basófilos, fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales de las vías aéreas, y células de los músculos lisos de las vías aéreas (Graber, Gretener et al. 1998 Eur J Immunol 28 4286-98; Murata, Husain et al. 1998 Int Immunol 10 1103-10; Akaiwa, Yu et al. 2001 Cytokine 13 75-84).

La unión del complejo de receptor de la IL-13Ralfa1/IL-4R tiene como resultado una activación de una variedad de trayectorias de transducción de señal que incluyen un transductor de señales y un activador de la transcripción (STAT6) y las trayectorias del sustrato 2 del receptor de la insulina (Wang, Michieli et al. 1995 Blood 86 4218-27; Takeda, Kamanaka et al. 1996 J Immunol 157 3220-2).

La cadena de la IL-13Ralfa2 sola tiene una elevada afinidad (KD ~ 0,25-0,4 nM) para la IL-13, y funciona tanto como un receptor de cebo que de manera negativa regula la liberación de la IL-3 (Donaldson, Whitters et al. 1998 J Immunol 161 2317-24), como un receptor de señalización que induce la síntesis de TGF- β y la fibrosis por intermedio de la vía AP-1 en macrófagos y posiblemente otros tipos de células (Fichtner-Feigl, Strober et al. 2006 Nat Med 12 99-106).

Varios estudios llevados a cabo en modelos animales preclínicos para el asma indican que la IL-13 desempeña un papel importante en el asma. Estos datos incluyen la resistencia al asma en los ratones IL-13 knockout como también en la inhibición del fenotipo de asma con antagonistas de la IL-13 (antagonistas de IL-13 solubles, anti-IL-13 mAbs, etc.) en diversos modelos de ratón (Sela 1999 Harefuah 137 317-9; Wills-Karp and Chiaramonte 2003 Curr Opin Pulm Med 9 21-7; Wills-Karp 2004 Immunol Rev 202 175-90). Múltiples estudios han demostrado que la administración farmacológica de la IL-13 recombinante a los pulmones de ratones como también en cobayos induce una hipersecreción de mucosidad en las vías aéreas, eosinofilia y AHR (Grunig, Warnock et al. 1998 Science 282 2261-3; Wills-Karp, Luyimbazi et al. 1998 Science 282 2258-61; Kibe, Inoue et al. 2003 Am J Respir Crit Care Med 167 50-6; Vargaftig y Singer 2003 Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 284 L260-9; Vargaftig y Singer 2003 Am J Respir Cell Mol Biol 28 410-9).

Estos efectos de la IL-13 se reproducen en sistemas de ratones transgénicos con una expresión de IL-13 ya sea constitutiva o inducible (Zhu, Homer et al. 1999 J Clin Invest 103 779-88; Zhu, Lee et al. 2001 Am J Respir Crit Care Med 164 S67-70; Lanone, Zheng et al. 2002 J Clin Invest 110 463-74). La sobreexpresión transgénica crónica de la IL-13 también induce una fibrosis subepitelial y enfisema. Los ratones deficientes en IL-13 (y en IL-4) con la molécula de señalización STAT6 no logran desarrollar un AHR inducido por alérgeno y una sobreproducción de mucosidad (Kuperman, Huang et al. 2002 Nat Med 8 885-9). Los estudios en los que se ha utilizado la proteína de fusión de receptor de la IL-13 soluble (sDL-13Ralfa2Fc) han demostrado el papel esencial de esta citoquina en la enfermedad de las vías aéreas inducidas por OVA (ovalbúmina) (Grunig, Warnock et al. 1998 Science 282 2261-3; Wills-Karp,

Luyimbazi et al. 1998 Science 282 2258-61; Taube, Duez et al. 2002 J Immunol 169 6482-9).

La eficacia del tratamiento anti-IL-13 también se demostró en un modelo crónico de asma murina. Además de presentar rasgos de la hipersecreción de mucosidad y AHR, este modelo de asma crónica demostró diversas características de enfermedad humana que faltan en los modelos más agudos. Incluyen eosinofilia de los tejidos pulmonares situados en los espacios interepiteliales como también fibrosis de los músculos lisos, medida mediante incrementos en la deposición de colágeno. El modelo de asma crónica se induce con exposiciones repetidas a aerosol con OVA en ratones sensibilizados a n OVA 1x/semana durante un total de cuatro semanas. El anticuerpo anti-IL-13 administrado durante las dos semanas finales de las exposiciones a OVA (a partir del día 36, evaluándose las lecturas de eficacia en el día 53 del estudio) inhibieron de manera significativa en el AHR, la inflamación pulmonar, la hiperplasia de las células caliciformes, la hipersecreción de mucosidad, y la fibrosis de las vías aéreas (Yang, Li et al. 2005 J Pharmacol Exp Ther).

El efecto terapéutico del antagonista de la IL-13 también demostró inhibir el AHR en un modelo primate de asma (American Thoracic Society, San Diego 2005).

Es sabido que la IL-13 interviene en la patogénesis del asma por cuanto se han detectado elevados niveles de la proteína IL-13 mRNA en los pulmones de pacientes asmáticos, que se correlacionan con la gravedad de la enfermedad (Huang, Xiao et al. 1995 J Immunol 155 2688-94). Además, los polimorfismos genéticos de la IL-13 humana, que conducen a elevados niveles de IL-13, han sido identificados y están asociados con asma y atopía (Heinzmann, Mao et al. 2000 Hum Mol Genet 9 549-59; Hoerauf, Kruse et al. 2002 Microbes Infect 4 37-42; Vercelli 2002 Curr Opin Allergy Clin Immunol 2 389-93; Heinzmann, Jerkic et al. 2003 J Allergy Clin Immunol 112 735-9; Chen, Ericksen et al. 2004 J Allergy Clin Immunol 114 553-60; Vladich, Brazille et al. 2005 J Clin Invest), y se han detectado elevados niveles de IL-3 en los pulmones de pacientes con asma (Huang, Xiao et al. 1995 J Immunol 155 2688-94; Arima, Umeshita-Suyama et al. 2002 J Allergy Clin Immunol 109 980-7; Berry, Parker et al. 2004 J Allergy Clin Immunol 114 1106-9). También se ha demostrado una unión genética entre la IL-13 y el asma, ya que los individuos con un polimorfismo en el gen de IL-13 que causa niveles más elevados de IL-3 en plasma presentan un mayor riesgo de apnea y asma (Wills-Karp 2000 Respir Res 1 19-23).

El documento WO 2006/055638 describe diversos anticuerpos anti-IL-13 antagonistas humanos, uno de los cuales demostró invertir la ovalbúmina, o la hipereactividad inducida por los ácaros del polvo en un modelo de asma murina.

Debido al rol de la IL-13 humana en una variedad de trastornos humanos, se han diseñado estrategias terapéutica para inhibir o contrarrestar la actividad de la IL-13. En particular, se ha procurado obtener anticuerpos que se ligan a, y neutralizan la IL-13, como un medio para inhibir la actividad de la IL-13. Sin embargo, en la técnica existe una necesidad de anticuerpos adecuados y/o mejorados capaces de ligarse a la IL-13, especialmente a la IL-13 humana. En particular, los anticuerpos tienen la capacidad de neutralizar la IL-13 humana. La presente invención proporciona una novedosa familia de proteínas de unión, anticuerpos con injertos de CDR, anticuerpos humanizados, y sus fragmentos, capaces de unir la IL-13 humana, unirse con una elevada afinidad, y unirse y neutralizar la IL-13 humana.

35 **Síntesis de la invención**

La presente invención se refiere a novedosos anticuerpos específicos de la IL-13 y a sus fragmentos, por ejemplo, fragmentos de ellos que se unen con la IL-13, en particular anticuerpos neutralizantes o sus fragmentos que tienen una cadena pesada que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO:31 y una cadena ligera que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO:23.

40 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra: la secuencia de aminoácidos para cada una de las CDR 1, 2, 3 de la cadena pesada (CDR H) y CDR 1, 2, 3 de la cadena ligera (CDR L) de la secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena ligera de anticuerpo de rata,

la secuencia de ADN para la región variable de cadena ligera de anticuerpo de rata,

y la secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena ligera de anticuerpo de rata con secuencia señal

La Figura 2 muestra la secuencia de ADN para la región variable de cadena ligera de anticuerpo de rata con secuencia señal,

la secuencia de aminoácidos para la región variable y constante de cadena ligera de anticuerpos

la secuencia de ADN para la región variable y constante de cadena ligera de anticuerpos

la secuencia de aminoácidos para la región ligera de anticuerpo de rata con secuencia señal

La Figura 3 muestra la secuencia de ADN para la región ligera de anticuerpo de rata con secuencia señal

la secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena pesada de anticuerpo de rata

- la secuencia de ADN para la región variable de cadena pesada de anticuerpo de rata
- la secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena pesada de anticuerpo de rata con secuencia señal
- La Figura 4 muestra la secuencia de ADN para la región variable de cadena pesada de anticuerpo de rata con secuencia señal
- 5 la secuencia de aminoácidos para la región variable y constante de cadena pesada de anticuerpos de rata.
- La Figura 5 muestra la secuencia de ADN para la región variable y constante de cadena pesada de anticuerpos de rata
- la secuencia de aminoácidos para la región variable y constante de cadena pesada de anticuerpos de rata con secuencia señal
- 10 La Figura 6 muestra la secuencia de ADN para la región variable y constante de cadena pesada de anticuerpos de rata con secuencia señal
- La Figura 7 muestra la secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena ligera de anticuerpo humanizado
- la secuencia de ADN para la región variable de cadena ligera de anticuerpo humanizado
- la secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena ligera de anticuerpo humanizado con secuencia señal
- la secuencia de ADN para la región variable de cadena ligera de anticuerpo humanizado con secuencia señal
- 15 la secuencia de aminoácidos para la región variable y constante de cadena ligera de anticuerpo humanizado
- La Figura 8 muestra la secuencia de ADN para la región variable y constante de cadena ligera de anticuerpo humanizado
- la secuencia de aminoácidos para la región variable y constante de cadena ligera de anticuerpo humanizado con secuencia señal
- 20 la secuencia de ADN para la región variable y constante de cadena ligera de anticuerpo humanizado con secuencia señal.
- La Figura 9 muestra la secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena pesada de anticuerpo humanizado con secuencia señal
- la secuencia de ADN para la región variable de cadena pesada de anticuerpo humanizado
- 25 la secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena pesada de anticuerpo humanizado con secuencia señal
- La Figura 10 muestra la secuencia de ADN para la región variable y constante de cadena pesada de anticuerpo humanizado con secuencia señal
- 30 la secuencia de aminoácidos para la región variable y constante de cadena pesada de anticuerpo humanizado con secuencia señal
- la secuencia de ADN para la región variable y constante de cadena pesada de anticuerpo humanizado
- La Figura 11 muestra secuencias de aminoácidos y de ADN para marco aceptor VK 1 2-1-(1)02 JK4 humano y marco aceptor de VH2 3-12-26 JH4.
- 35 La Figura 12 muestra una alineación de las cadenas ligeras para la rata, marco aceptor y las cadenas ligeras humanizadas y también de las cadenas pesadas, humanizadas. Las CDRs están en negrita y subrayadas. Los residuos de donante G49 y R71 están en negrita, bastardilla y resaltadas.
- La Figura 13 muestra el efecto de Ab652 sobre BAL eotaxin-3 medida a las 24 horas después de la exposición al alérgeno. Los datos se expresan como media \pm SEM, n=4-8 por grupo.
- 40 La Figura 14 muestra el efecto de Ab652 sobre el recuento de eosinófilos BAL medido a las 24 horas después de la exposición al alérgeno. Los datos han sido normalizados con respecto al recuento de eosinófilos BAL medidos en la fase de selección preliminar del estudio. Media \pm SEM, n=4-8 por grupo.
- La Figura 15 muestra el efecto de Ab652 sobre la resistencia pico de las vías aéreas medida 15 minutos después de la exposición al alérgeno. Los datos se expresan como media \pm SEM, n=4-8 por grupo.
- 45 La Figura 16 muestra el efecto de Ab652 sobre la resistencia de las vías aéreas medida 24 horas después de la exposición al alérgeno. Los datos han sido normalizados con respecto a la resistencia de las vías aéreas medida antes

de la exposición al alergeno. Media \pm SEM, n=4-8 por grupo.

Los residuos en los dominios variables de anticuerpo están numerados de manera convencional de acuerdo con un sistema concebido por Kabat *et al.* Dicho sistema se dispone en: Kabat *et al.*, 1987, in Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, Estados Unidos (de ahora en más, "Kabat *et al.* (*supra*)"). Este sistema de numeración se utiliza en la presente memoria descriptiva, salvo cuando se indique otra cosa.

Las designaciones de los residuos de Kabat no siempre se corresponden directamente con la numeración lineal de los residuos de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos real puede contener una cantidad menor o mayor de aminoácidos que la numeración estricta de Kabat correspondiente a una abreviación o inserción en un componente estructural, tanto de si se trata de un marco o de una CDR (complementarity determining region, región determinante de complementariedad), de la estructura básica del dominio variable. La numeración de Kabat correcta de los residuos puede determinarse para un anticuerpo dado mediante la alineación de residuos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "estándar".

Las CDRs del dominio variable de cadena pesada están situadas en los residuos 31-35 (CDR-H1), en los residuos 50-65 (CDR-H2) y en los residuos 95-102 (la CDR-H3) de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. Sin embargo, de acuerdo con Chothia (Chothia, C. y Lesk, A.M. J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987)), el equivalente del bucle a la CDR-H1 se extiende desde el residuo 26 al residuo 32. Por lo tanto, la expresión "CDR-H1", tal como se utiliza en el presente, abarca los residuos 26 a 35, como se describe mediante una combinación del sistema de numeración de Kabat y la definición topológica de bucle de acuerdo con Chothia.

Las CDRs del dominio variable de cadena ligera están situadas en los residuos 24 a 34 (CDR-L1), en los residuos 50 a 56 (CDR-L2) y en los residuos 89 a 97 (CDR-L3) de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo antagonista.

Tal como se usa en la presente, la expresión "anticuerpo antagonista" describe un anticuerpo que es capaz de inhibir y/o neutralizar la actividad biológica de señalización de la IL-13, por ejemplo, por el hecho de bloquear la unión o de reducir sustancialmente la unión de la IL-13 al receptor de la IL-13 y, por lo tanto, de inhibir la activación del receptor.

Los anticuerpos destinados a ser utilizados en la presente invención pueden obtenerse utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica. El polipéptido IL-13, lo que incluye un polipéptido de fusión que contiene IL-13, o las células (que de manera recombinante) expresan el polipéptido pueden utilizarse para producir anticuerpos que específicamente reconozcan la IL-13. El polipéptido IL-13 puede ser el polipéptido "maduro" o un fragmento biológicamente activo o un fragmento de él. Los polipéptidos IL-13 pueden prepararse mediante procesos bien conocidos en la técnica a partir de células huésped genéticamente diseñadas que comprenden sistemas de expresión o se los puede recuperar a partir de fuentes biológicas naturales. En la presente solicitud, el término "polipéptidos" incluye péptidos, polipéptidos y proteínas. Ellos se utilizan de manera intercambiable a menos que se indique otra cosa. En algunos casos, el polipéptido IL-13 puede ser parte de una proteína más grande tal como una proteína de fusión fusionada por ejemplo a un rótulo de afinidad.

Los anticuerpos contra el polipéptido IL-13 pueden obtenerse, cuando sea necesaria la inmunización de un animal, mediante la administración de los polipéptido a un animal, preferiblemente un animal no humano, utilizándose protocolos bien conocidos y rutinarios, ver por ejemplo: Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Inglaterra, 1986). Es posible inmunizar muchos animales de sangre caliente, tales como conejos, ratones, ratas, ovejas, vacas, camellos o cerdos. Sin embargo, los ratones, conejos cerdos y ratas son por lo general los más convenientes.

Los anticuerpos destinados a ser utilizados en la presente invención incluyen anticuerpos enteros y fragmentos o derivados funcionalmente activos de ellos, y pueden ser, sin limitación, anticuerpos monoclonales, humanizados, completamente humanos o quiméricos.

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante cualquier método conocido en la técnica tal como la técnica de hibridomas (Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256:495-497), la técnica de trioma, la técnica de hibridomas de las células B humanas (Kozbor *et al.*, 1983, Immunology Today, 4:72) y la técnica de hibridomas de EBV (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp77-96, Alan R Liss, Inc., 1985).

Los anticuerpos destinados a ser utilizados en la invención también pueden generarse utilizando métodos de anticuerpos de linfocitos individuales mediante la clonación y expresión de cADNs de región variable de inmunoglobulina generados a partir de linfocitos individuales seleccionados para la producción de anticuerpos específicos para lo cual se utilizan por ejemplo los métodos descritos por Babcook, J. *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(15):7843-78481; WO 92/02551; WO 2004/051268 y la Publicación Internacional de Patente número WO 2004/106377.

La selección preliminar de anticuerpos puede llevarse a cabo utilizando ensayos para medir la unión a la IL-13 y/o mediante ensayos para medir la capacidad de bloquear la unión de la IL-13 a uno o más de sus receptores. Un ejemplo

de un ensayo de unión es un ELISA, por ejemplo, en el que se utiliza una proteína de fusión de la IL-13, que está inmovilizado sobre placas, y utilizándose un anticuerpo secundario conjugado para detectar anticuerpo anti-IL-13 ligado a la IL-13. Un ejemplo de ensayo de bloqueo es un ensayo basado en citometría de flujo mediante el que se mide el bloqueo de la unión de la proteína ligando de la IL-13 a una IL-13R. Se utiliza un anticuerpo secundario etiquetado fluorescentemente para detectar la cantidad de proteína ligando de la IL-13 que se liga a la IL-13R.

Los anticuerpos humanizados (que incluye anticuerpos en los que se injertó CDR) son moléculas de anticuerpo que tienen una o más CDRs (complementarity determining regions, regiones determinantes de complementariedad) de una especie no humana y una región marco de una molécula de inmunoglobulina humana (ver, por ejemplo, la US 5.585.089; WO 91/09967). Debe tenerse presente que puede ser necesario solamente transferir los residuos determinantes de especificidad de las CDRs en lugar de la CDR entera (ver por ejemplo, Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34). Los anticuerpos humanizados pueden comprender opcionalmente, además, uno o más residuos de marco derivados de la especie no humana de la cual se derivan las CDRs.

Los anticuerpos quiméricos están compuestos de elementos derivados de dos especies diferentes de manera tal que el elemento conserva las características de la especie de la cual ha sido derivado. En términos generales, un anticuerpo quimérico comprenderá una región variable de una especie, por ejemplo, un ratón, rata, conejo o similar, y una región constante de otra especie tal como ser humano.

Los anticuerpos destinados a ser utilizados en la presente invención también pueden generarse utilizando diversos métodos de visualización de fagos conocidos en la técnica e incluyen aquellos divulgados por Brinkman et al. (in J. Immunol. Methods, 1995, 182: 41-50), Ames et al. (J. Immunol. Methods, 1995, 184:177-186), Kettleborough et al. (Eur. J. Immunol. 1994, 24:952-958), Persic et al. (Gene, 1997 187 9-18), Burton et al. (Advances in Immunology, 1994, 57:191-280) y WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y US 5.698,426; 5.223.409; 5,403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

Los anticuerpos completamente humanos son aquellos anticuerpos en los que las regiones variables y las regiones constantes (en caso de estar presentes) de tanto las cadenas pesadas como ligeras son todas ellas de origen humano, o sustancialmente idénticas a secuencias de origen humano, pero no necesariamente del mismo anticuerpo. Los ejemplos de anticuerpos completamente humanos puede incluir anticuerpos producidos por ejemplo mediante los métodos de visualización de fagos arriba descritos y anticuerpos producidos por ratones en los que los genes de región variable de inmunoglobulina murina y o finalmente de región constante han sido reemplazados por sus contrapartes humanas, por ejemplo, tal como se describe en términos generales en EP 0546073, US 5.545.806, US 5.569.825, US 5.625.126, US 5.633.425, US 5.661.016, US 5.770.429, EP 043 8474 y EP 0463151.

Un anticuerpo antagonista provisto de especificidad para la IL-13 humana puede comprender una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende por lo menos una CDR que tiene la secuencia dada en la Figura 1, la SEQ ID NO: 1 para la CDR-H1, una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO:2 para la CDR-H2 y/o una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO:3 para la CDR-H3.

Un anticuerpo antagonista que tiene una especificidad para la IL-13 humana puede comprender una cadena pesada, en la que por lo menos dos de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 del dominio variable de la cadena pesada son seleccionadas de entre los siguientes: la secuencia dada en la SEQ ID NO: 1 para la CDR-H1, la secuencia dada en la SEQ ID NO:2 para la CDR-H2 y la secuencia dada en la SEQ ID NO:3 para la CDR-H3. Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender una cadena pesada en la que la CDR-H1 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO:1 y la CDR-H2 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO:2. Como alternativa, el anticuerpo puede comprender una cadena pesada en la que la CDR-H1 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO:1 y la CDR-H3 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO:3, o el anticuerpo puede comprender una cadena pesada en la que la CDR-H2 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO:2 y la CDR-H3 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO:3. Para evitar dudas, se da por entendido que están incluidas todas las permutaciones.

Se provee un anticuerpo antagonista que tiene una especificidad para la IL-13 humana, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO:1 para la CDR-H1, la secuencia dada en la SEQ ID NO:2 para la CDR-H2 y la secuencia dada en la SEQ ID NO:3 para la CDR-H3.

Un anticuerpo antagonista que tiene una especificidad para la IL-13 humana puede comprender una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende por lo menos una CDR que tiene la secuencia dada en la Figura 1, la SEQ ID NO:4 para la CDR-L1, una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO:5 para la CDR-L2 y/o una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO:6 para la CDR-L3.

Un anticuerpo antagonista que tiene una especificidad para la IL-13 humana puede comprender una cadena ligera, en donde por lo menos dos de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 del dominio variable de la cadena ligera se seleccionan entre los siguientes: la secuencia dada en la SEQ ID NO:4 para la CDR-L1, la secuencia dada en la SEQ ID NO:5 para la CDR-L2 y la secuencia dada en la SEQ ID NO:6 para la CDR-L3. Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender una cadena ligera en el que la CDR-L1 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO:4 y la CDR-L2 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO:5. Como alternativa, el anticuerpo puede comprender una cadena ligera en el que la CDR-L1 tiene la

secuencia dada en la SEQ ID NO:4 y la CDR-L3 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO:6, o el anticuerpo puede comprender una cadena ligera en el que la CDR-L2 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO:5 y la CDR-L3 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO:6. Para evitar dudas, se da por entendido que están incluidas todas las permutaciones.

- 5 Se provee un anticuerpo antagonista que tiene una especificidad para la IL-13 humana en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO:4 para la CDR-L1, la secuencia dada en la SEQ ID NO:5 para la CDR-L2 y la secuencia dada en la SEQ ID NO:6 para la CDR-L3.

Las moléculas de anticuerpo de la presente invención pueden comprender de manera conveniente una cadena ligera complementaria o una cadena pesada complementaria, respectivamente.

- 10 El anticuerpo de acuerdo con la presente invención comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO:1 para la CDR-H1, la secuencia dada en la SEQ ID NO:2 para la CDR- H2 y la secuencia dada en la SEQ ID NO:3 para la CDR-H3 y una cadena pesada en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO:4 para la CDR-L1, la secuencia dada en la SEQ ID NO:5 para la CDR-L2 y la secuencia dada en la SEQ ID NO:6 para la CDR-L3.

- 15 Debe tenerse presente que es posible efectuar una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos en las CDRs provistas por la presente divulgación sin alterar de manera significativa la capacidad del anticuerpo de ligarse a la IL-13 y de neutralizar la actividad de la IL-13. El efecto de cualesquiera sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos puede determinarse fácilmente por una persona con pericia en la especialidad, por ejemplo mediante la utilización de los métodos descritos en la presente, particularmente aquellos ilustrados en los ejemplos para determinar la unión a la IL-13 y la inhibición de interacción entre la IL-13/receptor de la IL-13.

- 20 Por lo tanto, un anticuerpo provisto de una especificidad para la IL-13 humana puede comprender una o más CDRs seleccionadas entre la CDRH-1 (SEQ ID NO: 1), la CDRH-2 (SEQ ID NO:2), la CDRH-3 (SEQ ID NO:3), la CDRL-1 (SEQ ID NO:4), la CDRL-2 (SEQ ID NO:5) y la CDRL-3 (SEQ ID NO:6) en las que uno o más aminoácidos en una o más de las CDRs han sido sustituidos por otro aminoácido, por ejemplo, un aminoácido similar a los definidos en lo que sigue.

- 25 El anticuerpo provisto de una especificidad para la IL-13 humana puede comprender la CDRH-1 (SEQ ID NO: 1), la CDRH-2 (SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO:20), la CDRH-3 (SEQ ID NO:3), la CDRL-1 (SEQ ID NO:4), la CDRL-2 (SEQ ID NO:5) y la CDRL-3 (SEQ ID NO:6), por ejemplo en las que uno o más aminoácidos en una o más de las CDRs han sido sustituidos por otro aminoácido, tal como un aminoácido similar a los definidos más abajo en la presente.

- 30 Un anticuerpo provisto de una especificidad para la IL-13 humana puede comprender una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende tres CDRs en las que la secuencia de la CDRH-1 tiene una identidad o similitud de por lo menos el 60% con respecto a la secuencia dada en la SEQ ID NO: 1, la CDRH-2 tiene una identidad o similitud de por lo menos el 60% con respecto a la secuencia dada en la SEQ ID NO:2 y/o la CDRH-3 tiene una identidad o similitud de por lo menos el 60% con respecto a la secuencia dada en la SEQ ID NO:3. Un anticuerpo de este tipo puede comprender una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende tres CDRs en las que la secuencia de la CDRH-1 tiene una identidad o similitud de por lo menos el 70%, 80%, 90%, 95% o 98% con respecto a la secuencia dada en la SEQ ID NO: 1, la CDRH-2 tiene una identidad o similitud de por lo menos el 70%, 80%, 90%, 95% o 98% con respecto a la secuencia dada en la SEQ ID NO:2 y/o la CDRH-3 tiene una identidad o similitud de por lo menos el 70%, 80%, 90%, 95% o 98% con respecto a la secuencia dada en la SEQ ID NO:3.

- 45 El término "identidad", tal como se utiliza en la presente, indica que en cualquier posición particular en la secuencia alineada, el residuo de aminoácido es idéntico entre las secuencias. El término "similitud", tal como se utiliza en la presente, indica que en cualquier posición en las secuencias alineadas, el residuo de aminoácido es de un tipo similar entre las secuencias. Por ejemplo, la leucina puede estar sustituida por isoleucina o valina. Otros aminoácidos que pueden frecuentemente ser sustituidos entre sí incluyen, sin limitación:

- fenilalanina, tirosina y triptófano (aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas);

- lisina, arginina e histidina (aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas);

- aspartato y glutamato (aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas);-asparagina y glutamina (aminoácidos que tienen cadenas laterales amida); y

- 50 - cisteína y metionina (aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre). Los grados de identidad y similitud pueden calcularse fácilmente (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987, Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991, el BLAST™ software provisto por NCBI (Altschul, S.F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W. & States, D.J. 1993, Nature Genet. 3:266-272. Madden, T.L. et al., 1996,

Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. & Madden, T.L. 1997, Genome Res. 7:649-656).

5 Un anticuerpo provisto de una especificidad para la IL-13 puede comprender una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende tres CDRs en las que la secuencia de la CDRL-1 tiene una identidad o similitud de por lo menos el 60% con respecto a la secuencia dada en la SEQ ID NO:4, la CDRL-2 tiene una identidad o similitud de por lo menos el 60% con respecto a la secuencia dada en la SEQ ID NO:5 y/o la CDRL-3 tiene una identidad o similitud de por lo menos el 60% con respecto a la secuencia dada en la SEQ ID NO:6. Un anticuerpo de este tipo puede comprender una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende tres CDRs en las que las que la secuencia de la CDRL-1 tiene una identidad o similitud de por lo menos el 70%, 80%, 90%, 95% o 98% con respecto a la secuencia dada en la SEQ ID NO:4, la CDRL-2 tiene una identidad o similitud de por lo menos el 70%, 80%, 90%, 95% o 98% con respecto a la secuencia dada en la SEQ ID NO:5 y/o la CDRL-3 tiene una identidad o similitud de por lo menos el 70%, 80%, 90%, 95% o 98% con respecto a la secuencia dada en la SEQ ID NO:6.

En una realización, el anticuerpo provisto por la presente invención es un anticuerpo monoclonal.

15 El anticuerpo puede ser una molécula de anticuerpo con una CDR injertada que comprende una o más de las CDRs provistas en las SEQ ID NOS:1, 2, 3, 4, 5, 6 o variantes de ellas. Tal como se usa en la presente, la expresión "molécula de anticuerpo con CDR injertada" se refiere a una molécula de anticuerpo en la que la cadena ligera y/o pesada contienen una o más CDRs (lo que incluye, si se desea, una o más CDRs modificadas) de un anticuerpo donante (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal murino o de rata) injertado en una región marco variable de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo aceptor (por ejemplo, un anticuerpo humano). Para una revisión del tema, ver: Vaughan et al, Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998.

20 Cuando las CDRs o residuos determinantes de especificidad son injertados, puede utilizarse cualquier secuencia de región marco variable de aceptor adecuado relacionado con la clase/tipo del anticuerpo donante del que se derivan las CDRs, lo que incluye regiones marco de ratón, primate y humano. Es conveniente que el anticuerpo con CDR injertada tenga un dominio variable que comprende regiones marco de aceptor humano como también una o más de las CDRs determinantes de especificidad arriba descritos. Por lo tanto, en una realización se provee un anticuerpo con CDR injertado neutralizante en el que el dominio variable comprende regiones marco de aceptor humano y CDRs de donante no humano.

25 Los ejemplos de armazones humanos que pueden utilizarse en la presente invención abarcan KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM (Kabat *et al.*, *supra*). Por ejemplo, pueden utilizarse KOL y NEWM para la cadena pesada, puede utilizarse REI para la cadena ligera y pueden utilizarse EU, LAY y POM tanto para la cadena pesada como para la cadena ligera. Como alternativa, pueden utilizarse secuencias de línea germinal humana; éstas están disponibles en <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>

30 En un anticuerpo en la que se ha injertado una CDR, las cadenas pesadas y ligeras de aceptor no necesitan ser derivadas del mismo cuerpo, si se desea pueden comprender cadenas Compuestas que tienen regiones marco derivados de diferentes cadenas.

35 La región marco adecuada para la cadena pesada del anticuerpo en el que se ha injertado la CDR se deriva de secuencia de subgrupo humano VH2 3-1 2-26 junto con JH4 (SEQ ID NO: 41). Por lo tanto, se provee un anticuerpo en el que se ha injertado una CDR neutralizante que comprende por lo menos una CDR de donante no humano en el que la región marco de cadena pesada se deriva de la secuencia VH2 de subgrupo 3-1 2-26 junto con JH4. La secuencia del JH4 humano es como sigue: (YFDY)WGQGTLVTVS (SEQ ID No: 43). El motivo YFDY es parte de la CDR-H3 y no es parte del marco 4 (Ravetch, J.V. et al., 1981, Cell, 27, 583-591).

40 La región marco adecuada para la cadena ligera del anticuerpo en el que se ha injertado la CDR se deriva de la secuencia del subgrupo VK1 de línea germinal humana 2-1 1-02 junto con JK4 (SEQ ID NO: 39). Por lo tanto, se provee un anticuerpo en el que se ha injertado una CDR neutralizante que comprende por lo menos una CDR de donante no humano en la que la región marco de cadena ligera está derivada de la secuencia de subgrupo humano 2-1 1-02 junto con JK4. La secuencia de JK4 es como sigue: (LT)FGGGTKVEIK (SEQ ID No: 44). El motivo LT es parte de la CDR-L3 y no es parte del marco 4 (Hieter, P.A., et al., 1982, J. Biol. Chem., 257, 1516-1522).

En una realización, un marco liviano y/o pesado se selecciona de una secuencia como se muestra en la SEQ ID No: 39 a 42.

45 Además, en un anticuerpo injertado con CDR, las regiones marco no necesitan tener exactamente la misma secuencia que aquellas del anticuerpo aceptor. Por ejemplo, residuos inusuales se pueden cambiar a residuos de aparición más frecuente para esa clase o tipo de cadena aceptora. De modo alternativo, los residuos seleccionados en las regiones marco aceptoras se pueden cambiar, de modo tal que correspondan al residuo hallado en la misma posición en el anticuerpo donante (ver Reichmann et al., 1998, Nature, 332, 323-324). Estos cambios se deben mantener al mínimo necesario para recuperar la afinidad del anticuerpo donante. Un protocolo para seleccionar residuos en las regiones marco aceptoras que puede ser necesario cambiar se establece en el documento WO 91/09967.

En una molécula de anticuerpo injertada con CDR de la presente invención, si la cadena pesada aceptora tiene la

secuencia humana VH2 3-12-26 junto con JH4, entonces las regiones marcoceptoras de la cadena pesada comprenden, además de una o varias CDR donantes, un residuo donante en al menos una de las posiciones 49 y 71 (de acuerdo con Kabat et al., (*supra*)) (ver la Figura 12).

5 Por consiguiente, se proporciona un anticuerpo injertado con CDR, en donde al menos los residuos en las posiciones 49 y 71 del dominio variable de la cadena pesada son residuos donantes.

Los residuos donantes son residuos del anticuerpo donante, es decir, el anticuerpo del que se derivan originalmente las CDR. Con preferencia, los residuos son Glicina y Arginina en las posiciones 49 y 71, respectivamente.

En una realización, un anticuerpo de la presente invención comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 31

10 Se apreciará que se puedan hacer una o varias sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos a los dominios variables de anticuerpo, proporcionados por la presente invención, sin alterar significativamente la capacidad del anticuerpo de unirse con IL-13 y neutralizar la actividad de IL-13. El efecto de cualquier sustitución, adición y/o deleción de aminoácido puede ser ensayado con facilidad por un experto en la técnica, por ejemplo, usando los métodos descritos en los Ejemplos para determinar la unión de IL- 13 y/o el bloqueo de ligando/receptor.

15 El anticuerpo puede comprender una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos el 70%, el 80%, el 90%, el 95% o el 98% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 31.

En una realización, un anticuerpo de la presente invención comprende una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 23.

20 El anticuerpo puede comprender una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos el 70%, el 80%, el 90%, el 95% o el 98% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 23.

25 En una realización, un anticuerpo de la presente invención comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO:31 y una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO:23.

30 El anticuerpo puede comprender una cadena pesada y una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos el 60% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO:31 y el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos el 60% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO:23. Apropiadamente, el anticuerpo comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos el 70%, el 80%, el 90%, el 95% o el 98% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO:31 y una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos el 70%, el 80%, el 90%, el 95% o el 98% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO:23.

35 Las moléculas de anticuerpo de la presente invención pueden comprender una molécula de anticuerpo completa con cadenas pesadas y ligeras de longitud completa o uno de sus fragmentos y pueden ser, pero sin limitación, Fab, Fab modificado, Fab', Fab' modificado, F(ab')₂, Fv, anticuerpos de dominio simple (por ejemplo, VH o VL o VHH), scFv, anticuerpos bi-, tri- o tetravalentes, Bis-scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores (ver, por ejemplo, Holliger y Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136; Adair y Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217). Los métodos para crear y fabricar estos fragmentos de anticuerpo son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181). Otros fragmentos de anticuerpo para usar en la presente invención incluyen los fragmentos de Fab y Fab' descritos en las solicitudes de patente internacionales WO 2005/003169, WO 2005/003170 y WO 2005/003171 y fragmentos de Fab-dAb descritos en la solicitud de patente internacional WO 2009/040562. Los anticuerpos multivalentes pueden comprender múltiples especificidades o pueden ser monoespecíficos (ver, por ejemplo, los documentos WO 92/22853 y WO 05/113605).

40 Los dominios de región constante de la molécula de anticuerpo de la presente invención, de estar presentes, se pueden seleccionar teniendo en cuenta la función propuesta de la molécula de anticuerpo y en particular las funciones efectoras que puedan requerirse. Por ejemplo, los dominios de región constante pueden ser los dominios de IgA, IgD, IgE, IgG o IgM humana. En particular, los dominios de IgG humana de región constante se pueden usar, en especial los isotipos de IgG1 e IgG3 cuando la molécula de anticuerpo está destinada para usos terapéuticos y se requieren funciones efectoras de anticuerpo. De modo alternativo, los isotipos de IgG2 e IgG4 se pueden usar cuando la molécula de anticuerpo está destinada para usos terapéuticos y no se requieren funciones efectoras, por ejemplo, para simple bloqueo de la actividad de IL-13. Se apreciará que también se puedan usar variantes de secuencias de estos dominios de región constante. Por ejemplo, las moléculas de IgG4 en donde la serina en la posición 241 fueron modificadas en prolina como se describe en Angal et al., Molecular Immunology, 1993, 30 (1), 105-108. También comprenderán los expertos en la técnica que los anticuerpos se pueden someter a una variedad de modificaciones postraduccionales. El tipo y la extensión de estas modificaciones a menudo depende de la línea celular huésped usada

para expresar el anticuerpo, así como las condiciones de cultivo. Estas modificaciones pueden incluir variaciones en glicosilación, oxidación de metionina, formación de dicetopiperazina, isomerización de aspartato y desamidación de asparagina. Una modificación frecuente es la pérdida de un residuo básico carboxi-terminal (como lisina o arginina) debido a la acción de carboxipeptidasas (como se describe en Harris, R.J. Journal of Chromatography 705:129-134, 1995). Sin embargo, no hay lisina C-terminal en la cadena pesada o ligera de Ab652, realización de la invención.

En una realización, la cadena pesada de anticuerpo comprende un dominio CH1 y la cadena ligera de anticuerpo comprende un dominio CL, ya sea kappa o lambda.

En una realización, el anticuerpo proporcionado por la presente invención es un anticuerpo antagonista que tiene especificidad por IL-13 humana, en donde la región constante de cadena pesada comprende una región bisagra modificada. Por consiguiente, la presente invención proporciona un anticuerpo en el que la cadena pesada comprende o consiste en la secuencia dada en la SEQ ID NO: 35

Se apreciará que se puedan hacer una o varias sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácido a la variable de anticuerpo y/o dominios constantes proporcionados por la presente descripción sin alterar de modo significativo la capacidad del anticuerpo por unirse con IL-13 y neutralizar la actividad de IL-13. El efecto de cualquier sustitución, adición y/o deleción de aminoácido puede ser ensayado fácilmente por un experto en la técnica, por ejemplo, usando los métodos descritos en la presente, en particular aquellos ilustrados en los Ejemplos, para determinar la unión con IL-13 y el bloqueo de la interacción del receptor de IL-13/IL-13.

El anticuerpo puede comprender una cadena pesada, en donde la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos el 60% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 35. Apropiadamente, el anticuerpo comprende una cadena pesada, en donde la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos el 70%, el 80%, el 90%, el 95% o el 98% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 35.

En una realización, una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente invención comprende una cadena ligera que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 27.

El anticuerpo puede comprender una cadena ligera, en donde la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos el 60% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 27. Por ejemplo, el anticuerpo comprende una cadena ligera, en donde la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos el 70%, el 80%, el 90%, el 95% o el 98% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 27.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo en el que la cadena pesada comprende o consiste en la secuencia dada en la SEQ ID NO:35 y la cadena ligera comprende o consiste en la secuencia dada en la SEQ ID NO:27.

El anticuerpo puede comprender una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos el 60% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO:35 y la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos el 60% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO:27. En general, el anticuerpo comprende una cadena pesada, en donde la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos el 70%, el 80%, el 90%, el 95% o el 98% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO:35 y una cadena ligera, en donde la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos el 70%, el 80%, el 90%, el 95% o el 98% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO:27.

Las moléculas biológicas, tales como anticuerpos o fragmentos, contienen grupos funcionales ácidos y/o básicos, dando a la molécula una carga positiva o negativa neta. La cantidad de la carga general "observada" dependerá de la secuencia de aminoácido absoluta de la entidad, el ambiente local de los grupos cargados en la estructura 3D y las condiciones ambientales de la molécula. El punto isoeléctrico (pI) es el pH en el que una molécula o superficie particular no lleva carga eléctrica neta. En una realización, el anticuerpo o fragmento de acuerdo con la presente descripción tiene un punto isoeléctrico (pI) de al menos 7. En una realización, el anticuerpo o fragmento tiene un punto isoeléctrico de al menos 8, tales como 8,5, 8,6, 8,7, 8,8 ó 9. En una realización, el pI del anticuerpo es 8.

El anticuerpo de IL-13 y fragmentos de la invención se pueden manipular por ingeniería para tener un punto isoeléctrico apropiado. Esto puede llevar a anticuerpos y/o fragmentos con propiedades más robustas, en particular, solubilidad apropiada y/o propiedades de estabilidad.

Así, en un aspecto, un anticuerpo humanizado de IL-13 se puede manipular por ingeniería para tener un punto isoeléctrico diferente de aquel del anticuerpo originalmente identificado. El anticuerpo se puede manipular por ingeniería, por ejemplo, reemplazando un residuo de aminoácido como reemplazando un residuo de aminoácido ácido con uno o más residuos de aminoácido básico. De modo alternativo, los residuos de aminoácido básico se pueden añadir o los residuos de aminoácido ácido se pueden remover. De modo alternativo, si la molécula tiene un valor de pI inaceptablemente alto, se pueden introducir residuos ácidos para reducir el pH, según se requiera. El pI del anticuerpo o fragmento manipulado por ingeniería puede ser, por ejemplo, de 8 o superior, como 8,5 ó 9. Es importante que, cuando se manipula el pI, entonces se tenga en cuenta la retención de la actividad deseable del anticuerpo o fragmento. De este modo, en una realización, el anticuerpo o fragmento manipulado por ingeniería tiene la misma o sustancialmente la misma actividad que el anticuerpo o fragmento "no modificado".

Los programas tales como ** ExPASy http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html y http://www.iut-arles.univ-mrs.fr/w3bb/d_abim/compo-p.htm se pueden usar para predecir el punto isoeléctrico del anticuerpo o fragmento.

En una realización, los anticuerpos de la presente invención son apropiados para suministro por inhalación, por ejemplo, por nebulización. En un ejemplo, las propiedades físicas de los anticuerpos de la presente invención, por ejemplo, la afinidad de unión y la potencia, no se alteran sustancialmente por nebulización. En un ejemplo, los anticuerpos de la presente invención son altamente estables. Una medida de la estabilidad de anticuerpo es la temperatura de fusión (T_m). La temperatura de fusión se puede determinar por cualquier método apropiado conocido en la técnica, por ejemplo, usando Thermofluor (Ericsson et al, Analytical Biochemistry 357 (2006) 289-298) o DSC (calorimetría diferencial de barrido). Con preferencia, los anticuerpos proporcionados por la presente invención tienen una alta temperatura de fusión (T_m), normalmente de al menos 75 °C. En un ejemplo, el anticuerpo de la presente invención tiene una T_m de al menos 75 °C. En un ejemplo, el anticuerpo de la presente invención tiene una T_m de al menos 80 °C. En un ejemplo, el anticuerpo de la presente invención tiene una T_m de al menos 83 °C.

También se proporciona una región específica o epítipo de IL-13 humana que son ligados por un anticuerpo proporcionado por la presente invención, en particular un anticuerpo que comprende la secuencia de cadena pesada (SEQ ID NO:35) y/o la secuencia de cadena ligera (SEQ ID NO:27).

Esta región específica o epítipo del polipéptido de IL-13 humana se puede identificar por cualquier método de mapeo de epítopes apropiados conocidos en la técnica en combinación con cualquiera de los anticuerpos proporcionados por la presente invención. Los ejemplos de tales métodos incluyen péptidos de control de distintas longitudes derivados de IL-13 para la unión con el anticuerpo de la presente invención con el fragmento más pequeño que se puede unir específicamente con el anticuerpo que contiene la secuencia del epítipo reconocido por el anticuerpo. Los péptidos de IL-13 se pueden producir sintéticamente o por digestión proteolítica del polipéptido de IL-13. Los péptidos que se unen con el anticuerpo se pueden identificar, por ejemplo, por análisis espectrométrico de masa. En otro ejemplo, se pueden usar espectroscopia de RMN o cristalografía por rayos X para identificar el epítipo ligado por un anticuerpo de la presente invención. Una vez identificado, se puede usar el fragmento epitópico que se une a un anticuerpo de la presente invención, de ser requerido, como un inmunógeno para obtener anticuerpos antagonistas adicionales que se unen con el mismo epítipo.

Los anticuerpos que bloquean en forma cruzada la unión de un anticuerpo de acuerdo con la presente invención en particular, un anticuerpo que comprende la secuencia de cadena pesada (SEQ ID NO: 31) y la secuencia de cadena ligera (SEQ ID NO: 27) puede ser similarmente útil para antagonizar la actividad de IL-13.

Los anticuerpos de bloqueo cruzado se pueden identificar usando cualquier método adecuado en la técnica, por ejemplo utilizando ensayos ELISA o BIAcore de competición en los que la unión del anticuerpo de bloqueo cruzado a IL-13 humana impide la unión de un anticuerpo de la presente invención o viceversa.

Las moléculas de anticuerpo de la presente invención tienen adecuadamente una alta afinidad de unión, en particular afinidad picomolar. La afinidad se puede medir usando cualquier método adecuado conocido en la técnica, que incluye por resonancia de plasmón superficial, que incluye BIAcore tal como se describe en los Ejemplos en la presente usando IL-13 natural o recombinante aislada. En un ejemplo, la afinidad se mide usando IL-13 humana recombinante como se describe en los Ejemplos de la presente. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 100 pM o mejor. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 50 pM o mejor. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 40 pM o mejor. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 30 pM o mejor. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 20 pM o mejor. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención es totalmente humana o humanizada y tiene una afinidad de unión de aproximadamente 100 pM o mejor. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención es totalmente humana o humanizada y tiene una afinidad de unión de 30 pM o mejor.

Se apreciará que la afinidad de los anticuerpos proporcionados por la presente invención se puede alterar usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por lo tanto, la presente descripción también se refiere a variantes de las moléculas de anticuerpo de la presente invención, que tienen una afinidad por IL-13 mejorada. Tales variantes se pueden obtener mediante numerosos protocolos de maduración por afinidad que incluyen mutación de las CDR (Yang et al., J. Mol. Biol., 254, 392 - 403, 1995), transposición de cadena (Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), uso de cepas mutadoras de *E. coli* (Low et al., J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), transposición de ADN (Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), despliegue en fagos (Thompson et al., J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) y PCR sexual (Cramer et al., Nature, 391,288-291, 1998). Vaughan *et al.* (*supra*) discute estos métodos de maduración por afinidad.

En una realización las moléculas de anticuerpo de la presente invención bloquean la interacción entre IL-13 y un receptor IL-13, en particular las moléculas de anticuerpo de la presente invención bloquean la interacción entre IL-13 e IL-13Ra1 y la interacción entre IL-13 e IL-13 Ra2 En los ejemplos de la presente se describen numerosos ensayos adecuados para determinar la capacidad de un anticuerpo para bloquear esta interacción. En una realización, la

presente invención proporciona un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad para IL-13 humana. En una realización, el receptor de IL-13 humana usado en el ensayo es IL-13 Ra1 humana natural o IL-13Ra2 humana natural. En una realización, el receptor de IL-13 humana usado en el ensayo es IL-13 Ra1 humana recombinante o IL-13Ra2 humana recombinante. En una realización, la IL-13 humana usada en el ensayo es IL-13 humana recombinante. En una realización, el anticuerpo neutralizante es un anticuerpo humanizado o totalmente humano o fragmento de este.

Si se desea, un anticuerpo para uso en la presente invención se puede conjugar con una o más moléculas efectoras. Se apreciará que la molécula efectora puede comprender una molécula efectora única o dos o más de tales moléculas unidas de tal modo de formar un resto único que se puede unir a los anticuerpos de la presente invención. Cuando se desea obtener un fragmento de anticuerpo unido a una molécula efectora, se puede preparar mediante procedimientos químicos o de ADN recombinante estándares en los que el fragmento de anticuerpo está unido, ya sea directamente o por medio de un agente de acoplamiento a la molécula efectora. Las técnicas para la conjugación de tales moléculas efectoras con anticuerpos son bien conocidas en la técnica (ver Hellstrom et al., *Controlled Drug Delivery*, 2nd Ed., Robinson et al., eds., 1987, pp. 623-53; Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 y Dubowchik et al., 1999, *Pharmacology and Therapeutics*, 83, 67-123). Los procedimientos químicos particulares incluyen, por ejemplo, los descritos en los documentos WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 y WO 03031581. Alternativamente, cuando la molécula efectora es una proteína o polipéptido, el enlace se puede obtener mediante procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo como se describe en los documentos WO 86/01533 y EP 0392745.

La expresión molécula efectora, como se usa en la presente, incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas biológicamente activas, por ejemplo enzimas, otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, polímeros sintéticos o naturales, ácidos nucleicos y fragmentos de estos, por ejemplo, ADN, ARN y fragmentos de estos, radionucleidos, particularmente radioyoduro, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos indicadores tales como compuestos fluorescentes o compuestos que se pueden detectar por espectroscopía de RMN o ESR.

Los ejemplos de moléculas efectoras pueden incluir citotoxinas o agentes citotóxicos que incluyen cualquier agente que sea perjudicial para las células (por ejemplo, mata). Los ejemplos incluyen combrestatinas, dolastatinas, epotilonas, estaurosporina, maytansinoides, espongistatinas, rizoxina, halicondrinas, roridinas, hemiasterlinas, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de estos.

Las moléculas efectoras también incluyen, pero sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalano, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antracilinas (por ejemplo daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), Bleomicina, mitramicina, antramycin (AMC), calicheamicinas o duocarmicinas), y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Otras moléculas efectoras pueden incluir radionucleidos quelados tales como ^{111}In y ^{90}Y , Lu^{177} , Bismuto 213 , Californio 252 , Iridio 192 y Tungsteno 188 /Renio 188 ; o fármacos tales como, pero sin limitación, alquilfosfolinas, inhibidores de topoisomerasa I, taxoides y suramina.

Otras moléculas efectoras incluyen proteínas, péptidos y enzimas. Las enzimas de interés incluyen, pero sin limitación, enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasas, isomerasas, transferasas. Las proteínas, polipéptidos y péptidos de interés incluyen, pero sin limitación, inmunoglobulinas, toxinas tales como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina diftérica, una proteína tal como insulina, factor de necrosis tumoral, α -interferón, β -interferón, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas o activador de plasminógeno tisular, un agente trombótico o un agente antiangiogénico, por ejemplo, angiostatina o endostatina, o un modificador de la respuesta biológica tal como una linfoquina, interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-2 (IL-2), factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento nervioso (NGF) u otro factor de crecimiento e inmunoglobulinas.

Otras moléculas efectoras pueden incluir sustancias detectables útiles por ejemplo en el diagnóstico. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos protésicos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, nucleidos radiactivos, metales emisores de positrones (para uso en la tomografía por emisión de positrones) e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Ver generalmente la Patente U.S N.º 4.741.900 para iones metálicos que se pueden conjugar con anticuerpos para uso como diagnóstico. Las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; Los grupos protésicos adecuados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; los materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo y ficoeritrina; los materiales luminiscentes adecuados incluyen luminol; los materiales bioluminiscentes adecuados incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y los nucleidos radiactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In y ^{99}Tc .

En otro ejemplo, la molécula efectora puede aumentar la vida media del anticuerpo in vivo, y/o reducir la inmunogenicidad del anticuerpo y/o mejorar la liberación de un anticuerpo a través de una barrera epitelial al sistema inmunológico. Los ejemplos de moléculas efectoras adecuadas de este tipo incluyen polímeros, albúmina, proteínas de unión a la albúmina o compuestos de unión a la albúmina tales como los descritos en el documento WO 05/117984.

- 5 Cuando la molécula efectora es un polímero, puede ser, en general, un polímero sintético o natural, por ejemplo un polímero de polialquileno, polialquilenilo o polioalquilenilo de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido o un polisacárido ramificado o no ramificado, por ejemplo, un homo- o heteropolisacárido.

Los sustituyentes opcionales específicos que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos mencionados anteriormente incluyen uno o más grupos hidroxilo, metilo o metoxi.

- 10 Los ejemplos específicos de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol) de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido, poli(propilenglicol) poli(alcohol vinílico) o derivados de estos, especialmente poli(etilenglicol) opcionalmente sustituido tal como metoxipoli(etilenglicol) o derivados de estos.

Los polímeros específicos naturales incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glicógeno o derivados de estos.

- 15 Se entiende que los "derivados" como se usa en la presente incluyen derivados reactivos, por ejemplo grupos reactivos selectivos de tiol tales como maleimidados y similares. El grupo reactivo puede estar unido directamente o a través de un segmento ligador al polímero. Se apreciará que el residuo de tal grupo en algunos casos formará parte del producto como grupo de unión entre el fragmento de anticuerpo y el polímero.

- 20 El tamaño del polímero se puede variar según se desee, pero generalmente estará en un rango de peso molecular promedio de 500 Da a 50000 Da, por ejemplo de 5000 a 40000 Da, tal como de 20000 a 40000 Da. El tamaño del polímero se puede seleccionar en particular sobre la base del uso previsto del producto, por ejemplo, capacidad para localizar en ciertos tejidos tales como tumores o prolongar la vida media en circulación (para revisión ver Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531 - 545). En consecuencia, por ejemplo, cuando el producto está destinado a salir de la circulación y penetrar en el tejido, puede ser ventajoso utilizar un polímero de peso molecular pequeño, por ejemplo con un peso molecular de alrededor de 5000 Da. Para aplicaciones en las que el producto permanece en la circulación, puede ser ventajoso utilizar un polímero de peso molecular superior, por ejemplo, que tiene un peso molecular en el rango de 20000 Da a 40000 Da.
- 25

Los polímeros adecuados incluyen un polímero de polialquileno, tal como un poli (etilenglicol) o, especialmente, un metoxipoli(etilenglicol) o un derivado de este, y especialmente con un peso molecular en el rango de aproximadamente 15000 Da a aproximadamente 40000 Da.

- 30 En un ejemplo, los anticuerpos para usar en la presente invención se unen a restos de poli (etilenglicol) (PEG). En un ejemplo particular, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo y las moléculas de PEG pueden estar unidas a través de cualquier grupo funcional de aminoácido de cadena lateral o aminoácido terminal disponible ubicado en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo grupos amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libres. Tales aminoácidos se pueden producir naturalmente en el fragmento de anticuerpo o se pueden manipular genéticamente en el fragmento usando métodos de ADN recombinante (ver, por ejemplo, US 5.219.996, US 5.667.425, WO 98/25971). En un ejemplo, la molécula de anticuerpo de la presente invención es un fragmento Fab modificado en el que la modificación es la adición al extremo C-terminal de su cadena pesada de uno o más aminoácidos para permitir la unión de una molécula efectora. Convenientemente, los aminoácidos adicionales forman una región bisagra modificada que contiene uno o más residuos de cisteína a los que puede estar unida la molécula efectora. Se pueden múltiples sitios para unir dos o más moléculas de PEG.
- 35
- 40

Convenientemente, las moléculas de PEG pueden estar unidas de forma covalente a través de un grupo tiol de al menos un resto de cisteína ubicado en el fragmento de anticuerpo. Cada molécula de polímero unida al fragmento de anticuerpo modificado puede estar unida de modo covalente al átomo de azufre de un residuo de cisteína ubicado en el fragmento. El enlace covalente generalmente será un enlace disulfuro o, en particular, un enlace azufre-carbono.

- 45 Cuando se usa un grupo tiol como punto de unión, se pueden usar moléculas efectoras apropiadamente activadas, por ejemplo se pueden usar derivados selectivos de tiol tales como maleimidados y derivados de cisteína. Como material de partida se puede usar un polímero activado en la preparación de fragmentos de anticuerpo modificados con polímero como se describió anteriormente. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contiene un grupo reactivo tiol tal como un ácido o éster α -halocarboxílico, por ejemplo, yodoacetamida, una imida, por ejemplo, maleimida, una vinilsulfona o un disulfuro. Tales materiales de partida se pueden obtener comercialmente (por ejemplo, de Nektar, anteriormente Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, EE.UU.) o se pueden preparar a partir de materiales de partida comercialmente disponibles usando procedimientos químicos convencionales. Las moléculas de PEG particulares incluyen 20K metoxi-PEG-amina (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater, Rapp Polymere and SunBio) y M-PEG-SPA (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater).
- 50

- 55 En una realización, el anticuerpo es un fragmento Fab o diFab modificado que está PEGilado, *es decir* tiene PEG (poli(etilenglicol)) unido covalentemente a este, *por ejemplo* de acuerdo con el método descrito en EP 0948544 o EP 1090037 [ver también "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, New York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton

Harris and S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC and "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam and A. Dent, Grove Publishers, New York; Chapman, A. 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002, 54:531-545]. En un ejemplo, PEG está unido a una cisteína en la región bisagra. En un ejemplo, un fragmento Fab modificado con PEG tiene un grupo maleimida unido covalentemente a un grupo tiol único en una región bisagra modificada. Un residuo de lisina puede estar unido covalentemente al grupo maleimida y a cada uno de los grupos amina del residuo de lisina se puede unir un polímero de metoxipoli (etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. Por lo tanto, el peso molecular total del PEG unido al fragmento Fab puede ser de aproximadamente 40.000 Da.

En una realización, la presente invención proporciona una molécula de anticuerpo antagonista que tiene especificidad para IL-13 humana, que es un fragmento Fab' modificado que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 35 y una cadena ligera que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 27 y que tiene en el extremo C-terminal de su cadena pesada una región bisagra modificada que contiene al menos un residuo de cisteína al que está unida una molécula efectora. Convenientemente, la molécula efectora es PEG y está unida usando los métodos descritos en los documentos WO 98/25971 y WO 2004072116 o WO 2007/003898. Las moléculas efectoras se pueden unir a fragmentos de anticuerpo usando los métodos descritos en las solicitudes de patente internacional WO 2005/003169, WO 2005/003170 y WO 2005/003171.

En una realización, el anticuerpo o fragmento no se une a una molécula efectora.

La presente invención también proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica la cadena pesada y/o ligera de una molécula de anticuerpo de la presente invención. Convenientemente, la secuencia de ADN codifica la cadena pesada o ligera de una molécula de anticuerpo de la presente invención. La secuencia de ADN de la presente invención puede comprender ADN sintético, por ejemplo producido por procesamiento químico, ADNc, ADN genómico o cualquier combinación de estos.

Las secuencias de ADN que codifican una molécula de anticuerpo de la presente invención se pueden obtener por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican parte o todas las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo se pueden sintetizar según se desee a partir de las secuencias de ADN determinadas o sobre la base de las correspondientes secuencias de aminoácidos.

El ADN codificador para las secuencias marcoceptoras está ampliamente disponible para los expertos en la técnica y se puede sintetizar fácilmente sobre la base de sus secuencias de aminoácidos conocidas.

Se pueden usar técnicas estándar de biología molecular para preparar secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención. Las secuencias de ADN deseadas se pueden sintetizar completa o parcialmente usando técnicas de síntesis de oligonucleótidos. Se pueden usar técnicas apropiadas de mutagénesis dirigida al sitio y de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En la presente se proporcionan ejemplos de secuencias adecuadas. Se puede codificar un péptido señal adecuado para la cadena pesada, tal como el péptido señal murino MEWSWVFLFF LSVTTGVHS (SEQ ID NO: 45). Se puede codificar un péptido señal adecuado para la cadena ligera tal como el péptido señal murino MSVPTQVLGL LLLWLTDARC (SEQ ID NO: 46) que se escinde para dar una molécula de anticuerpo antagonista de la presente invención. La presente invención también proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica la cadena pesada de un anticuerpo de la presente invención que comprende las SEQ ID NO: 32, 34 ó 36 ó 38. La presente invención también proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica la cadena ligera de un anticuerpo de la presente invención que comprende las SEQ ID NO: 24, 26, 28 ó 30,

Los métodos generales por los que se pueden construir los vectores, los métodos de transfección y los métodos de cultivo son bien conocidos por los expertos en la técnica. A este respecto, se hace referencia en "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, New York and the Maniatis Manual producido por Cold Spring Harbor Publishing.

También se proporciona una célula huésped que comprende uno o más vectores de clonación o expresión que comprenden una o más secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de la presente invención. Se puede usar cualquier sistema de célula/ vector huésped adecuado para la expresión de las secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención. Se pueden usar bacterias, por ejemplo E. coli, y otros sistemas microbianos o se pueden usar eucariotas, por ejemplo mamíferos, sistemas de expresión de células huésped. Las células huésped de mamífero adecuadas incluyen CHO, mieloma o células de hibridoma.

La presente invención también proporciona un proceso para la producción de una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente invención que comprende cultivar una célula huésped que contiene un vector de la presente invención en condiciones adecuadas para conducir a la expresión de proteína a partir de ADN que codifica la molécula de anticuerpo de la presente invención, y aislar la molécula de anticuerpo.

La molécula de anticuerpo puede comprender solo un polipéptido de cadena pesada o ligera, en cuyo caso solo se necesita usar una secuencia codificadora del polipéptido de cadena pesada o ligera para transfectar las células huésped. Para la producción de productos que comprenden tanto cadenas pesadas como ligeras, la línea celular se

puede transfectar con dos vectores, un primer vector que codifica un polipéptido de cadena ligera y un segundo vector que codifica un polipéptido de cadena pesada. Alternativamente, se puede usar un vector único, el vector que incluye secuencias que codifican polipéptidos de cadena ligera y cadena pesada.

5 Los anticuerpos y fragmentos de acuerdo con la presente descripción se expresan a buenos niveles a partir de células huésped. En consecuencia, las propiedades de los anticuerpos y/o fragmentos parecen optimizadas y propicias para el procesamiento comercial.

10 Como los anticuerpos de la presente invención son útiles en el tratamiento y/o profilaxis de una afección patológica, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende una molécula de anticuerpo de la presente invención en combinación con uno o más de un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Por consiguiente, se proporciona el uso de un anticuerpo de la invención para la fabricación de un medicamento. La composición se suministrará normalmente como parte de una composición farmacéutica estéril que incluirá normalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica de la presente invención puede comprender adicionalmente un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

15 La presente invención también proporciona un proceso para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende añadir y mezclar la molécula de anticuerpo de la presente invención junto con uno o más de un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 La molécula de anticuerpo puede ser el ingrediente activo único en la composición farmacéutica o diagnóstico o se puede acompañar de otros ingredientes activos que incluyen otros ingredientes de anticuerpos, por ejemplo anti-TNF, anti IL-1p, anti-célula T, anti-IFN γ o anti -LPS, o ingredientes no anticuerpo tales como xantinas. Otros ingredientes activos adecuados incluyen anticuerpos capaces de inducir tolerancia, por ejemplo, anticuerpos anti-CD3 o anti-CD4.

25 En una realización adicional, el anticuerpo, fragmento o composición de acuerdo con la descripción se emplea en combinación con un agente farmacéuticamente activo adicional, por ejemplo un corticosteroide (tal como propionato de fluticasona) y/o un agonista beta 2 (tal como salbutamol, salmeterol o formoterol) o inhibidores del crecimiento y proliferación celular (tales como rapamicina, ciclofosfimida, metotrexato) o alternativamente un inhibidor de CD28 y/o CD40. En una realización, el inhibidor es una molécula pequeña. En otra realización, el inhibidor es un anticuerpo específico del blanco.

30 Las composiciones farmacéuticas comprenden adecuadamente una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo de la invención. La expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" tal como se usa en la presente se refiere a una cantidad de un agente terapéutico necesario para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección específica o para exhibir un efecto terapéutico o preventivo detectable. Para cualquier anticuerpo, la cantidad terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente en ensayos de cultivo celular o en modelos animales, usualmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo animal también se puede usar para determinar el rango de concentración y la vía de administración apropiados. Dicha información luego se puede usar para determinar dosis y vías útiles para la administración en seres humanos.

35 La cantidad terapéuticamente efectiva precisa para un sujeto humano dependerá de la gravedad del estado de enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, peso y sexo del sujeto, dieta, tiempo y frecuencia de administración, combinación de fármacos, sensibilidad a la reacción y tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad se puede determinar por la experimentación de rutina y está dentro del criterio del clínico. Generalmente, una cantidad terapéuticamente efectiva será de 0,01 mg/kg a 50 mg/kg, por ejemplo 0,1 mg/kg a 20 mg/kg. Alternativamente, la dosis puede ser de 1 a 500 mg por día, tal como 10 a 100, 200, 300 ó 400 mg por día. Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar convenientemente en formas de dosis unitarias que contienen una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención en seres humanos.

40 Las composiciones se pueden administrar individualmente a un paciente o se pueden administrar en combinación (por ejemplo, en forma simultánea, secuencial o separada) con otros agentes, fármacos u hormonas.

45 La dosis a la que se administra la molécula de anticuerpo depende de la naturaleza de la afección para tratar, la extensión de la inflamación presente y de si la molécula de anticuerpo se está usando profilácticamente o para tratar una afección existente.

50 La frecuencia de dosis dependerá de la vida media de la molécula de anticuerpo y de la duración de su efecto. Si la molécula de anticuerpo tiene una vida media corta (por ejemplo 2 a 10 horas) puede ser necesario dar una o más dosis al día. Alternativamente, si la molécula de anticuerpo tiene una vida media larga (por ejemplo, de 2 a 15 días), puede ser necesario solo dar una dosis una vez al día, una vez por semana o incluso una vez cada 1 ó 2 meses.

55 El vehículo farmacéuticamente aceptable no debe por sí mismo inducir la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición y no debe ser tóxico. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes, de metabolización lenta, tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas virales inactivas.

Se pueden usar sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo sales de ácidos minerales, tales como clorhidratos,

bromhidratos, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.

5 Los vehículos farmacéuticamente aceptables en composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes o sustancias reguladoras del pH, pueden estar presentes en tales composiciones. Tales vehículos permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen como comprimidos, pastillas, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lechadas y suspensiones, para su ingestión por el paciente.

10 Las formas adecuadas para la administración incluyen formas adecuadas para administración parenteral, por ejemplo por inyección o infusión, por ejemplo mediante inyección en bolo o infusión continua. Cuando el producto es para inyección o infusión, puede adoptarse la forma de una suspensión, solución o emulsión en un vehículo oleoso o acuoso y puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, la molécula de anticuerpo puede estar en forma seca, para la reconstitución antes de su uso con un líquido estéril apropiado.

15 Una vez formuladas, las composiciones de la invención se pueden administrar directamente al sujeto. Los sujetos para tratar pueden ser animales. Sin embargo, en una o más realizaciones las composiciones se adaptan para la administración a sujetos humanos.

20 En una realización, en las formulaciones de acuerdo con la presente descripción, el pH de la formulación final no es similar al valor del punto isoeléctrico del anticuerpo o fragmento, porque si el pH de la formulación es 7 entonces un pl de 8-9 o superior puede ser apropiados. Aunque no se desea estar limitado por la teoría, se cree que esto puede proporcionar finalmente una formulación final con estabilidad mejorada, por ejemplo el anticuerpo o el fragmento permanece en solución.

25 Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar por numerosas vías que incluyen, pero sin limitación, oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea (por ejemplo ver WO 98/20734) subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual, intravaginal o rectal. También se pueden usar hipospray para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Típicamente, las composiciones terapéuticas se pueden preparar como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas. También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para la disolución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. Con preferencia, las moléculas de anticuerpo de la presente invención se administran por vía subcutánea, por inhalación o por vía tópica.

30 La administración directa de las composiciones se realizará generalmente mediante inyección, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, o se administra en el espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también se pueden administrar en un tejido específico de interés. El tratamiento de dosificación puede ser un esquema de dosis única o un esquema de dosis múltiples.

35 Se apreciará que el ingrediente activo en la composición será una molécula de anticuerpo. Como tal, será susceptible a la degradación en el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, si la composición se va a administrar por una vía que usa el tracto gastrointestinal, la composición necesitará contener agentes que protegen el anticuerpo de la degradación pero que liberan el anticuerpo una vez que ha sido absorbido desde el tracto gastrointestinal.

Una discusión completa de vehículos farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

40 En una realización, la formulación se proporciona como una formulación para administraciones tópicas que incluye inhalación.

45 Las preparaciones inhalables adecuadas incluyen polvos inhalables, aerosoles dosificadores que contiene gases propulsores o soluciones inhalables libres de gases propulsores (tales como soluciones o suspensiones nebulizables). Los polvos inhalables de acuerdo con la descripción que contiene la sustancia activa pueden consistir únicamente en las sustancias activas mencionadas anteriormente o en una mezcla de las sustancias activas mencionadas anteriormente con un excipiente fisiológicamente aceptable.

50 Estos polvos inhalables pueden incluir monosacáridos (por ejemplo glucosa o arabinosa), disacáridos (por ejemplo, lactosa, sacarosa, maltosa), oligo- y polisacáridos (por ejemplo dextranos), polialcoholes (por ejemplo sorbitol, manitol, xilitol), sales (por ejemplo, cloruro de sodio, carbonato de calcio) o mezclas de estos entre sí. Se emplean adecuadamente mono- o disacáridos, usando lactosa o glucosa, particularmente pero no exclusivamente en forma de sus hidratos.

Las partículas para la deposición en el pulmón requieren un tamaño de partícula menor de 10 micrones, tal como 1-9 micrones, por ejemplo de 0,1 a 5 μm , en particular de 1 a 5 μm . El tamaño de partícula del activo (tal como el anticuerpo o fragmento es de importancia primordial).

55 Los gases propulsores que se pueden usar para preparar los aerosoles inhalables son conocidos en la técnica. Los

gases propulsores adecuados se seleccionan entre hidrocarburos tales como n-propano, n-butano o isobutano y halohidrocarburos tales como derivados clorados y/o fluorados de metano, etano, propano, butano, ciclopropano o ciclobutano. Los gases propulsores mencionados anteriormente se pueden usar solos o en mezclas de estos.

5 Los gases propulsores particularmente adecuados son derivados de alcano halogenados seleccionados entre TG 11, TG 12, TG 134a y TG227. De los hidrocarburos halogenados mencionados anteriormente, TG134a (1,1,1,2-tetrafluoroetano) y TG227 (1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano) y sus mezclas son particularmente adecuados.

Los aerosoles inhalables que contienen gas propulsor también pueden contener otros ingredientes tales como cosolventes, estabilizantes, agentes de tensión superficial (tensioactivos), antioxidantes, lubricantes y medios para ajustar el pH. Todos estos ingredientes son conocidos en la técnica.

10 Los aerosoles inhalables que contienen gases propulsores de acuerdo con la invención pueden contener hasta 5% en peso de sustancia activa. Los aerosoles de acuerdo con la invención contienen, por ejemplo, 0,002 a 5% en peso, 0,01 a 3% en peso, 0,015 a 2% en peso, 0,1 a 2% en peso, 0,5 a 2% en peso, o 0,5 a 1% de peso de ingrediente activo.

15 Alternativamente, las administraciones tópicas al pulmón también pueden ser mediante la administración de una formulación en solución o suspensión solución líquida, por ejemplo empleando un dispositivo tal como un nebulizador, por ejemplo, un nebulizador conectado a un compresor (por ejemplo el nebulizador Pari LC-Jet Plus (R) conectado a un compresor Pari Master (R) fabricado por Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, Va.).

En una realización, la formulación se proporciona como ampollas diferenciadas que contienen una dosis unitaria para la administración mediante nebulización.

20 En una realización, el anticuerpo se suministra en forma liofilizada, para reconstituciones o alternativamente como formulación de suspensión.

25 El anticuerpo de la invención se puede dispersar en un solvente, por ejemplo, en forma de una solución o una suspensión. Se puede suspender en una solución fisiológica apropiada, por ejemplo, solución salina fisiológica, un solvente farmacológicamente aceptable o una solución tampón. Las soluciones tampón conocidas en la técnica pueden contener 0,05 mg a 0,15 mg de edetato disódico, 8,0 mg a 9,0 mg de NaCl, 0,15 mg a 0,25 mg de polisorbato, 0,25 mg a 0,30 mg de ácido cítrico anhidro y 0,45 mg a 0,55 mg de citrato de sodio por 1 ml de agua de modo de obtener un pH de aproximadamente 4,0 a 5,0. Como se mencionó anteriormente, una suspensión se puede preparar por ejemplo, a partir de anticuerpos liofilizados.

30 Las formulaciones en suspensión o solución terapéuticas también pueden contener uno o más excipientes. Los excipientes son bien conocidos en la técnica e incluyen tampón (por ejemplo, tampón citrato, tampón fosfato, tampón acetato y tampón bicarbonato), aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos, proteínas (por ejemplo, albúmina sérica), EDTA, cloruro de sodio, liposomas, manitol, sorbitol y glicerol. Las soluciones o suspensiones se pueden encapsular en liposomas o microesferas biodegradables. La formulación se proporcionará generalmente en una forma sustancialmente estéril empleando procedimientos de fabricación estériles.

35 Esto puede incluir la producción y esterilización por filtración de la solución solvente tampón usada para la formulación, suspensión aséptica del anticuerpo en la solución de solvente tampón estéril y dispensación de la formulación en recipientes estériles por métodos familiares a los expertos en la técnica.

La formulación nebulizable de acuerdo con la presente descripción puede proporcionarse, por ejemplo, como unidades de dosis única (por ejemplo, recipientes o viales de plástico sellados) envasados en sobres de aluminio. Cada vial contiene una dosis unitaria en un volumen, por ejemplo, 2 ml de tampón solvente/solución.

40 Se considera que los anticuerpos de la presente descripción son adecuados para su administración mediante nebulización.

45 También se prevé que el anticuerpo de la presente invención se pueda administrar mediante el uso de terapia génica. Para conseguir esto, las secuencias de ADN que codifican las cadenas pesadas y ligeras de la molécula de anticuerpo bajo el control de los componentes de ADN apropiados se introducen en un paciente de modo que tal que las cadenas de anticuerpo se expresan a partir de las secuencias de ADN y se ensamblan in situ.

50 La presente invención también proporciona una molécula de anticuerpo (o composiciones que la comprenden) para usar en el control de enfermedades inflamatorias, por ejemplo enfermedad inflamatoria aguda o crónica. Convenientemente, se puede usar la molécula de anticuerpo (o composiciones que la comprenden) para reducir el proceso inflamatorio o para prevenir el proceso inflamatorio. En una realización se proporciona una reducción in vivo de las células T activadas, en particular las involucradas en las respuestas inmunes inflamatorias inapropiadas, por ejemplo, reclutadas en la proximidad/lugar de tal respuesta.

La reducción de células T activadas, tal como se emplea en la presente, puede ser una reducción, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o más por ciento en comparación antes del tratamiento o sin tratamiento.

Ventajosamente, el tratamiento con un anticuerpo, fragmento o composición de acuerdo con la presente invención,

puede permitir la reducción en el nivel de células T activadas, sin reducir el nivel general de células T de los pacientes (células T inactivadas). Esto puede producir menos efectos secundarios, y posiblemente prevenir la reducción de las células T en el paciente.

5 La presente invención también proporciona la molécula de anticuerpos de la presente invención para usar en el tratamiento o profilaxis de un trastorno patológico mediado por IL-13 o asociado con un nivel aumentado de IL-13.

10 La afección o trastorno patológico se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en infecciones (virales, bacterianas, fúngicas y parasitarias), shock endotóxico asociado con infección, artritis tal como artritis reumatoide, asma como asma grave, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, enfermedad de Peyronie, enfermedad celíaca, enfermedad de la vesícula biliar, enfermedad pilonidal, peritonitis, psoriasis, vasculitis, adherencias quirúrgicas, accidente cerebrovascular, diabetes tipo I, enfermedad de Lyme, meningoencefalitis, uveítis autoinmune, trastornos inflamatorios inmunomediados del sistema nervioso central y periférico tales como esclerosis múltiple, lupus (como el lupus eritematoso sistémico) y síndrome de Guillain-Barr, dermatitis atópica, hepatitis autoinmune, alveolitis fibrosante, enfermedad de Grave, nefropatía IgA, púrpura trombocitopénica idiopática, enfermedad de Menière, pénfigo, cirrosis biliar primaria, sarcoidosis, esclerodermia, granulomatosis de Wegener, otros trastornos autoinmunes, pancreatitis, trauma (cirugía), enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de trasplante, enfermedad cardíaca que incluye enfermedades isquémicas tales como infarto de miocardio así como aterosclerosis, coagulación intravascular, resorción ósea, osteoporosis, osteoartritis, periodontitis e hipoclorhidria.

20 La presente invención también proporciona una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente invención para usar en el tratamiento o profilaxis del dolor, particularmente el dolor asociado con la inflamación.

En una realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención reduce la resistencia al tratamiento de la inflamación, particularmente la resistencia pulmonar al tratamiento de la inflamación.

25 En una realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención, reduce los niveles de proteína IL-13 en el tejido bronquial, por ejemplo en comparación con los niveles anteriores al tratamiento. La reducción puede ser de 5, 10, 20, 30, 40% o más.

En una realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención reduce los niveles de proteína de IL-13 en el líquido de lavado nasal y/o en el fluido broncoalveolar, por ejemplo en comparación con los niveles previos al tratamiento. La reducción puede ser de 5, 10, 20, 30, 40% o más.

30 En una realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención reduce la afluencia de eosinófilos, por ejemplo en comparación con los niveles previos al tratamiento. La reducción puede ser de 5, 10, 20, 30, 40% o más, por ejemplo cuando se trata durante 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más semanas.

35 En una realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención es adecuado para reducir niveles inadecuados de células caliciformes, por ejemplo en el tratamiento de hiperplasia de células caliciformes, tales como hiperplasia crónica de células caliciformes. La reducción se puede observar después del tratamiento durante 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más semanas.

En una realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención es adecuado para reducir los niveles de óxido nítrico exhalado (FeNO), en comparación con los niveles previos al tratamiento. Se considera que el óxido nítrico exhalado es un factor de riesgo o un marcador para la inflamación pulmonar.

40 En una realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención es adecuado para la prevención de la deposición de colágeno inapropiada asociada con respuestas inflamatorias, en particular la deposición de colágeno peribronquial.

En una realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención es adecuado para prevenir la angiogénesis inapropiada asociada con respuestas inflamatorias.

45 De este modo, se proporciona un anticuerpo de acuerdo con la invención para usar en el tratamiento y métodos de tratamiento que lo emplean.

El anticuerpo de acuerdo con la invención, tal como se emplea en la presente, también se refiere a fragmentos y derivados descritos en la memoria descriptiva.

50 La presente invención proporciona además el uso de una molécula, fragmento o composición de anticuerpo de acuerdo con la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de un trastorno patológico mediado por IL-13 o asociado con un aumento de IL-13, por ejemplo como se describe en la presente, en particular el trastorno patológico es artritis reumatoide, asma o EPOC.

La presente invención además proporciona además el uso de una molécula, fragmento o composición de anticuerpo de acuerdo con la invención presente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de una o más indicaciones médicas descritas en la presente.

Una molécula, fragmento o composición de anticuerpo de la presente invención se puede utilizar en cualquier terapia en la que se desea reducir los efectos de IL-13 en el cuerpo humano o animal. La IL-13 puede estar circulando en el cuerpo o puede estar presente en un nivel indeseablemente alto localizado en un sitio particular en el cuerpo, por ejemplo un sitio de inflamación.

- 5 En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención o una composición que comprende la misma se usa para el control de la enfermedad inflamatoria, por ejemplo, como se describe en la presente.

La presente invención también proporciona un método para tratar sujetos humanos o animales que padecen o están en riesgo de un trastorno mediado por IL-13, el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de la molécula de anticuerpo de la presente invención, o una composición que comprende la misma. En un ejemplo, la molécula de anticuerpo se administra por inhalación.

En un ejemplo, el trastorno se selecciona de cualquiera de las indicaciones médicas proporcionadas anteriormente. En un ejemplo, el trastorno se selecciona del grupo que consiste en: trastornos asmáticos, trastornos atópicos, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), afecciones que involucran inflamación de las vías respiratorias, eosinofilia, fibrosis y exceso de producción de moco, afecciones inflamatorias, afecciones autoinmunes, tumores o cánceres, infección viral y supresión de la expresión de las respuestas inmunitarias de protección del tipo 1.

En una realización se proporciona un proceso para purificar un anticuerpo (en particular un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención).

En una realización se proporciona un proceso para purificar un anticuerpo (en particular un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención) que comprende las etapas: realizar la cromatografía de intercambio aniónico en modo no unión de manera que las impurezas se conservan en la columna y el anticuerpo se mantiene en la fracción no unida. La etapa se puede realizar, por ejemplo, a un pH de aproximadamente 6-8.

El proceso puede comprender además una etapa de captura inicial que emplea cromatografía de intercambio catiónico, realizada por ejemplo a un pH de aproximadamente 4 a 5.

El proceso puede comprender además etapas adicionales de cromatografía para asegurar que las impurezas relacionadas con el producto y el proceso se resuelven apropiadamente de la corriente de producto.

El proceso de purificación puede comprender también una o más etapas de ultrafiltración, tal como una etapa de concentración y diafiltración.

En consecuencia, en una realización se proporciona un anticuerpo o fragmento de IL-13 purificado, por ejemplo un anticuerpo o fragmento humanizado, en particular un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención, sustancialmente purificado de, en particular libre o sustancialmente libre de endotoxina y/o proteína o ADN de célula huésped. Habiendo dicho esto, los anticuerpos de acuerdo con la presente invención generalmente se prepararán en células de mamífero y, por lo tanto, el contenido de endotoxina no es generalmente un problema. En efecto, el contenido de endotoxina es más una consideración cuando los anticuerpos se preparan en células bacterianas.

La forma purificada como se usa supra pretende referirse al menos al 90% de pureza, tal como 91,92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% p/p o más puro.

En general se considera que sustancialmente libre de endotoxina hace referencia a un contenido en endotoxinas de 1 UE por mg de producto de anticuerpo o menos tal como 0,5 o 0,1 EU por mg de producto.

En general se considera que sustancialmente libre de proteína o ADN de la célula huésped se refiere generalmente al contenido de proteína y/o ADN de célula huésped de 400 µg por mg de producto de anticuerpo o menos tal como 100 µg por mg o menos, en particular 20 µg por mg, según sea apropiado.

La molécula de anticuerpo de la presente invención también se puede utilizar en el diagnóstico, por ejemplo en el diagnóstico in vivo y la formación de imágenes de estados de enfermedad que implican IL-13.

Los ensayos in vivo adecuados para analizar las propiedades de los anticuerpos de acuerdo con la invención incluyen: el modelo del ácaro doméstico crónico, modelo de hiperreactividad a la metacolina y/u ovoalbúmina de la inflamación alérgica pulmonar.

Comprendido en el contexto de la presente memoria descriptiva se pretende incluir el significado.

Cuando sea técnicamente apropiada se pueden combinar las realizaciones de la invención apropiada.

En la presente se describen realizaciones que comprenden ciertas características/elementos. La descripción se extiende también a realizaciones separadas que consisten o consisten esencialmente en dichas características/elementos.

La presente invención se describe adicionalmente a modo de ilustración únicamente en los siguientes ejemplos, que

se refieren a las figuras adjuntas, en las que:

Figura 1 muestra: la secuencia de aminoácidos para una CDR 1,2, 3 de la cadena pesada (CDR H) y CDR 1, 2, 3 de la cadena ligera (CDR L) (SEQ ID NOs 1-6) la secuencia de aminoácidos para la región variable de la cadena ligera del anticuerpo de rata (SEQ ID NO:7)

- 5 la secuencia de ADN para la región variable de la cadena ligera del anticuerpo de rata (SEQ ID NO:8), y la secuencia de aminoácidos para la región variable de la cadena ligera del anticuerpo de rata con la secuencia señal (SEQ ID NO:9)

La **Figura 2** muestra la secuencia de ADN para la región variable de la cadena ligera del anticuerpo de rata con la secuencia señal (SEQ ID NO: 10)

- 10 la secuencia de aminoácidos para la región constante y variable de la cadena ligera del anticuerpo de rata (SEQ ID NO:11)

la secuencia de ADN para la región constante y variable de la cadena ligera del anticuerpo de rata (SEQ ID NO: 12)

la secuencia de aminoácidos para la cadena ligera del anticuerpo de rata con la secuencia señal (SEQ ID NO:13)

- 15 La **Figura 3** muestra la secuencia de ADN para la cadena ligera del anticuerpo de rata con la secuencia señal (SEQ ID NO: 14)

la secuencia de aminoácidos para la región variable de la cadena pesada del anticuerpo de rata (SEQ ID NO:15)

la secuencia de ADN para la región variable de la cadena pesada del anticuerpo de rata (SEQ ID NO:16) la secuencia de aminoácidos para la región variable de la cadena pesada del anticuerpo de rata con la secuencia señal (SEQ ID NO: 17)

- 20 La **Figura 4** muestra la secuencia de ADN para la región variable de la cadena pesada del anticuerpo de rata con la secuencia señal (SEQ ID NO:18)

la secuencia de aminoácidos para la región constante y variable de la cadena pesada del anticuerpo de rata (SEQ ID NO:19)

- 25 La **Figura 5** muestra la secuencia de ADN para la región constante y variable de la cadena pesada del anticuerpo de rata (SEQ ID NO:20) la secuencia de aminoácidos para la región constante y variable de la cadena pesada del anticuerpo de rata con la secuencia señal (SEQ ID NO:21)

La **Figura 6** muestra la secuencia de ADN para la región constante y variable de la cadena pesada del anticuerpo de rata con la secuencia señal (SEQ ID NO:22)

- 30 La **Figura 7** muestra la secuencia de aminoácidos para la región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado (SEQ ID NO:23)

la secuencia de ADN para la región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado (SEQ ID NO:24)

la secuencia de aminoácidos para la región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado con la secuencia señal (SEQ ID NO:25)

- 35 la secuencia de ADN para la región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado con la secuencia señal (SEQ ID NO:26)

la secuencia de aminoácidos para la región constante y variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado (SEQ ID NO:27)

La **Figura 8** muestra la secuencia de ADN para la región constante y variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado (SEQ ID NO:28)

- 40 la secuencia de aminoácidos para la región constante y variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado con la secuencia señal (SEQ ID NO:29)

la secuencia de ADN para la región constante y variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado con la secuencia señal (SEQ ID NO:30)

- 45 La **Figura 9** muestra la secuencia de aminoácidos para la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado (SEQ ID NO:31)

la secuencia de ADN para la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado (SEQ ID NO:32)

la secuencia de aminoácidos para la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado con la secuencia señal (SEQ ID NO:33)

la secuencia de ADN para la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado con la secuencia señal (SEQ ID NO:34)

5 la secuencia de aminoácidos para la región constante y variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado (SEQ ID NO:35)

La **Figura 10** muestra la secuencia de ADN para la región constante y variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado (SEQ ID NO:36)

10 la secuencia de aminoácidos para la región constante y variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado con la secuencia señal (SEQ ID NO:37)

la secuencia de ADN para la región constante y variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado (SEQ ID NO:38)

La **Figura 11** muestra secuencias de aminoácidos y ADN para el marco aceptor VK 1 2-1-(1)02 JK4 humano (SEQ ID NO:39 y SEQ ID NO:40) y marco aceptor VH2 3-1 2-26 JH4 (SEQ ID NO:41 y SEQ ID NO:42)

15 La **Figura 12** muestra un alineamiento de las cadenas ligeras para el marco aceptor de rata y las cadenas ligeras humanizadas y también las cadenas pesadas. Las CDR están en negrita y subrayados. Los residuos donantes G49 y R71 están en negrita, cursiva y resaltados.

Figura 13. Efecto de Ab652 sobre BAL eotaxina-3 medido 24 horas después de la exposición al alérgeno en un modelo de asma de primate no humano. Los datos se expresan como media \pm SEM, n = 4-8 por grupo.

20 **Figura 14.** Efecto de Ab652 en el recuento de eosinófilos de BAL medido 24 horas después de la exposición al alérgeno en un modelo de asma de primate no humano. Los datos se normalizan con el recuento de eosinófilos BAL medido en la fase de selección del estudio. Media \pm SEM, n = 4-8 por grupo.

Figura 15. Efecto de Ab652 en la resistencia pico de las vías respiratorias medida hasta 15 minutos después de la exposición al alérgeno en un modelo de asma de primate no humano. Los datos se expresan como media \pm SEM, n = 4-8 por grupo.

Figura 16. Efecto de Ab652 en la resistencia pico de las vías respiratorias medida 24 h después de la exposición al alérgeno en un modelo de asma de primate no humano. Los datos se normalizan con la resistencia de las vías respiratorias medida antes de la exposición al alérgeno. Media \pm SEM, n=4-8 por grupo

Ejemplos

30 1. Generación/Selección del anticuerpo terapéutico

Las ratas se inmunizaron con IL-13 humana purificada (PeproTech) o fibroblastos de rata que expresan IL-13 humana (que expresa aproximadamente 1 μ g/ml en el sobrenadante de cultivo) o, en algunos casos, una combinación de los dos. Después de 3 a 6 dosis, los animales se sacrificaron y se recolectaron PBMC, bazo, médula ósea y ganglios linfáticos. Los sueros se controlaron por la unión a IL-13 humana en ELISA y también para la capacidad de neutralizar hIL-13 en el ensayo celular indicador STATK-HEK-293 (ensayo HEK-Blue Invivogen).

40 Los cultivos de SLAM (cultivos de células B) se prepararon por un método similar al descrito por Zubler et al. (J. Immunol., 1985). En pocas palabras, 500-5000 esplenocitos o PBMC de un animal inmunizado se cultivaron en lotes de 100 placas de 96 pocillos con 200 μ l/pocillo de medio RPMI 1640 (Gibco BRL) suplementado con FCS 10% (PAA Laboratories Ltd), HEPES 2% Sigma Aldrich), L-glutamina 1% (Gibco BRL), solución de penicilina/estreptomina 1% (Gibco BRL), (3-mercaptopetanol 0,1% (Gibco BRL), sobrenadante de cultivo de esplenocito de conejo activado 3% y células de timoma EL-4 irradiadas con gamma (5×10^4 /pocillo) durante 7 días a 37 °C en una atmósfera de CO₂ 5%. Los sobrenadantes del cultivo de células B se analizaron en ensayos de selección y los sobrenadantes positivos se consolidaron en placas maestras. Las células B cultivadas se congelaron a -80 °C en 100 μ l de DMSO 10% en FCS.

45 Los sobrenadantes de cultivo de SLAM se analizaron primero en cuanto a su capacidad para unirse a hIL-13 en un ensayo basado en perlas en el FMAT. Se trató de un ensayo homogéneo que usa IL-13 humana biotinilada recubierta sobre perlas de estreptavidina y un conjugado de Fc-Cy5 anti-rata de cabra. Los cultivos positivos de este ensayo luego se incorporaron en el ensayo celular indicador HEK-293 IL-13R-STAT-6 (ensayo HEK-Blue, Invivogen) para identificar neutralizadores. Los sobrenadantes neutralizantes luego se perfilaron en el Biacore para estimar la tasa de disociación y también para caracterizar el modo de acción de la neutralización. La neutralización se clasificó como bin 1 o bin 2. Bin 1 representaba un anticuerpo que se une a IL-13 humana e impide la unión de IL-13Ra1 y como resultado también bloquea la unión de IL-4R. Bin 2 representó un anticuerpo que se une a hIL-13 de tal manera que permite la unión a IL-13Ra1, pero impide el reclutamiento de IL-4R en el complejo. Los autores seleccionaron los anticuerpos que actúan a través de bin 1.

Se identificaron aproximadamente 7500 positivos específicos para IL-13 en la prueba de FMAT primaria de un total de 27 x 100 placas experimentos SLAM. 800 pocillos demostraron neutralización en el ensayo HEK-blue. 170 pocillo tenían perfiles Biacore deseables, es decir, anticuerpos bin 1 con tasas de disociación $<5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Se intentó la clonación de región variable de estos 170 pocillos y 160 produjeron con éxito focos fluorescentes. 100 pocillos generaron pares de genes de regiones variables de cadena pesada y ligera después de la transcripción inversa (RT)-PCR. Estos genes de la región V se clonaron como anticuerpos IgG1 de longitud completa de ratón y se volvieron a expresar en un sistema de expresión transitorio HEK-293. El análisis de secuencia reveló que había 27 familias únicas de anticuerpo anti-IL-13 humana. Estos anticuerpos recombinantes luego se analizaron nuevamente por su capacidad para bloquear hIL-13 recombinante (derivada de *E. coli* y derivada de mamífero), variante hIL-13 recombinante (R130Q) (derivada de *E. coli*), hIL-13 natural tipo salvaje y variante (derivada de donantes humanos) e IL-13 de cynomolgus (derivados de mamíferos) en el ensayo basado en células. También se analizaron anticuerpos recombinantes en cuanto a su capacidad para unirse a variante de IL-13 humana (R130Q) e IL-13 de cynomolgus en Biacore. Después de esta caracterización, 5 familias de anticuerpos cumplieron con nuestros criterios, es decir anticuerpos sub-100 pM con un mínimo de caída en potencia y afinidad por todas las preparaciones de IL-13 humanas y de cynomolgus IL-13.

Se realizó la humanización de las 5 familias. Sobre la base de la potencia de neutralización, la afinidad y el contenido de donante en injertos humanizados, se seleccionó CA154_652 humanizado (ver más adelante) para una mayor progresión.

1.1 Humanización

El anticuerpo humanizado ejemplificado en la presente (Ab652) se preparó mediante el injerto de las CDR de las regiones V del anticuerpo de rata (SEQ ID NOs 7 y 15) (CDR descritas en la presente en las secuencias 1 a 6) sobre armazones de la región V de anticuerpos de la línea germinal humana. Los alineamientos de las secuencias de la región V (donante) del anticuerpo de rata con las secuencias de la región V (aceptora) del anticuerpo de la línea germinal humana se muestran en la Figura 12, junto con la secuencia humanizada diseñada. Las CDR injertadas del donante en la secuencia aceptora son como se definen en Kabat (Kabat et al. Sequence of proteins of immunological interest (1987). Bethesda MD, National Institutes of Health, Estados Unidos), con la excepción de CDR-H1 donde se usa la definición de Chothia/Kabat combinada (ver Adair *et al.* (1991) Humanised antibodies WO 91/09967). Se eligió la región V humana VH2 3-12-26 más la región J JH4 (V BASE, <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) como la aceptora de las CDR de la cadena pesada. Los residuos del marco de la cadena pesada son todos del gen de la línea germinal humana, con la excepción de los residuos 49 y 71 (numeración de Kabat), donde se retuvieron los residuos donantes Glicina (G49) y Arginina (R71), respectivamente. La retención de estos dos residuos donantes era esencial para la actividad completa del anticuerpo humanizado. Se eligió la región V humana VK1 2-1- (1) 02 más la región J JK4 (V BASE, <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) como aceptora de las CDR de la cadena ligera. Los residuos del marco de la cadena ligera son todos del gen de la línea germinal humana.

Los genes que codifican secuencias de la región V inicial se diseñaron y construyeron mediante un enfoque de síntesis automatizado por Entelechon GmbH. Se crearon numerosas variantes diferentes de la cadena pesada mediante la modificación del gen VH por mutagénesis dirigida a oligonucleótidos. La secuencia del gen gL1 se clonó en el vector de expresión de la cadena ligera humana pKH10.1 de UCB-Celltech, que contiene ADN que codifica la región constante de la cadena Kappa humana (alotipo Km3) ver SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 30. Los ocho genes VH injertados (gH1 a gH8) se clonaron en el vector de expresión de cadena pesada gamma-4 humana pBHy4P FL de UCB-Celltech, que contiene ADN que codifica la región constante de la cadena pesada gamma-4 humana con la mutación estabilizante de la bisagra S241P (Angal et, Mol. Immunol., 1993, 30 (1): 105 - 8). El gen de VH gH2 se seleccionó como el injerto de cadena pesada óptimo para potencia y las características biofísicas (que se describen más adelante en la presente), y se subclonó a continuación en el vector Fab de gamma-1 humano p1H1F3 de UCB-Celltech, que contiene ADN que codifica el dominio CH1 gamma- 1 humano (alotipo G1m17) (SEQ ID NO: 38). La co-transfección del plásmido de cadena pesada resultante con el plásmido de cadena ligera, en las células CHO-L761h produjo la expresión del anticuerpo humanizado en el formato Fab requerido. Este anticuerpo se denomina en la presente Ab652 (también denominado Fab Ab652).

Para facilitar la generación de una línea celular estable que expresaba el anticuerpo Ab652, se generó un plásmido único que contiene ADN que codifica tanto los casetes de expresión de cadena pesada como ligera y se generó un marcador de selección de glutamina sintetasa (GS). El gen GS permite la selección de células CHO recombinantes al permitir el crecimiento en medios suplementados con el inhibidor GS metionina sulfoximina (Bebbington et al., Biotechnol., 1992, 10 (2): 169-175).

1.2 Mediciones de afinidad de unión

La tecnología BIAcore controla la unión entre biomoléculas en tiempo real y sin el requerimiento de marcación. Uno de los interactuantes, denominado el ligando, es inmovilizado directamente o capturado sobre la superficie inmovilizada mientras que el otro, denominado el analito, fluye en solución sobre la superficie capturada. El sensor detecta el cambio de masa en la superficie del sensor cuando el analito se une al ligando para formar un complejo en la superficie. Esto corresponde al proceso de asociación. Se controla la disociación del analito del ligando cuando el analito se reemplaza por tampón. En el ensayo de afinidad BIAcore, el ligando es Ab652 y el analito es IL-13 humana.

1.3 Ensayo de bloqueo cruzado del receptor

5 El ensayo de bloqueo cruzado del receptor Biacore requiere la captura del Fab anti-IL-13 seguido de IL-13 (como el primer analito) que fluye sobre el ligando capturado para formar un complejo estable sobre la superficie del sensor. Un segundo analito (receptor de IL-13 recombinante soluble) luego se hace fluir sobre este complejo estable. Se controla la cantidad de unión del segundo analito al complejo estable. Los anticuerpos anti-IL-13 que no permiten que el segundo analito se una al complejo de anticuerpo: IL-13 estable se clasifican como competidores del Sitio 1. Los anticuerpos anti-IL-13 que permiten que el segundo analito se una al complejo de anticuerpo: IL-13 estable se clasifican como competidores del Sitio 2.

Materiales

10 Instrumento

Biacore ® 3000, Biacore AB, Uppsala, Suecia

Chip sensor

CM5 (grado de investigación) Número de catálogo: BR-1001-14, Biacore AB, Uppsala, Suecia. Los chips se almacenaron a 4 °C.

15 Kit de acoplamiento de amina

Número de catálogo: BR-1000-50, Biacore AB, Uppsala, Suecia.

Clorhidrato de etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). Compuesto hasta 75 mg/mL en agua destilada y almacenado en alícuotas de 200 µL a -70 °C.

20 N - Hidroxisuccinimida (NHS). Compuesto hasta 11,5 mg/ml en agua destilada y almacenado en alícuotas de 200 µl a -70 °C. Clorhidrato de etanolamina-NaOH 1 M pH 8,5. Almacenado en alícuotas de 200 µL a -70 °C.

Buffers

Buffer de corrida: HBS-EP (que es HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, Surfactant P20 0,005%). Número de catálogo: BR-1001-88, Biacore AB, Uppsala, Suecia. Buffer almacenado a 4 °C.

25 Buffer de inmovilización: Acetato 5,0 (que es acetato de sodio 10 mM, pH 5,0). Número de catálogo: BR-1003-51, Biacore AB, Uppsala, Suecia. Buffer almacenado a 4 °C.

Captura del ligando

Affinipure fragmento F(ab')₂ anti-IgG humana de cabra, fragmento F(ab')₂ específico. Jackson ImmunoResearch Inc (Pennsylvania, USA) Número de catálogo: 109-006-097. Reactivo almacenado a 4 °C.

Ligando

30 Ab652 (2,51, 21,7 y 3,86 mg/ml Fab), almacenado a 4 °C.

mIgG anti-h IL-13 (R&D Systems Europe Ltd, Abingdon, Oxon. Número de catálogo MAB-213, Número de lote RL04).

Analitos

IL-13 humana recombinante (0,2 mg/ml de D. Lightwood; R&D Systems Europe Ltd, Abingdon, Oxon. Número de catálogo 213-IL-050), almacenado a -70 °C y descongelado una vez para cada ensayo.

35 Receptor 1 hFc IL-13 humana recombinante (R&D Systems Europe Ltd, Abingdon, Oxon. Número de catálogo 146-IL-100). Almacenado a -70 °C y descongelado una vez para cada ensayo.

Receptor 2 hFc IL-13 humana recombinante (R&D Systems Europe Ltd, Abingdon, Oxon. Número de catálogo 614-IL-100). Almacenado a -70 °C y descongelado una vez para cada ensayo.

Solución de regeneración

40 HCl 40 mM preparado por dilución con agua destilada a partir de una solución patrón 11,6 M (BDH, Poole, Inglaterra. Número de catálogo: 101254H).

NaOH 5 mM preparado por dilución con agua destilada a partir de una solución patrón 50 mM. Número de catálogo: BR-1003-58, Biacore AB, Uppsala, Suecia.

Equipo clave

Biacore 3000 Biosensor, GE Healthcare Ltd, Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, HP7 9NA. El instrumento se mantiene de acuerdo con los protocolos del fabricante.

1.4 Mediciones de afinidad de unión Ab652

5 El formato del ensayo fue la captura del Ab652 por F(ab')₂ anti-humano inmovilizado y luego la titulación del hIL-13 humana sobre la superficie capturada.

Se realizó BIA (análisis de interacción biomolecular) usando un BIAcore 3000 (BIAcore AB). Se inmovilizaron fragmento F(ab')₂ Affinipure, anti-IgG humano de cabra, fragmento F(ab')₂ específico (Jackson ImmunoResearch) en un chip de sensor CM5 mediante química de acoplamiento de amina a un nivel de captura de ≈ 4000 unidades de respuesta (RUs). Se preparó una superficie blanco de una manera similar, omitiendo el fragmento F(ab')₂ del procedimiento. Se usó tampón HBS-EP (HEPES 10 mM a pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 0,005%, BIAcore AB) como tampón de corrida con un caudal de flujo de 10 ml/min. Se utilizó una inyección de 10 ml de Fab Ab652 a ~ 0,2 mg/ml para la captura por anti- IgG-F(ab')₂ humana inmovilizada para permitir suficiente unión a IL-13, pero también para minimizar los efectos de unión limitados por transporte de masa. La IL13 humana se tituló sobre el Ab652 capturado a diversas concentraciones (10 nM a 0,31 nM) con un caudal de flujo de 30 ml/min. La superficie se regeneró mediante una inyección de 10 ml de HCl 40 mM, seguido de una inyección de 5 ml de NaOH 5 mM a un caudal de flujo de 10 ml/min.

Las curvas de unión con sustracción de fondo se analizaron utilizando el programa de evaluación BIA (versión 3.2) siguiendo el procedimientos estándar. Los parámetros cinéticos se determinaron a partir del algoritmo de ajuste-

20 **TABLA 1**

muestra	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD	KD pM
Ab652 promedio de 3 determinaciones	4,51E+06	6,52E-05	1,52E-11	15

1.5 Estudios de bloqueo cruzado del receptor IL-13

El ensayo de bloqueo cruzado del receptor BIAcore requiere la captura del Fab anti-IL-13 seguido por IL-13 (como el primer analito) que fluye sobre el ligando de captura para formar un complejo estable sobre la superficie del sensor. Un segundo analito (receptor de IL-13 recombinante soluble) luego se hace fluir sobre este complejo estable. Luego se controla la cantidad de unión del segundo analito al complejo estable. Los anticuerpos anti-IL-13 que no permiten que el segundo analito se una al complejo de anticuerpo: IL-13 estable se clasifican como competidores del Eje 1. Los anticuerpos anti-IL-13 que permiten que el segundo analito se una al complejo de anticuerpo: IL-13 estable se clasifican como competidores del Eje 2.

30 Todos los experimentos se realizaron usando el biosensor Biacore 3000 a 25 °C. Se usó tampón HBS - EP como tampón de corrida con un caudal de flujo 10 ml/minuto (min). Se usaron las mismas superficies de sensor descritas para las determinaciones de afinidad.

Se usó una inyección de 10 ml de ~0,2 mg/ml del Fab anti-IL-13 humana para la captura por la superficie del sensor específica de anti-F(ab')₂ humano, F(ab')₂ IgG de cabra. El Fab anti-IL13 humana a 0,2 ug/ml proporcionó suficiente unión de anti-IL13 humana. La IL-13 humana a 25 nM se inyectó sobre el anticuerpo capturado inmediatamente por el receptor soluble de IL-13 humana a 100 nM a un caudal de flujo de 10 mL/min. La superficie se regeneró por dos inyecciones de 30 mL de HCl 40 mM, seguido por una inyección de 5 mL de NaOH 5 mM a un caudal de flujo de 30 mL/min.

40 Las curvas de unión con sustracción de fondo se analizaron utilizando el programa de evaluación BIA (versión 3.2) siguiendo el procedimientos estándar.

Tabla 2 Resumen de bloqueo Biacore

Anticuerpo	Unión Ab	Unión hIL-13	Unión hIL-13Ra1	Unión hIL-13Ra2
Ab652	103,1	22,4	-	1,5
Ab652	72,6	18,5	-0,4	-
Anticuerpo control	138,4	13,9	-	51,4
Anticuerpo control	126	11,6	15,4	-

5 IL-13 interactúa con cualquiera de los dos receptores (IL-13Ra1 e IL-13Ra2) para formar un complejo. Sólo el complejo hIL-13/hIL-13 a1 señala. Por lo tanto, los anticuerpos anti-IL13 que inhiben la señalización dependiente de IL-13 pueden mediar este efecto mediante el bloqueo de la interacción con hIL-13 a1. El sitio de interacción de Ab652 en IL-13 humana debía determinarse en un ensayo BIAcore. Ab652 fue capturado a su vez por una superficie de anti-F (ab')₂ humano inmovilizado y luego hIL-13 fue capturado a su vez por el Ab652. Se evaluó la unión de la IL-13 Ra1 soluble al complejo de IL-13/anticuerpo capturado. El ensayo se repitió con hIL-13Ra2 sustituido por hIL-13Ra1. La IL-13 presentada por Ab652 no podía unirse a ninguno de los receptores de IL-13, pero un anticuerpo anti-IL-13 de control comercial (mAb 213) fue capaz de presentar IL-13 al receptor soluble de IL-13. En conclusión, Ab652 inhibe la unión de IL-13 a ambas subunidades del receptor hIL-13, lo que lo define como competidor del Eje 1.

Tabla 3. Afinidad del Fab Ab652 purificado para hIL-13

	Ka (1/Ms)	kd (1/s) (tasa de asociación)	KD (tasa de disociación)	KD pM (afinidad medida KD)
Ab652	4,83E+06	4,22E-05	8,73E-12	9
Ab652	5,09E+06	6,64E-05	1,30E-11	13
	4,97E+06	5,90E-05	1,19E-11	12
	5,60E+06	6,70E-05	1,20E-11	12
	4,45E+06	7,11E-05	1,60E-11	16
	5,11E+06	4,67E-05	9,14E-12	9
	4,87E+06	6,25E-05	1,28E-11	13
Ab652	3,61E+06	8,69E-05	2,40E-11	24
AVERAGE	4,82E+06	6,27E-05	1,34E-11	13
SD	5,84E+05	1,4E-05	4,84E-12	

La afinidad de Ab652 por hIL-13 se determinó en un ensayo Biacore en tres ensayos separados. La afinidad estaba en el rango de 9-24 pM con una media de 13,4 (+4,8) pM

15 1.6 Potencia basada en células

La potencia in vitro de Fab Ab652 para neutralizar IL-13 se investigó usando el ensayo HEK-BLUE™ STAT-6 (Invivogen). El ensayo comprende células HEK293 que expresan de forma estable STAT-6 humano y que expresan de forma estable fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) bajo el control del promotor mínimo IFN- γ fusionado a cuatro sitios de unión a STAT-6. La potencia de neutralización (IC₅₀) de Ab652 se evaluó utilizando diferentes tipos de IL-13 humana, utilizada en el ensayo a 250 pg/ml. La potencia de neutralización se evaluó frente a la IL-13 humana de tipo salvaje recombinante producida a partir de células huésped bacterianas (E. coli) y de mamíferos (fibroblastos de rata). La potencia de neutralización se evaluó frente a la IL-13 humana de tipo salvaje natural y variante R130Q producida a partir de linfocitos T humanos y frente a IL-13 de mono cynomolgus recombinante producida en células de mamífero. hIL-13 R130Q no se purificó y se usó a una concentración que da una respuesta equivalente en el ensayo como 250 pg/ml de hIL-13. Además, se midió la potencia de neutralización del Fab CA154_652.g2 después de la nebulización usando el nebulizador de malla PARI eFLOW®. TABLA 4: Valores de IC₅₀ de Fab Ab652 contra múltiples formas de IL-13 en el ensayo de HEK Blue. Para la determinación de la afinidad funcional, se realizaron titulaciones de IL-13 en presencia de concentraciones fijas de Ab652. El análisis del gráfico de Schild se aplicó a los datos para determinar los valores de K_D para la neutralización de la IL-13 de tipo salvaje humano recombinante e IL-13 de mono cynomolgus recombinante. TABLA 5 Valores de IC₅₀ y K_D de Fab Ab652 frente a múltiples formas de IL-13 en el Ensayo Azul HEK.

Tabla 4

IL-13 fuente (250 pg/ml)	IC ₅₀ Fab Ab652 (ng/ml)
Derivada de <i>E. coli</i> , tipo salvaje	1,05
Mamífero (fibroblastos de rata), tipo salvaje	0,57
Células T humanas naturales, tipo salvaje	2,12
Células T humanas naturales, variante R130Q	1,66
Cynomolgus en el receptor humano (1/4,000 = 250pg/ml)	1,61
Fab nebulizado	1,15

Tabla 5

	Fuente de IL-13	IC ₅₀ ± SEM de Ab652		Afinidad funcional K _D de Ab652	
		ng/ml	p M	ng/ml	pM
Potencia frente a IL-13 tipo salvaje humana	Recombinante, derivada de <i>E. coli</i> (purificada)	0,670 ± 0,235 (n = 4)	14,267 ± 4,943 (n = 4)	-	-
	Recombinante, derivada de células de mamífero (fibroblastos de rata o sobrenadante de HEK293 transfectados)	0,611 ± 0,039 (n = 2)	12,857 ± 0,821 (n = 2)	0,103 (n = 1)	2,173 (n = 1)
	Natural, derivada de donante tipo salvaje homocigota (sobrenadante de PBMC)	1,544 ± 0,140 (n = 9)	32,503 ± 2,949 (n = 9)	-	-
Potencia frente a variante de IL-13 humana	Natural, derivada de donante de variante R130Q homocigota (sobrenadante de PBMC)	0,861 ± 0,141 (n = 7)	20,079 ± 3,082 (n = 7)	-	-
Potencia frente a IL-13 de Cynomolgus	Recombinante, derivada de células de mamífero (fibroblastos de rata o sobrenadante de HEK293 transfectados)	3,342 ± 0,431 (n = 13)	70,328 ± 9,072 (n = 13)	0,210 (n = 1)	4,414 (n = 1)
Potencia frente a IL-13 de rata	Recombinante, derivada de células de mamífero (sobrenadante de HEK293 transfectado)	952,600 (n = 1)	20,046,300 (n = 1)	-	-
Potencia frente a IL-13 de perro	Recombinante, derivada de células de mamífero (sobrenadante de HEK293 transfectado)	Sin reactividad cruzada (n = 2)	Sin reactividad cruzada (n = 2)	-	-

5 En general, estos datos demuestran que Fab Ab652 es similarmente potente en la neutralización de IL-13 humana recombinante y natural producida a partir de fuentes bacterianas y de mamíferos. La potencia de CA154_652.g2 frente a L-13 de cynomolgous en este ensayo no es más de 3 veces menor que frente a IL-13 humana también generada a partir de fibroblastos de rata. La potencia de CA154_652.g2 no se altera tras la nebulización con el nebulizador PARI eFLOW®.

10 1.7 Caracterización física de Ab652

Como se describió anteriormente, se generaron 8 regiones diferentes variables injertadas con anticuerpo utilizando las CDR derivadas del anticuerpo de rata seleccionado (SEQ ID NO: 1-6, Figura 1). La selección de Ab652 (gL1gH2) de los 8 injertos se basó en la potencia como se describió anteriormente y en las características biofísicas.

Sobre la base de los datos generados para todas las regiones variables injertadas ensayadas, se eligió el anticuerpo 652 porque:

- Mantuvo la afinidad más alta frente a hIL-13 y la variante IL-13
 - Presentó la temperatura de fusión más alta, T_m (indicador de mayor estabilidad)
- 5
- Mayor estabilidad del pH (por dicroísmo circular) es decir mostró menos alteración a pH bajo
 - No se agregó en la agitación o cuando se nebulizó.

Por el contrario, algunos de los otros injertos ensayados mostraron una reducción de la afinidad de unión, pobre estabilidad del pH y agregación por agitación y/o nebulización,

1.7.1 Efecto de la nebulización

- 10 Para determinar si Ab652 era adecuado para la nebulización se utilizó el nebulizador PARI eFLOW®. Los volúmenes de 2,5 ml de la solución de Ab652 en acetato de sodio 50 mM/cloruro de sodio 125 mM pH 5 se nebulizaron a temperatura ambiente (aproximadamente 21 °C) y se recolectaron por condensación del nebulizado en tubos de recolección enfriados. El análisis subsiguiente no indicó degradación evidente. El estudio se repitió también usando una solución en PBS, pH 7. Se incluyó un control positivo de IgG4, ya que se había hallado que se agregaba durante la nebulización. El análisis de las muestras nebulizadas fue por exclusión de tamaño, SDS-PAGE, dispersión dinámica de luz y unión a ligando, con el objetivo particular de detectar material agregado presente. No se hallaron cambios evidentes por ninguna de estas técnicas, lo que indica que Ab652 fue resistente al daño durante la nebulización.
- 15

1.7.2 Resumen de las características físicas de Ab652

pI (punto isoeléctrico) 8 (promedio de dos determinaciones).

- 20 Estabilidad térmica T_m 84 °C.

No se observó agregación de Ab652 cuando el anticuerpo se sometió a agitación/batido o nebulización.

2. Efecto de Ab652 en un modelo de asma de primate no humano

Objetivo

- 25 El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia de Ab652 en un modelo de asma de primate no humano. Los criterios de valoración primarios incluyeron los efectos sobre el recuento de células del lavado broncoalveolar (BAL), niveles de quimioquinas y cambios en la función pulmonar temprana y tardía evaluado por resistencia pulmonar (R_L).

Métodos

- 30 Ab652 se suministró usando un nebulizador de malla. Los estudios de simulación de respiración se llevaron a cabo usando parámetros típicos del ventilador y el montaje de tuberías usadas en la instalación del estudio. Los resultados de los estudios de simulación de la respiración indicaron que el 40,4% de la carga de material en el nebulizador se suministraría a nivel del tubo endotraqueal.

- 35 Los animales de estudio se seleccionaron sobre la base de los valores históricos de la función pulmonar y los recuentos de eosinófilos del BAL. En la sesión de selección, los animales se sometieron a una exposición al antígeno de *Ascaris suum* (*A. suum*) antes de la asignación a grupos de tratamiento con el fin de caracterizar su respuesta normal (no tratada) a *A. suum*. Después de esta sesión de selección, los animales se asignaron a grupos de dosis sobre la base de recuentos de células BAL y datos de función pulmonar de la sesión de selección. En la sesión de tratamiento, los animales recibieron vehículo nebulizado (PBS), o Ab652 nebulizado a nivel de dosis en el nebulizador de 0,1, 1, 10 y 60 mg/animal/día. Las dosis se administraron por medio del nebulizador en los Días -2, -1, 1, 2 y 3. En los Días 1 y 2, la administración del tratamiento ocurrió aproximadamente 30 minutos antes de la exposición a *A. suum*.

- 40 Los procedimientos de exposición fueron idénticos para ambas sesiones. Cada animal se expuso en los días 1 y 2, y se registraron los valores de la función pulmonar (R_L) durante al menos 15 minutos después de cada exposición al antígeno y 24 h después de cada exposición al alérgeno. Se recogió el líquido BAL antes de la primera exposición y aproximadamente 24 horas después de la segunda exposición para la evaluación del número total de células, morfología y recuentos diferenciales con el fin de evaluar el grado de inflamación pulmonar. Se recogieron muestras de sobrenadante de BAL y se analizaron para determinar la concentración de quimioquinas.
- 45

Resultados

- 50 El Ab652 nebulizado inhibió significativamente el aumento de eotaxina-3 en BAL a dosis de mg/día bajas (Figura 13). El Ab652 nebulizado causó una inhibición dependiente de la dosis del aumento de eosinófilos en BAL medido entre las sesiones de selección y tratamiento (Figura 14). El Ab652 nebulizado inhibió de forma significativa y dependiente de la dosis el pico de respuesta en fase temprana en el día 2, medido hasta 15 minutos después de la exposición a *Ascaris*

en la sesión de tratamiento (Figura 15). El Ab652 nebulizado inhibió de forma significativa y dependiente de la dosis la respuesta de fase tardía medida 24 horas después de la exposición al alérgeno del día 2 (Figura 16).

Conclusiones

- 5 Los datos generados con Ab652 nebulizado en el modelo *Ascaris* de asma en monos cynomolgus demuestran que la inflamación pulmonar alérgica dirigida por IL-13 es sensible a la modulación farmacológica por un fragmento Fab anti-IL-13 neutralizante administrado directamente a las vías respiratorias en un aerosol. Ab652 fue significativamente potente, y demuestra eficacia a dosis mg/día bajas.

Listado de secuencias

<110> UCB Pharma S.A.
 Gozzard, Neil
 5 Lawson, Alastair
 Lightwood, Daniel
 Palframan, Roger
 Smith, Bryan
 Tyson, Kerry
 10
 <120> Moléculas de anticuerpo que tienen especificidad por IL-13 humana.

 <130> G0086-WO01
 15 <150> GB 0904214.4
 <151> 11-03-2009

 <160> 46
 20 <170> PatentIn version 3.5

 <210> 1
 <211> 10
 <212> PRT
 25 <213> Artificial

 <220>
 <223> CDRH1
 30 <400> 1

 Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr His Val Gln
 1 5 10

 <210> 2
 35 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 40 <223> CDRH2

 <400> 2

 Val Met Trp Ser Asp Gly Asp Thr Ser Phe Asn Ser Val Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 45
 <210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> CDRH3

 <400> 3
 55
 Asp Gly Thr Ile Ala Ala Met Asp Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

 <210> 4
 <211> 11
 60 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 615 978 T3

<220>
<223> CDRL1

<400> 4

5 Leu Ala Ser Glu Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 5
<211> 7
10 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL2

15 <400> 5

His Thr Ser Arg Leu Gln Asp
1 5

20 <210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> CDRL3

<400> 6

Gln Gln Gly Tyr Arg Phe Pro Leu Thr
30 1 5

<210> 7
<211> 107
<212> PRT
35 <213> Artificial

<220>
<223> Cadena Ligera Variable de Rata

40 <400> 7

ES 2 615 978 T3

Met Gly Val Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Ile Thr
 1 5 10 15

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

Ala Ser Leu Gly Glu Thr Val Ser Ile Glu Cys Leu Ala Ser Glu Asp
 35 40 45

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

Gln Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser
 85 90 95

Asn Met Gln Pro Glu Asp Glu Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr
 100 105 110

Arg Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 115 120 125

<210> 10
 <211> 381
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cadena Ligera Variable de Rata con secuencia de señal

10 <400> 10

```

atgggtgtcc ccaactcagct cttgggggttg ttgttactgt ggattacaga tgccatatgt      60
gacatccaga tgacacagtc tccacattcc ctgtctgcat ctctgggaga aactgtctcc      120
atcgaatgtc tagcaagtga ggacatttcc aattatntag cgtgggtatca gcagaagcca      180
ggaaaatctc ctcagctctt gatctatcat acaagtaggt tgcaagatgg ggtcccatca      240
cggttcagtg gcagtgatc tggcacacag ttttctctca agatcagtaa catgcaacct      300
gaagatgaag ggtctatta ctgtcaacag ggttacaggt ttccgctcac gttcggttct      360
15 gggaccaagc tgggaattgaa a                                          381
  
```

<210> 11
 <211> 214
 <212> PRT
 20 <213> Artificial

<220>
 <223> Cadena Ligera de Rata

25 <400> 11

ES 2 615 978 T3

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

5 <210> 12
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cadena Ligera de Rata

<400> 12

ES 2 615 978 T3

```
gacatccaga tgacacagtc tccacattcc ctgtctgcat ctctgggaga aactgtctcc      60
atcgaatgtc tagcaagtga ggacatttcc aattatttag cgtggtatca gcagaagcca      120
ggaaaatctc ctcagctctt gatctatcat acaagtaggt tgcaagatgg ggtcccatca      180
cggttcagtg gcagtggatc tggcacacag ttttctctca agatcagtaa catgcaacct      240
gaagatgaag gggctctatta ctgtcaacag ggttacaggt ttccgctcac gttcggttct      300
gggaccaagc tgggaattgaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatctat ctccacca      360
tccacggaac agttagcaac tggaggtgcc tcagtcgtgt gcctcatgaa caacttctat      420
cccagagaca tcagtgtaaa gtggaagatt gatggcactg aacgacgaga tgggtctctg      480
gacagtgtta ctgatcagga cagcaaagac agcacgtaca gcatgagcag caccctctcg      540
ttgaccaagg ctgactatga aagtcataac ctctatacct gtgaggttgt tcataagaca      600
tcatcctcac ccgtcgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gt                          642
```

<210> 13
<211> 234
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Cadena Ligera de Rata con secuencia de señal

<400> 13

Met Gly Val Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Ile Thr
1 5 10 15

ES 2 615 978 T3

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

<210> 14
 <211> 702
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 10 <223> Cadena Ligera de Rata con secuencia de señal

<400> 14

ES 2 615 978 T3

```

atgggtgtcc ccaactcagct cttgggggttg ttgttactgt ggattacaga tgccatatgt      60
gacatccaga tgacacagtc tccacattcc ctgtctgcat ctctgggaga aactgtctcc      120
atcgaatgtc tagcaagtga ggacatttcc aattatttag cgtgggatca gcagaagcca      180
ggaaaaatctc ctcagctctt gatctatcat acaagtaggt tgcaagatgg ggtcccatca      240
cggttcagtg gcagtggtac tggcacacag ttttctctca agatcagtaa catgcaacct      300
gaagatgaag gggctctatta ctgtcaacag ggttacaggt ttccgctcac gttcggttct      360
gggaccaagc tgggaattgaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatctat ctteccacca      420
tccacggaac agttagcaac tggaggtgcc tcagtcgtgt gcctcatgaa caacttctat      480
cccagagaca tcagtgtaa gtggaagatt gatggcactg aacgacgaga tgggtgtctg      540
gacagtgtta ctgatcagga cagcaaagac agcacgtaca gcatgagcag caccctctcg      600
ttgaccaagg ctgactatga aagtcataac ctctatacct gtgaggttgt tcataagaca      660
tcatcctcac ccgtcgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gt      702

```

<210> 15
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Cadena Pesada variable de Rata

10

<400> 15

```

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20          25          30

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

15 Gly Val Met Trp Ser Asp Gly Asp Thr Ser Phe Asn Ser Val Leu Lys
50          55          60

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

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

Arg Asp Gly Thr Ile Ala Ala Met Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100         105         110

Gly Val Met Val Thr Val Ser
115

```

ES 2 615 978 T3

<210> 16
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Cadena Pesada variable de Rata

<400> 16

10

```

cagggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtgcagc cctcacagac cctgtctctc      60
acctgcactg tctctggggt ctcattaacc aactatcatg tgcagtgggt tcggcagcct      120
ccaggaaaag gtctggagtg gatgggagta atgtggagtg atggagacac atcatttaat      180
tcagttctca aatctcgact gagcatcagc agggacacct ccaagagcca agttttctta      240
aaaatgagca gtctgcaaac tgaagacaca gccacttact actgtgccag agatggaact      300
atagcagcta tggactactt tgattattgg ggccaaggag tcatggtcac cgtctcag      357
    
```

<210> 17
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> Cadena Pesada variable de Rata con secuencia de señal

20

<400> 17

```

Met Ala Val Leu Val Leu Leu Leu Cys Leu Met Thr Phe Pro Ser Cys
1          5          10          15

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

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
35          40          45

Thr Asn Tyr His Val Gln Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
50          55          60

Glu Trp Met Gly Val Met Trp Ser Asp Gly Asp Thr Ser Phe Asn Ser
65          70          75          80

Val Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln
85          90          95

Val Phe Leu Lys Met Ser Ser Leu Gln Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
100         105         110

Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Thr Ile Ala Ala Met Asp Tyr Phe Asp Tyr
115         120         125

Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser
130         135
    
```

25

<210> 18
 <211> 414

ES 2 615 978 T3

<212> ADN
<213> Artificial

<220>

5 <223> Cadena Pesada variable de Rata con secuencia de señal

<400> 18

```
atggctgtcc tgggtgctggt gctctgcctg atgacatttc caagctgtgt cctgtcccag      60
gtgcagctga aggagtcagg acctggcctg gtgcagccct cacagaccct gtctctcacc      120
tgcactgtct ctgggttctc attaaccaac tatcatgtgc agtgggttcg gcagcctoca      180
ggaaaaggtc tggagtggat gggagtaatg tggagtgatg gagacacatc atttaattca      240
gttctcaaat ctcgactgag catcagcagg gacacctoca agagccaagt tttcttaaaa      300
atgagcagtc tgcaaactga agacacagcc acttactact gtgccagaga tggaactata      360
gcagctatgg actactttga ttattggggc caaggagtca tggtcaccgt ctcg          414
```

10

<210> 19
<211> 446
<212> PRT
<213> Artificial

15

<220>
<223> Cadena Pesada de Rata

20

<400> 19

ES 2 615 978 T3

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

ES 2 615 978 T3

Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asn Cys Gly Gly
 210 215 220

Asp Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Gly Ser Glu Val Ser Ser Val Phe
 225 230 235 240

Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro
 245 250 255

Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val
 260 265 270

His Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
 275 280 285

Arg Pro Pro Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu
 290 295 300

Leu Pro Ile Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Arg Thr Phe Arg Cys
 305 310 315 320

Lys Val Thr Ser Ala Ala Phe Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

Lys Pro Glu Gly Arg Thr Gln Val Pro His Val Tyr Thr Met Ser Pro
 340 345 350

Thr Lys Glu Glu Met Thr Gln Asn Glu Val Ser Ile Thr Cys Met Val
 355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Tyr Val Glu Trp Gln Met Asn Gly
 370 375 380

Gln Pro Gln Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Thr Met Asp Thr Asp
 385 390 395 400

Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn Val Lys Lys Glu Lys Trp
 405 410 415

Gln Gln Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His
 420 425 430

Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

5 <210> 20
 <211> 1338
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cadena Pesada de Rata

<400> 20

ES 2 615 978 T3

```

cagggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctgggtgcagc cctcacagac cctgtctctc      60
acctgcactg tctctggggt ctcatataacc aactatcatg tgcagtgggt tcggcagcct      120
ccaggaaaag gtctggagtg gatgggagta atgtggagtg atggagacac atcatttaat      180
tcagttctca aatctcgact gagcatcagc agggacacct ccaagagcca agttttotta      240
aaaatgagca gtctgcaaac tgaagacaca gccacttact actgtgccag agatggaact      300
atagcagcta tggactactt tgattattgg ggccaaggag tcatggtcac cgtctcgtca      360
gctgaaacaa cagccccatc tgtctatcca ctggctcctg gaactgctct caaaagtaac      420
tccatggtga ccctgggatg cctggtaaac ggctatttcc ctgagccagt caccgtgacc      480
tggaaactctg gagccctgtc cagcgggttg cacaccttcc cagctgtcct gcagtctggg      540
ctctacactc tcaccagctc agtgactgta cctccagca cctggcccag ccagacogtc      600
acctgcaacg tagcccacc ggccagcagc accaagggtg acaagaaaat tgtgcccaga      660
aactgtggag gtgattgcaa gccttgata tgtacaggct cagaagtatc atctgtcttc      720
atcttcccc caaagcccaa agatgtgctc accatcactc tgactcctaa ggtcacgtgt      780
gttgtggtag acattagcca ggacgatccc gaggtccatt tcagctgggt ttagatgac      840
gtggaagtcc acacagctca gactcgacca ccagaggagc agttcaacag cactttccgc      900
tcagtcagtg aactccccat cctgcaccag gactggetca atggcaggac gttcagatgc      960
aaggtcacca gtgcagcttt cccatcccc atcgagaaaa ccatctccaa acccgaaggg      1020
agaacacaag ttcgcatgt atacaccatg tcacctacca aggaagagat gaccagaat      1080
gaagtcaagta tcacctgcat ggtaaaaggc ttctatcccc cagacattta tgtggagtgg      1140
cagatgaacg ggcagccaca ggaaaactac aagaacactc cacctacgat ggacacagat      1200
gggagttact tcctctacag caagctcaat gtgaagaagg aaaaatggca gcagggaaac      1260
acgttcacgt gttctgtgct gcatgaaggc ctgcacaacc accatactga gaagagtctc      1320
tcccactctc cgggtaaa                                     1338

```

5 <210> 21
 <211> 465
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cadena Pesada de Rata con secuencia de señal
 <400> 21

ES 2 615 978 T3

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

ES 2 615 978 T3

Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ala Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Leu Thr Ser Ser Val Thr
 195 200 205

Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala
 210 215 220

His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asn
 225 230 235 240

Cys Gly Gly Asp Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Gly Ser Glu Val Ser
 245 250 255

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr
 260 265 270

Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Gln Asp Asp
 275 280 285

Pro Glu Val His Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr
 290 295 300

Ala Gln Thr Arg Pro Pro Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser
 305 310 315 320

Val Ser Glu Leu Pro Ile Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Arg Thr
 325 330 335

Phe Arg Cys Lys Val Thr Ser Ala Ala Phe Pro Ser Pro Ile Glu Lys
 340 345 350

Thr Ile Ser Lys Pro Glu Gly Arg Thr Gln Val Pro His Val Tyr Thr
 355 360 365

Met Ser Pro Thr Lys Glu Glu Met Thr Gln Asn Glu Val Ser Ile Thr
 370 375 380

Cys Met Val Lys Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Tyr Val Glu Trp Gln
 385 390 395 400

ES 2 615 978 T3

gtggtagaca ttagccagga cgatcccagag gtccatttca gctggtttgt agatgacgtg 900
 gaagtccaca cagctcagac tcgaccacca gaggagcagt tcaacagcac tticcgtca 960
 gtcagtgaac tccccatcct gcaccaggac tggctcaatg gcaggacgtt cagatgcaag 1020
 gtcaccagtg cagctttccc atcccccate gagaaaacca tctccaaacc cgaaggcaga 1080
 acacaagttc cgcagtata caccatgtca cctaccaagg aagagatgac ccagaatgaa 1140
 gtcagtatca cctgcatggt aaaaggcttc tatccccag acatttatgt ggagtggcag 1200
 atgaacgggc agccacagga aaactacaag aacctccac ctacgatgga cacagatggg 1260
 agttacttcc tctacagcaa gctcaatgtg aagaaggaaa aatggcagca gggaaacacg 1320
 ttcacgtggt ctgtgctgca tgaaggcctg cacaaccacc atactgagaa gagtctctcc 1380
 cactctccgg gtaaa 1395

5 <210> 23
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Ab652 VL
 <400> 23

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

15 <210> 24
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Ab652 VL
 <400> 24

ES 2 615 978 T3

```

gatatccaga tgaccagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact      60
attacctgtc tggctagcga ggacatctcc aactacctgg cgtggtatca gcagaaaccg      120
ggtaaagcgc cgaaactgct gatctatcac acttcccgtc tgcaggacgg tgttccgtct      180
cgtttctctg gttccggttc tggtaaggac ttcacctga ccatctette tctgcagcca      240
gaagacttcg cgacttacta ctgccagcag ggttaccggt ttccgctgac cttcggtggt      300
ggtaccaaag ttgaaatcaa a                                              321

```

5 <210> 25
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Ab652 VL con secuencia de señal
 <400> 25

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

15 Arg Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

20 <210> 26
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Ab652 VL con secuencia de señal

25 <400> 26

ES 2 615 978 T3

```

atgtctgtcc ccaccaagt cctcggactc ctgctactct ggcttacaga tgccagatgc      60
gatatccaga tgaccagag tccaagcagt ctctccgccg gcgtaggcga tegtgtgact      120
attacctgtc tggctagcga ggacatctcc aactacctgg cgtgggatca gcagaaaccg      180
ggtaaagcgc cgaaaactgct gatctatcac acttcccgtc tgcaggacgg tgttccgtct      240
cgtttctctg gttccgggtc tggtagcgac ttcacctga ccatctcttc tctgcagcca      300
gaagacttcg cgacttacta ctgccagcag ggttaccggt ttcogctgac cttcgggtgg      360
ggtaccaaag ttgaaatcaa a                                             381

```

```

<210> 27
<211> 214
5 <212> PRT
   <213> Artificial

```

```

<220>
10 <223> cadena ligera Ab652 (variable y constante)

```

```

<400> 27

```

```

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

```

```

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Glu Asp Ile Ser Asn Tyr
           20           25           30

```

```

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

```

```

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

```

ES 2 615 978 T3

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 Gly Tyr Arg Phe Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

- <210> 28
- <211> 642
- 5 <212> ADN
- <213> Artificial

- <220>
- 10 <223> cadena ligera Ab652 (variable y constante)

<400> 28

gatatccaga tgaccagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggoga tcgtgtgact	60
attacctgtc tgctagcga ggacatctcc aactacctgg cgtggtatca gcagaaaccg	120
ggtaaagcgc cgaaactgct gatctatcac acttcccgtc tgcaggacgg tgttccgtct	180

ES 2 615 978 T3

```

cgtttctctg gttccgggtc tggtaacggac ttcaccctga ccatctcttc tctgcagcca      240
gaagacttgc cgacttacta ctgccagcag ggttaccggt ttcogctgac cttcgggtgt      300
ggtaccaaag ttgaaatcaa acgtacggta gcggccocat ctgtcttcat cttcccgcca      360
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttttat      420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag      480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg      540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgctt gcgaagtac ccatcagggc      600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt                          642

```

```

<210> 29
<211> 234
5 <212> PRT
   <213> Artificial

```

```

<220>
10 <223> cadena ligera Ab652 (variable y constante) con secuencia de señal

```

```

<400> 29

```

```

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

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

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

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

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

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

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

Arg Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
          115          120          125

```

ES 2 615 978 T3

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

5 <210> 30
 <211> 702
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> cadena ligera Ab652 (variable y constante) con secuencia de señal
 <400> 30

```

atgtctgtcc ccaccaagt cctcggactc ctgtactctt ggcttacaga tgccagatgc      60
gatatccaga tgaccagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact      120
attacctgtc tggctagcga ggacatctcc aactacctgg cgtggtatca gcagaaaccg      180
ggtaaagcgc cgaaaactgct gatctatcac acttcccgtc tgcaggacgg tgttccgtct      240
cgtttctctg gtccgggttc tggtagcgac ttcacctga ccattctctt tctgcagcca      300
gaagacttcg cgacttacta ctgccagcag ggttaccggt tcccgctgac ctccggtggt      360
ggtaccaaag ttgaaatcaa acgtacggta gcggcccat ctgtcttcat ctcccgcca      420
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat      480
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgcc tccaatcggg taactccag      540
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg      600
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc      660
15 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt                          702
  
```

20 <210> 31
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Ab652 VH

ES 2 615 978 T3

<400> 31

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Val Met Trp Ser Asp Gly Asp Thr Ser Phe Asn Ser Val Leu Lys
50 55 60

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

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Gly Thr Ile Ala Ala Met Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115

5

<210> 32
<211> 357
<212> ADN
<213> Artificial

10

<220>
<223> Ab652 VH

15

<400> 32

caggtgacct tgaagaatc tgggtccggt ctggtgaaac caacggaac cctgactctg 60
acgtgcaacc tttctggttt ctctctgacc aactaccacg ttcagtggat tctcagccg 120
ccgggtaaag cgctggaatg gctgggtggt atgtggagcg acggtgacac cagcttcaac 180
tctgtgctga aatctcgctt gaccatctcc cgtgatactt ccaaatcca ggttgctgctg 240
accatgacga acatggacct ggtagatact gcaacctact actgtgcacg tgatggcaact 300
atcgcggcta tggattactt cgactattgg ggtcagggta cctggttac cgtctctg 357

20

<210> 33
<211> 138
<212> PRT
<213> Artificial

25

<220>
<223> Ab652 VH con secuencia de señal
<400> 33

ES 2 615 978 T3

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
 1 5 10 15

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

Pro Thr Glu Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45

Thr Asn Tyr His Val Gln Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu
 50 55 60

Glu Trp Leu Gly Val Met Trp Ser Asp Gly Asp Thr Ser Phe Asn Ser
 65 70 75 80

Val Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln
 85 90 95

Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Thr Ile Ala Ala Met Asp Tyr Phe Asp Tyr
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

130 135

- 5 <210> 34
- <211> 414
- <212> ADN
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> Ab 652 VH con secuencia de señal

<400> 34

```

atggaatgga gctgggtctt tctcttcttc ctgtcagtaa ctacaggagt ccattctcag      60
gtgacctga aagaatctgg tccggttctg gtgaaaccaa cggaaaccct gactctgacg      120
tgcaccgttt ctggtttctc totgaccaac taccacgttc agtggattcg tcagccgccg      180
ggtaaagcgc tggaatggct ggggtgttatg tggagcgcag gtgacaccag cttcaactct      240
gtgctgaaat ctgcctgac catctcccgt gatacttcca aatcccaggt tgtgctgacc      300
atgacgaaca tggaccgggt agatactgca acctactact gtgcacgtga tggcactatc      360
gcggtatgg attacttcca ctattggggt cagggtaccc tggttaccgt ctcg          414
  
```

- 15 <210> 35
- <211> 223
- <212> PRT
- <213> Artificial

<220>
 <223> cadena pesada Ab652 (variable y constante)

ES 2 615 978 T3

<400> 35

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Val Met Trp Ser Asp Gly Asp Thr Ser Phe Asn Ser Val Leu Lys
50 55 60

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

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Gly Thr Ile Ala Ala Met Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

5 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

<210> 36

<211> 669

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> cadena pesada Ab652 (variable y constante)

15 <400> 36

ES 2 615 978 T3

```

caggtgaccc tgaagaate tggtcgggtt ctggtgaaac caacggaaac cctgactctg      60
acgtgcaccg tttctgggtt ctctctgacc aactaccacg ttcagtggat tcgtcagccg      120
ccgggtaaag cgctggaatg gctgggtggt atgtggagcg acggtgacac cagcttcaac      180
tctgtgctga aatctcgect gaccatctcc cgtgatactt ccaaatecca ggttgtgctg      240
accatgacga acatggaccc ggtagatact gcaacctact actgtgcacg tgatggcaact      300
atcggggcta tggattactt cgactattgg ggtcagggta cctgggttac cgtctcgagc      360
gcttetacaa agggcccate ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg      420
ggcacagcgg cctggggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg      480
tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca      540
ggactctact cctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc      600
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc      660
aaatcttgt                                     669

```

5 <210> 37
 <211> 242
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> cadena pesada Ab652 (variable y constante) con secuencia de señal
 <400> 37

```

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1           5           10          15

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

Pro Thr Glu Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
35          40          45

Thr Asn Tyr His Val Gln Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu
50          55          60

Glu Trp Leu Gly Val Met Trp Ser Asp Gly Asp Thr Ser Phe Asn Ser
65          70          75          80

Val Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln
85          90          95

Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr
100         105         110

Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Thr Ile Ala Ala Met Asp Tyr Phe Asp Tyr
115         120         125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
130         135         140

```

15

ES 2 615 978 T3

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 210 215 220

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 225 230 235 240

Ser Cys

- 5 <210> 38
- <211> 726
- <212> ADN
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> cadena pesada Ab652 (variable y constante) con secuencia de señal

<400> 38

```

atggaatgga gctgggtcct tctcttcttc ctgtcagtaa ctacaggagt ccattctcag      60
gtgacctga aagaatctgg tccggttctg gtgaaaccaa cggaaaccct gactctgacg      120
tgcaccgttt ctggtttctc tctgaccaac taccacgttc agtggattcg tcagccgccg      180
ggtaaagcgc tggaaatggct ggggtgttatg tggagcgcag gtgacaccag cttcaactct      240
gtgctgaaat ctgcctgac catctcccg gatacttcca aatcccaggt tgtgctgacc      300
atgacgaaca tggaccgggt agatactgca acctactact gtgcacgtga tggcactatc      360
gcggtatgg attacttcca ctattggggg cagggtaccc tggttaccgt ctcgagcgct      420
tctacaaagg gccatcgggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc      480
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg      540
aactcaggcg cctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtectaca gtcctcagga      600
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac      660
atctgcaacg tgaatcaca gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa      720
tcttgt                                           726
  
```

- 20 <210> 39
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> Artificial

ES 2 615 978 T3

<220>

<223> Marco acceptor VK1 2-1-(1) 02 JK4 humano

<400> 39

5

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

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

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

Tyr Ala 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 Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
85 90 95

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

<210> 40

<211> 322

10

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Marco acceptor VK1 2-1-(1) 02 JK4 humano

15

<400> 40

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcaactgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag totgcaacct 240

gaagatdddg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctctcac tttcggcgga 300

20

gggaccaagg tggagatcaa ac 322

<210> 41

<211> 114

25

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Marco acceptor VH2 3-1 2-26 JH4 humano

30

<400> 41

ES 2 615 978 T3

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
5 <223> JK4

<400> 44

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

10 <210> 45
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Péptido de señal de cadena pesada

<400> 45

20 Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser

<210> 46
<211> 20
25 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido de señal de cadena ligera

30 <400> 46

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

Asp Ala Arg Cys
20

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo antagonista que se une a IL-13 humana que comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO:31 y, adicionalmente, que comprende una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO:23.
2. Una molécula de anticuerpo antagonista según la reivindicación 1, en donde la molécula de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: una molécula de anticuerpo completa que tiene cadenas pesadas y ligeras de longitud completa o uno de sus fragmentos, tales como fragmentos de Fab, Fab' modificado, Fab', F(ab')₂, Fv o scFv.
- 10 3. Un anticuerpo antagonista que se une a IL-13 humana que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO:35 y una cadena ligera que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO:27.
4. Una molécula de anticuerpo antagonista según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que tiene una molécula efectora o reportera unida a ella.
5. Un anticuerpo antagonista según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que tiene una afinidad de unión por IL-13 humana aislada de 30 pM o mejor según se mide por resonancia plasmónica de superficie.
- 15 6. Una secuencia aislada de ADN que codifica la(s) cadena(s) pesada(s) y ligera(s) de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Un vector de clonación o expresión que comprende la secuencia de ADN según la reivindicación 6.
8. Un vector según la reivindicación 7, en donde el vector comprende las secuencias dadas en la SEQ ID NO:36 y la SEQ ID NO:28.
- 20 9. Una célula huésped para la expresión de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende:
- i) una secuencia de ADN que codifica la cadena pesada de dicho anticuerpo, y
- ii) una secuencia de ADN que codifica la cadena ligera de dicho anticuerpo y
- en donde las secuencias de ADN se proporcionan en uno o varios vectores de clonación o expresión.
- 25 10. Una célula huésped según la reivindicación 9 que comprende uno o varios vectores de clonación o expresión según la reivindicación 7 o la reivindicación 8.
11. Un procedimiento para la producción del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 10 y aislar el anticuerpo.
- 30 12. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en combinación con uno o varios de un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. Una composición farmacéutica según la reivindicación 12, que comprende adicionalmente otros ingredientes activos.
14. Un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una composición farmacéutica según la reivindicación 12 o la reivindicación 13, para uso en terapia.
- 35 15. Un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una composición farmacéutica según la reivindicación 12 o la reivindicación 13, para usar en el tratamiento o la profilaxis de un trastorno patológico que está mediado por IL-13, o que está asociado con un nivel aumentado de IL-13, en donde el trastorno patológico se selecciona del grupo que consiste en:
- 40 trastornos asmáticos, trastornos atópicos, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), afecciones que implican inflamación de las vías aéreas, eosinofilia, fibrosis y exceso de producción de mucosidad, afecciones inflamatorias, afecciones autoinmunes, tumores o cánceres e infección viral.
16. Un anticuerpo para uso según la reivindicación 15, en donde el anticuerpo es un fragmento Fab o Fab'.

FIGURA 1

SEQ ID No: 1 CDR H1

GFSLTNYHVQ

SEQ ID No: 2 CDR H2

VMWSDGDTSFNSVLKS

SEQ ID No: 3 CDR H3

DGTIAAMDYFDY

SEQ ID No: 4 CDR L1

LASEDISNYLA

SEQ ID No: 5 CDR L2

HTSRLQD

SEQ ID No: 6 CDR L3

QQGYRFPLT

SEQ ID No: 7 CDR de región VL de anticuerpo de rata en negrita
 DIQMTQSPHS LSASLGETVS IECLASEDIS **NYLAWYQQKP** GKSPQLLIYH
TSRLQDGVPS RFSGSGSGTQ FSLKISNMQP EDEGVYYCQQ **GYRFPLTFGS**
 GTKLELK

SEQ ID No: 8 Región VL de anticuerpo de rata
 gacatccaga tgacacagtc tccacattcc ctgtctgcat ctctgggaga
 aactgtctcc atcgaatgtc tagcaagtga ggacatttcc aattatttag
 cgtggtatca gcagaagcca ggaaaatctc ctcagctctt gatctatcat
 acaagtaggt tgcaagatgg ggtcccatca cggttcagtg gcagtggatc
 tggcacacag tttctctca agatcagtaa catgcaacct gaagatgaag
 ggtctatta ctgtcaacag ggttacaggt ttccgctcac gttcggttct
 gggaccaagc tgggaattgaa a

SEQ ID No: 9 Región VL de anticuerpo de rata con secuencia señal subrayada
MGVPTQLLGL LLLWITDAIC DIQMTQSPHS LSASLGETVS IECLASEDIS
 NYLAWYQQKP GKSPQLLIYH TSRLQDGVPS RFSGSGSGTQ FSLKISNMQP
 EDEGVYYCQQ GYRFPLTFGS GTKLELK

FIGURA 2

SEQ ID No: 10 Región VL de anticuerpo de rata con secuencia señal subrayada

atgggtgtcc ccactcagct cttgggggttg ttgttactgt ggattacaga
tgccatatgt gacatccaga tgacacagtc tccacattcc ctgtctgcat
ctctgggaga aactgtctcc atcgaatgtc tagcaagtga ggacatttcc
aattatntag cgtggtatca gcagaagcca ggaaaatctc ctcagctctt
gatctatcat acaagtaggt tgcaagatgg ggtcccatca cggttcagtg
gcagtggatc tggcacacag ttttctctca agatcagtaa catgcaacct
gaagatgaag gggcttatta ctgtcaacag ggttacaggt ttccgctcac
gttcggttct gggaccaagc tgaattgaa a

SEQ ID No: 11 Cadena liviana de anticuerpo de rata (constante V +)

DIQMTQSPHS LSASLGETVS IECLASEDIS NYLAWYQQKP GKSPQLLIYH
TSRLQDGVPS RFSGSGSGTQ FSLKISNMQP EDEGVYYCQQ GYRFPLTFGS
GTKLELKRAD AAPTVISIFPP STEQLATGGA SVVCLMNNFY PRDISVKWKI
DGTERRDGVL DSVTDQDSKD STYSMSSTLS LTKADYESHN LYTCEVVHKT
SSSPVVKSFN RNEC

SEQ ID No: 12 Cadena liviana de anticuerpo de rata (constante V +)

gacatccaga tgacacagtc tccacattcc ctgtctgcat ctctgggaga
aactgtctcc atcgaatgtc tagcaagtga ggacatttcc aattatntag
cgtggtatca gcagaagcca ggaaaatctc ctcagctctt gatctatcat
acaagtaggt tgcaagatgg ggtcccatca cggttcagtg gcagtggatc
tggcacacag ttttctctca agatcagtaa catgcaacct gaagatgaag
gggtctatta ctgtcaacag ggttacaggt ttccgctcac gttcgggttct
gggaccaagc tgaattgaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatctat
cttcccacca tccacggaac agttagcaac tggaggtgcc tcagtcgtgt
gcctcatgaa caacttctat cccagagaca tcagtgtaa gtggaagatt
gatggcactg aacgacgaga tgggtgtctg gacagtgta ctgatcagga
cagcaaagac agcacgtaca gcatgagcag caccctctcg ttgaccaagg
ctgactatga aagtcataac ctctatacct gtgaggttgt tcataagaca
tcactctcac ccgtcgtcaa gagcttcaac agaatgagt gt

SEQ ID No: 13 Cadena liviana de anticuerpo de rata con secuencia señal subrayada

MGVPTQLLGL LLLWITDAIC DIQMTQSPHS LSASLGETVS IECLASEDIS
NYLAWYQQKP GKSPQLLIYH TSRLQDGVPS RFSGSGSGTQ FSLKISNMQP
EDEGVYYCQQ GYRFPLTFGS GTKLELKRAD AAPTVISIFPP STEQLATGGA
SVVCLMNNFY PRDISVKWKI DGTERRDGVL DSVTDQDSKD STYSMSSTLS
LTKADYESHN LYTCEVVHKT SSSPVVKSFN RNEC

FIGURA3

SEQ ID No: 14 Cadena liviana de anticuerpo de rata con secuencia señal subrayada

atgggtgtcc ccactcagct cttgggggtg ttgttactgt ggattacaga
tgccatatgt gacatccaga tgacacagtc tccacattcc ctgtctgcat
ctctgggaga aactgtctcc atcgaatgtc tagcaagtga ggacatttcc
aattatntag cgtggtatca gcagaagcca ggaaaatctc ctcagctctt
gatctatcat acaagtaggt tgcaagatgg ggtcccatca cggttcagtg
gcagtggtgc tggcacacag ttttctctca agatcagtaa catgcaacct
gaagatgaag gggctctatta ctgtcaacag ggttacaggt ttccgctcac
gttcggttct gggaccaagc tgggaattgaa acgggctgat gctgcaccaa
ctgtatctat cttcccacca tccacggaac agttagcaac tggaggtgcc
tcagtcgtgt gcctcatgaa caacttctat cccagagaca tcagtgtaa
gtggaagatt gatggcactg aacgacgaga tgggtgcctg gacagtgta
ctgatcagga cagcaaagac agcacgtaca gcatgagcag caccctctcg
ttgaccaagg ctgactatga aagtcataac ctctatacct gtgaggttgt
tcataagaca tcatcctcac ccgtcgtcaa gagcttcaac aggaatgagt
gt

SEQ ID No: 15 Región VH de anticuerpo de rata

QVQLKESGPG LVQPSQTL~~SL~~ TCTVSGFSLT NYHVQWVRQP PGKGLEWMGV
MNSDGDTSFN SVLKSRLSIS RDTSKSQVFL KMSSLQTEDT ATYYCARDGT
IAAMDYFDYW GQGMVTVS

SEQ ID No: 16 Región VH de anticuerpo de rata

caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtgcagc cctcacagac
cctgtctctc acctgcactg tctctgggtt ctcattaacc aactatcatg
tgcagtggtt tcggcagcct ccagggaaaag gtctggagtg gatgggagta
atgtggagtg atggagacac atcatttaat tcagttctca aatctcgact
gagcatcagc agggacacct ccaagagcca agttttctta aaaatgagca
gtctgcaaac tgaagacaca gccacttact actgtgccag agatggaact
atagcagcta tggactactt tgattattgg ggccaaggag tcatggtcac
cgtctctg

SEQ ID No: 17 Región VH de anticuerpo de rata con secuencia señal subrayada

MAVLVLL~~LCL~~ MTFPSCVLSQ VQLKESGPG~~L~~ VQPSQTL~~SL~~ CTVSGFSL~~TN~~
YHVQWVRQP~~P~~ GKGLEWMGV~~M~~ WSDGDTSFN~~S~~ VLKSRLSIS~~R~~ DTSK~~SQVFLK~~
MSSLQTED~~TA~~ TY~~Y~~CARDGT~~I~~ AAMDYFDY~~W~~ GQGMVTVS

FIGURA: 4

SEQ ID No: 18 Región VH de anticuerpo de rata con secuencia señal subrayada

atggctgtcc tgggtgctggt gctctgcctg atgacatttc caagctgtgt
cctgtcccag gtgcagctga aggagtcagg acctggcctg gtgcagccct
cacagaccct gtctctcacc tgcactgtct ctgggttctc attaaccaac
tatcatgtgc agtgggttcg gcagcctcca ggaaaaggtc tggagtggat
gggagtaatg tggagtgatg gagacacatc atttaattca gttctcaaat
ctcgactgag catcagcagg gacacctcca agagccaagt tttcttaaaa
atgagcagtc tgcaaactga agacacagcc acttactact gtgccagaga
tggaaactata gcagctatgg actactttga ttattggggc caaggagtca
tggtcaccgt ctcg

SEQ ID No: 19 Cadena pesada de anticuerpo de rata (constante V +)

QVQLKESGPG LVQPSQTLISL TCTVSGFSLT NYHVQWVRQP PGKGLEWMGV
MWSGDTSFN SVLKSRLSIS RDTSKSQVFL KMSSLQTEDT ATYYCARDGT
IAAMDYFDYW GQGVMVTVSS AETTAPSVYP LAPGTALKSN SMVTLGCLVK
GYFPEPVTVT WNSGALSSGV HTFPAVLQSG LYTLTSSVTV PSSTWPSQTV
TCNVAHPASS TKVDKKIVPR NCGGDCKPCI CTGSEVSSVF IFPPKPKDVL
TITLTPKVTC VVVDISQDDP EVHFSWFVDD VEVHTAQTRP PEEQFNSTFR
SVSELPILHQ DWLNGRTFRC KVTSAAFPSP IEKTISKPEG RTQVPHVYTM
SPTKEEMTQN EVSITCMVKG FYPPDIYVEW QMNGQPQENY KNTPTMDTD
GSYFLYSKLN VKKEKWQQGN TFTCSVLHEG LHNHTEKSL SHSPGK

FIGURA 5

SEQ ID No: 20 Cadena pesada de anticuerpo de rata (constante V +)

```

caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtgcagc cctcacagac
cctgtctctc acctgcactg tctctgggtt ctcattaacc aactatcatg
tgcagtgggt tgggcagcct ccaggaaaag gtctggagtg gatgggagta
atgtggagtg atggagacac atcatttaat tcagttctca aatctcgact
gagcatcagc agggacacct ccaagagcca agttttctta aaaatgagca
gtctgcaaac tgaagacaca gccacttact actgtgccag agatggaact
atagcagcta tggactactt tgattattgg ggccaaggag tcatggtcac
cgtctcgtca gctgaaacaa cagccccatc tgtctatcca ctggctcctg
gaactgctct caaaagtaac tccatgggtga cctgggatg cctggcgaag
ggctatttcc ctgagccagt caccgtgacc tggaaactctg gagccctgtc
cagcgggtgtg cacaccttcc cagctgtcct gcagtctggg ctctacactc
tcaccagctc agtgactgta cctccagca cctggcccag ccagaccgtc
acctgcaacg tagcccaccc ggccagcagc accaaggtgg acaagaaaat
tgtgccaga aactgtggag gtgattgcaa gccttgata tgtacaggct
cagaagtatc atctgtcttc atcttcccc caaagcccaa agatgtgctc
accatcactc tgactcctaa ggtcacgtgt gttgtggtag acattagcca
ggacgatccc gaggtccatt tcagctgggt tgtagatgac gtggaagtcc
acacagctca gactcgacca ccagaggagc agttcaacag cactttccgc
tcagtcagtg aactccccat cctgcaccag gactggctca atggcaggac
gttcagatgc aaggtcacca gtgcagcttt cccatcccc atcgagaaaa
ccatctccaa acccgaaggc agaacacaag ttccgcatgt atacaccatg
tcacctacca aggaagagat gaccagaat gaagtcagta tcacctgcat
ggtaaaaggc ttctatcccc cagacattta tgtggagtgg cagatgaacg
ggcagccaca ggaaaactac aagaacactc cacctacgat ggacacagat
gggagttact tcctctacag caagctcaat gtgaagaagg aaaaatggca
gcagggaaac acgttcacgt gttctgtgct gcatgaaggc ctgcacaacc
accatactga gaagagtctc tcccactctc cgggtaaa
    
```

SEQ ID No: 21 Cadena pesada de anticuerpo de rata con secuencia señal subrayada

```

MAVLVLLLCL MTFPSCVLSQ VQLKESG PGL VQPSQTL SLT CTVSGFSLTN
YHVQWVRQPP GKGLEWVGVM WSDGDTSEFS VLKSRLSISR DTSK SQVFLK
MSSLQTEDTA TYYCARDGTI AAMDYFDYWG QGVMVTVSSA ETTAPSVYPL
APGTALKSNS MVTLGCLVKG YFPEPVTVTW NSGALSSGVH TFP AVLQSGL
YTLTSSVTVP SSTWPSQTVT CNVAHPASST KVDKKIVPRN CGGDCKPCIC
TGSEVSSVFI FPPKPKDVL TITLTPKVTCV VVDISQDDPE VHFSWFVDDV
EVHTAQTRPP EEQFNSTFRS VSELPILHQD WLNGR TFRCK VTSAAFPSPI
EKTISKPEGR TQVPHVYTMS PTKEEMTQNE VSITCMVKGF YPPDIYVEWQ
MNGQPQENYK NTPPTMDTDG SYFLYSKLNV KKEKWQQGNT FTCSVLHEGL
HNHHTEKSLS HSPGK
    
```

FIGURA: 6

SEQ ID No: 22 Cadena pesada de anticuerpo de rata con secuencia señal subrayada

atggctgtcc tgggtgctggt gctctgcctg atgacatttc caagctgtgt
cctgtcccag gtgcagctga aggagtcagg acctggcctg gtgcagccct
cacagaccct gtctctcacc tgcactgtct ctgggttctc attaaccaac
tatcatgtgc agtgggttcg gcagcctcca ggaaaaggtc tggagtggat
gggagtaatg tggagtgatg gagacacatc atttaattca gttctcaaat
ctcgaactgag catcagcagg gacacctcca agagccaagt tttcttaaaa
atgagcagtc tgcaaaactga agacacagcc acttactact gtgccagaga
tggaaactata gcagctatgg actactttga ttattggggc caaggagtca
tggtcaccgt ctcgctcagct gaaacaacag ccccatctgt ctatccactg
gctcctggaa ctgctctcaa aagtaactcc atggtgacce tgggatgcct
ggtcaagggc tatttcctctg agccagtcac cgtgacctgg aactctggag
cctgtccag cgggtgtgcac acctcccag ctgtcctgca gtctgggctc
tacactctca ccagctcagt gactgtacct tccagcacct ggcccagcca
gaccgtcacc tgcaacgtag cccaccggc cagcagcacc aagggtggaca
agaaaattgt gcccagaaac tgtggagggtg attgcaagcc ttgtatatgt
acaggetcag aagtatcacc tgtcttcacc tccccccaa agcccaaaga
tgtgtcacc atcactctga ctccaaagg cactgtgtgt gtggtagaca
ttagccagga cgatcccag gtccatttca gctggtttgt agatgacgtg
gaagtccaca cagctcagac tcgaccacca gaggagcagt tcaacagcac
ttccgctca gtcagtgaac tccccatcct gcaccaggac tggctcaatg
gcaggacgtt cagatgcaag gtcaccagtg cagctttccc atccccatc
gagaaaacca tctccaaacc cgaaggcaga acacaagttc cgcatgtata
caccatgtca cctaccaagg aagagatgac ccagaatgaa gtcagtatca
cctgcatggt aaaaggcttc tatccccag acatttatgt ggagtggcag
atgaacgggc agccacagga aaactacaag aacactccac ctacgatgga
cacagatggg agttacttcc tctacagcaa gctcaatgtg aagaaggaaa
aatggcagca gggaaacacg ttcacgtgtt ctgtgctgca tgaaggcctg
cacaaccacc atactgagaa gactctctcc cactctccgg gtaaa

FIGURA:7

SEQ ID No: 23 Ab652 VL

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCLASEDIS NYLAWYQQKP GKAPKLLIYH
 TSRLQDGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ GYRFPLTFGG
 GTKVEIK

SEQ ID No: 24 Ab652 VL

gatatccaga tgaccagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga
 tcgtgtgact attacctgtc tggctagcga ggacatctcc aactacctgg
 cgtggtatca gcagaaaccg ggtaaagcgc cgaaactgct gatctatcac
 acttcccgtc tgcaggacgg tgttccgtct cgtttctctg gttccggttc
 tggtaggcga ttcaccctga ccatctcttc tctgcagcca gaagacttcg
 cgacttacta ctgccagcag ggttaccggt ttccgctgac ctccggtggt
 ggtaccaaag ttgaaatcaa a

SEQ ID No: 25 Ab652 VL con secuencia señal subrayada

MSVPTQVLGL LLLWLTDARC DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCLASEDIS
 NYLAWYQQKP GKAPKLLIYH TSRLQDGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP
 EDFATYYCQQ GYRFPLTFGG GTKVEIK

SEQ ID No: 26 Ab652 VL con secuencia señal subrayada

atgtctgtcc ccacccaagt cctcggactc ctgctactct ggcttacaga
tgccagatgc gatatccaga tgaccagag tccaagcagt ctctccgcca
 gcgtaggcga tcgtgtgact attacctgtc tggctagcga ggacatctcc
 aactacctgg cgtggtatca gcagaaaccg ggtaaagcgc cgaaactgct
 gatctatcac acttcccgtc tgcaggacgg tgttccgtct cgtttctctg
 gttccggttc tggtaggcga ttcaccctga ccatctcttc tctgcagcca
 gaagacttcg cgacttacta ctgccagcag ggttaccggt ttccgctgac
 ctccggtggt ggtaccaaag ttgaaatcaa a

SEQ ID No: 27 Cadena liviana de Ab652 (constante V +)

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCLASEDIS NYLAWYQQKP GKAPKLLIYH
 TSRLQDGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ GYRFPLTFGG
 GTKVEIKRTV AAPSVFIFFP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
 LSSPVTKSFN RGEC

FIGURA 8

SEQ ID No: 28 Cadena liviana de Ab652 (constante V +)

gatatccaga tgacccagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga
tcgtgtgact attacctgtc tggctagcga ggacatctcc aactacctgg
cgtggtatca gcagaaaccg ggtaaagcgc cgaaactgct gatctatcac
acttcccgtc tgcaggacgg tgttccgtct cgtttctctg gttccgggtc
tggtagcgac ttcaccctga ccatctcttc tctgcagcca gaagacttcg
cgacttacta ctgccagcag ggttaccggt ttccgctgac cttcgggtgt
ggtaccaaag ttgaaatcaa acgtacggta ggggccccat ctgtcttcat
cttcccgcga tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt
gcctgctgaa taacttctat cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg
gataacgccc tccaatcggg taactcccag gagagtgtca cagagcagga
cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg ctgagcaaag
cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt

SEQ ID No: 29 Cadena liviana de Ab652 con secuencia señal subrayada

MSVPTQVLGL LLLWLTDARC DIQMTQSPSS LSASVGDVRT ITCLASEDIS
NYLAWYQQKP GKAPKLLIYH TSRLQDGVPS RFGSGSGGTD FTLTISSLQP
EDFATYYCQQ GYRFP¹LTFFG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA
SVVCLLN²NFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEN

SEQ ID No: 30 Cadena liviana de Ab652 con secuencia señal subrayada

atgtctgtcc ccacccaagt cctcggactc ctgctactct ggcttacaga
tgccagatgc gatatccaga tgacccagag tccaagcagt ctctccgcca
gcgtaggcga tcgtgtgact attacctgtc tggctagcga ggacatctcc
aactacctgg cgtggtatca gcagaaaccg ggtaaagcgc cgaaactgct
gatctatcac acttcccgtc tgcaggacgg tgttccgtct cgtttctctg
gttccgggtc tggtagcgac ttcaccctga ccatctcttc tctgcagcca
gaagacttcg cgacttacta ctgccagcag ggttaccggt ttccgctgac
cttccgggtgt ggtaccaaag ttgaaatcaa acgtacggta ggggccccat
ctgtcttcat cttcccgcga tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc
tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat cccagagagg ccaaagtaca
gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag gagagtgtca
cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac
ccatcagggc ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt
gt

FIGURA: 9

SEQ ID No: 31 **Ab652 VH**

QVTLKESGPV LVKPTETLTL TCTVSGFSLT NYHVQWIRQP PGKALEWLGV
 MWSGDGTSFN SVLKSRLTIS RDTSKSQVVL TMTNMDPVDV ATYYCARDGT
 IAAMDYFDYW GQGLVTVS

SEQ ID No: 32 **Ab652 VH**

caggtgaccc tgaagaatc tggccgggt ctggtgaaac caacggaaac
 cctgactctg acgtgcaccg tttctgggtt ctctctgacc aactaccacg
 ttcagtgat tcgtcagccg cgggtaaag cgctggaatg gctgggtgtt
 atgtggagcg acggtgacac cagcttcaac tctgtgctga aatctcgctt
 gaccatctcc cgtgatactt ccaaaccga ggttgtgctg accatgacga
 acatggaccc gtagatact gcaacctact actgtgcacg tgatggcact
 atcgcggcta tggattactt cgactattgg ggtcagggtta ccctggttac
 cgtctcg

SEQ ID No: 33 **Ab652 VH con secuencia señal subrayada**

MEWSWVFLFF LSVTTGVHSQ VTLKESGPVL VKPTETLTLT CTVSGFSLTN
 YHVQWIRQPP GKALEWLGV MWSGDGTSFNS VLKSRLTISR DTSKQVVL
 MTNMDPVDV TYYCARDGTI AAMDYFDYWG QGLVTVS

SEQ ID No: 34 **Ab652 VH con secuencia señal subrayada**

atggaatgga gctgggtctt tctctctctc ctgtcagtaa ctacaggagt
ccattctcag gtagaccctga aagaatctgg tccggttctg gtgaaaccaa
 cggaaaccct gactctgacg tgcaccgttt ctggtttctc tctgaccaac
 taccacgttc agtggattcg tcagccgccc ggtaaagcgc tggaaatggct
 ggggtgttatg tggagcgcagc gtgacaccag cttcaactct gtgctgaaat
 ctgcctgac catctcccgt gatactcca aatcccagggt tgtgctgacc
 atgacgaaca tggaccgggt agatactgca acctactact gtgcacgtga
 tggcactatc gcggctatgg attacttcca ctattgggggt cagggtaccc
 tggttaccgt ctcg

SEQ ID No: 35 **Cadena pesada de Ab652 Fab (constante V +)**

QVTLKESGPV LVKPTETLTL TCTVSGFSLT NYHVQWIRQP PGKALEWLGV
 MWSGDGTSFN SVLKSRLTIS RDTSKSQVVL TMTNMDPVDV ATYYCARDGT
 IAAMDYFDYW GQGLVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK
 DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTPPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT
 YICNVNHHKPS NTKVDKKVEP KSC

FIGURA 10

SEQ ID No: 36 Cadena pesada de Ab652 Fab (constante V +)

caggtgaccc tgaagaatc tgggtccggtt ctggtgaaac caacggaaac
 cctgactctg acgtgcaccg tttctgggtt ctctctgacc aactaccacg
 ttcagtggat tcgtcagccg ccgggtaaag cgctggaatg gctgggtgtt
 atgtggagcg acggtgacac cagcttcaac totgtgctga aatctcgctt
 gaccatctcc cgtgatactt ccaaatacca ggttgtgctg accatgacga
 acatggaccc ggtagatact gcaacctact actgtgcacg tgatggcact
 atcgcggcta tggattactt cgactattgg ggtcagggtta ccttggttac
 cgtctcgagc gcttctacaa agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct
 cctccaagag cacctctggg ggcacagcgg cctgggctg cctggtcaag
 gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg tggaaactcag gcgccctgac
 cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca ggactctact
 cctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa
 agttgagccc aatcttgt

SEQ ID No: 37 Cadena pesada de Ab652 Fab con secuencia señal subrayada

MEWSWVFLFF LSVTTGVHSQ VTLKESGPVL VKPTETLTLT CTVSGFSLTN
 YHVQWIRQPP GKALEWLGVM WSDGDTSFNS VLKSRLTISR DTSKSKQVLT
 MTNMDPVDIA TYYCARDGTI AAMDYFDYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL
 APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPVAVLQSSG
 LYSLSVVTV PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SC

SEQ ID No: 38 Cadena pesada de Ab652 Fab con secuencia señal subrayada

atggaatgga gctgggtctt tctcttcttc ctgtcagtaa ctacaggagt
ccattctcag gtgaccctga aagaatctgg tccggttctg gtgaaaccaa
 cggaaacctt gactctgacg tgcaccgttt ctggtttctc tctgaccaac
 taccacgttc agtggattcg tcagccgccg ggtaaagcgc tggaaatggct
 ggggtgttatg tggagcgcag gtgacaccag cttcaactct gtgctgaaat
 ctgcctgac catctcccgt gatacttcca aatcccaggt tgtgctgacc
 atgacgaaca tggacctcgt agatactgca acctactact gtgcacgtga
 tggcaactatc gcggctatgg attacttcca ctattgggggt cagggtaacc
 tggttaccgt ctcgagcgtc tctacaaagg gcccatcgggt cttccccctg
 gcacctcct ccaagagcac ctctgggggc acagcggccc tgggctgctt
 ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg aactcaggcg
 ccttgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtccctcagga
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca gcttgggcac
 ccagacctac atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaaggtgg
 acaagaaagt tgagcccaaa tcttgt

FIGURA: 11

SEQ IN No: 39 Armazón aceptor de **VK1 2-1-(1) 02 JK4** humano
 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSI SYLNWYQQKP GKAPKLLIYA
 ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ SYSTPLTFGG
 GTKVEIK

SEQ ID No: 40 Armazón aceptor de **VK1 2-1-(1) 02 JK4** humano
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga
 cagagtcacc atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa
 attggtatca gcagaaacca gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct
 gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca aggttcagtg gcagtggatc
 tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct gaagattttg
 caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctctcac tttcggcgga
 gggaccaagg tggagatcaa ac

SEQ ID No: 41 Armazón aceptor de **VH2 3-1 2-26 JH4** humano
 QVTLKESGPV LVKPTETLTL TCTVSGFSL S NARMGVSWIR QPPGKALEWL
 AHIFSNDEKS YSTSLKSRLLT ISKDTSKSQV VLTMTNMDPV DTATYYCARI
 YFDYWGQGTL VTVS

SEQ ID No: 42 Armazón aceptor de **VH2 3-1 2-26 JH4** humano
 caggtcacct tgaaggagtc tggctctgtg ctggtgaaac ccacagagac
 cctcacgctg acctgcaccg tctctggggt ctcactcagc aatgctagaa
 tgggtgtgag ctggatccgt cagccccag ggaaggccct ggagtggctt
 gcacacattt tttcgaatga cgaaaaatcc tacagcacat ctctgaagag
 caggtcacc atctccaagg acacctcaa aagccaggtg gtccttacca
 tgaccaacat ggacctgtg gacacagcca catattactg tgcacggata
 tactttgact actggggcca aggaacctg gtcaccgtct cc

Figura 13

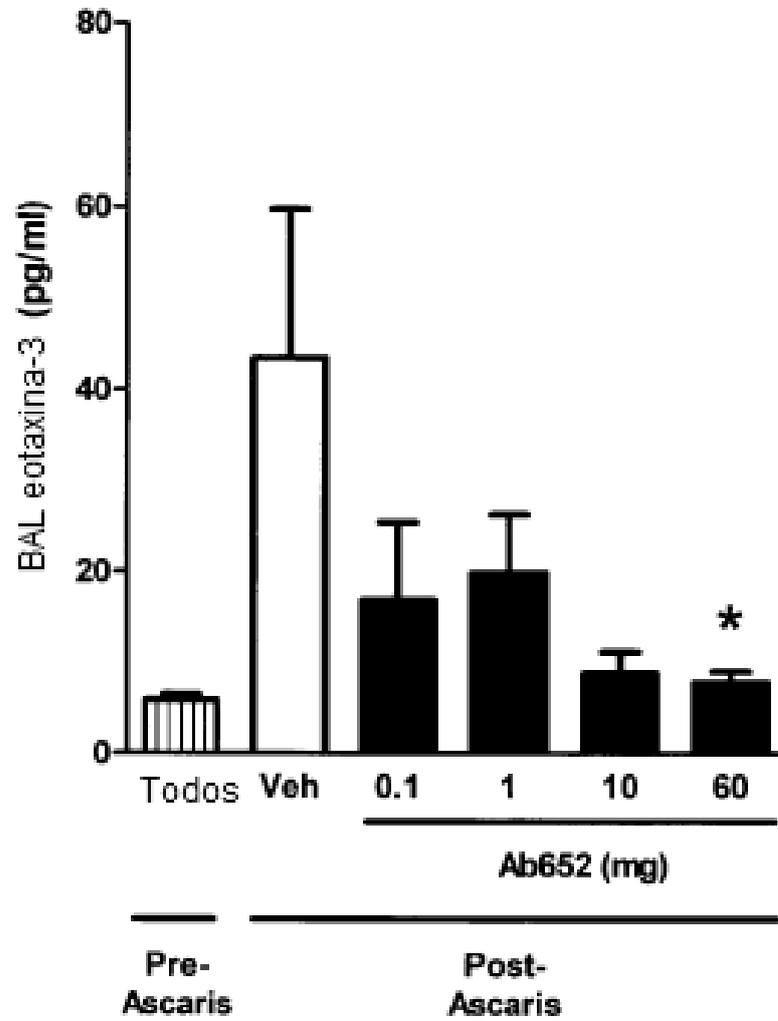


FIGURA 14

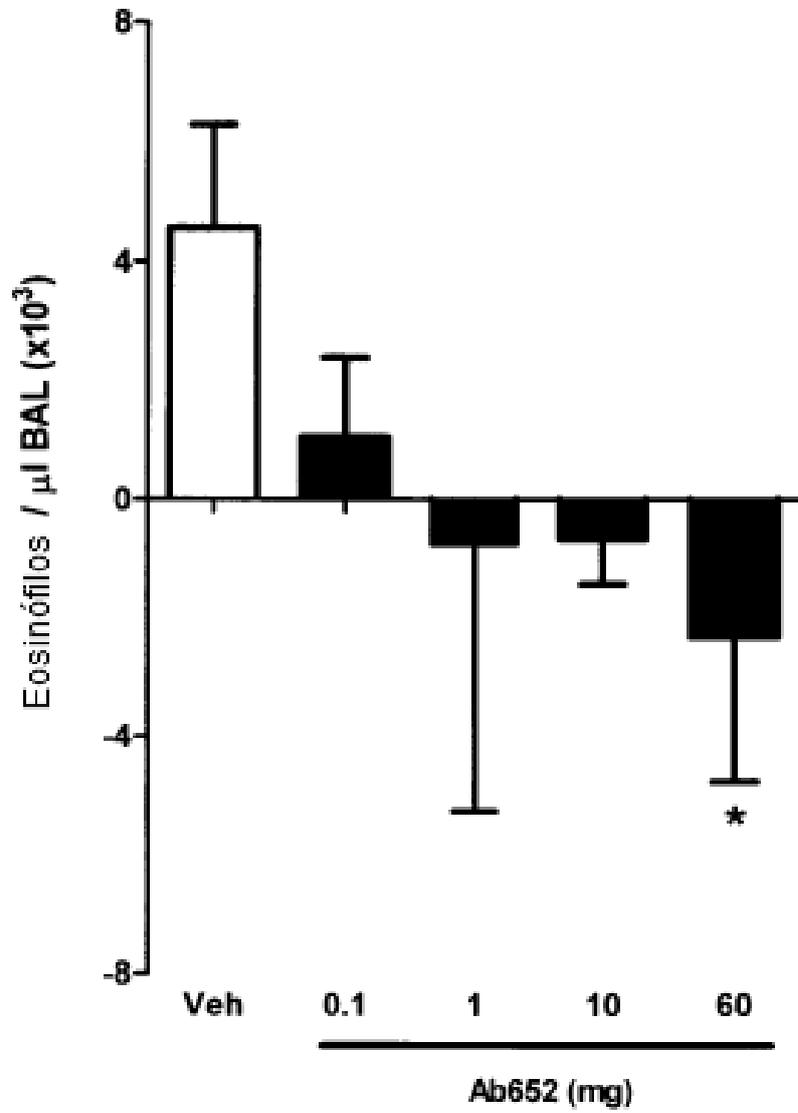


FIGURA: 15

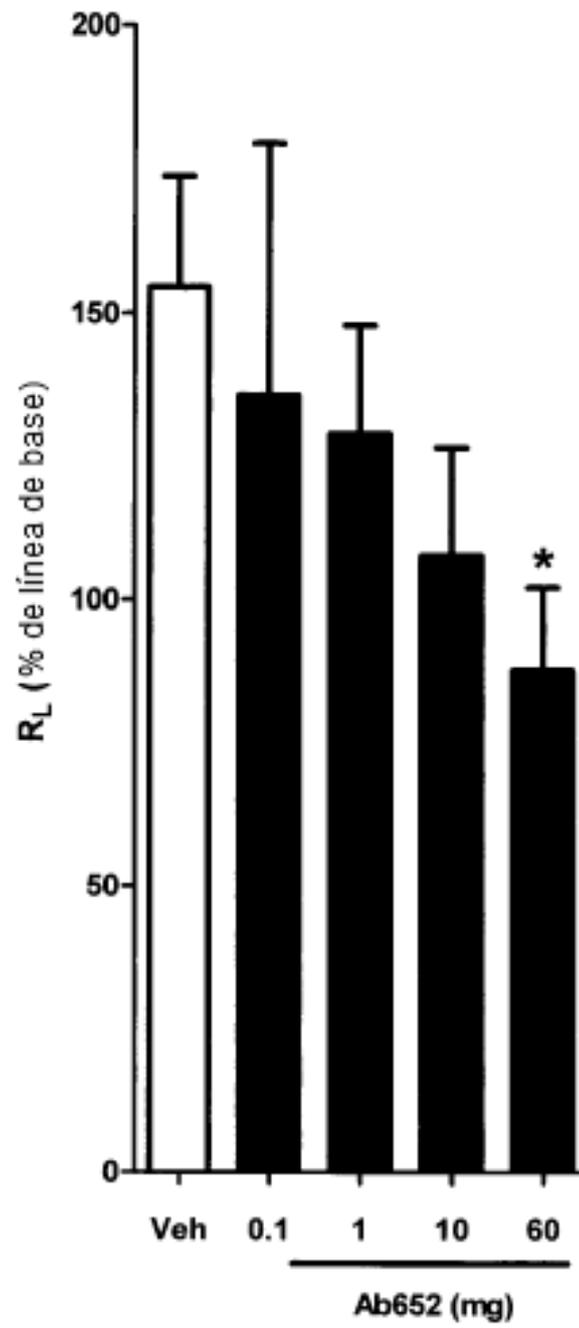


FIGURA: 16

