

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 487**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/00** (2006.01)

**C07K 16/24** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2006 E 12173018 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2532679**

54 Título: **Anticuerpos humanos contra IL13 y usos terapéuticos**

30 Prioridad:

**21.10.2005 GB 0521509**

**22.08.2006 GB 0616666**

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

**16.11.2017**

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)**

**Lichtstrasse 35**

**4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**CAMPBELL, EMMA MICHELLE;**

**PARVEEN, SOFIA;**

**VALKIRS, GUNARS y**

**BUECHLER, JOE**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 642 487 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos humanos contra IL13 y usos terapéuticos

Campo de uso

5 La presente invención se refiere a miembros de unión específicos, en particular moléculas de anticuerpo anti-IL-13 humana y especialmente a aquellos que neutralizan la actividad de IL-13. También se refiere a métodos para usar moléculas de anticuerpo anti-IL-13 en el diagnóstico o tratamiento de trastornos relacionados con IL-13, tales como asma, dermatitis atópica, rinitis alérgica, fibrosis, enfermedad inflamatoria intestinal y linfoma de Hodgkin.

Antecedentes de la invención

10 La interleuquina (IL) -13 es una citoquina de 114 aminoácidos con una masa molecular no modificada de aproximadamente 12 kDa [McKenzie, A. N. et al. *J Immunol*, 1993, 150 (12): pág. 5436-44, y Minty, A., et al. *Nature*, 1993.362 (6417): pág. 248-50]. La IL-13 está más estrechamente relacionada con la IL-4 con la que comparte una similitud de secuencia del 30% a nivel de aminoácidos. El gen de IL-13 humano se encuentra en el cromosoma 5q31 adyacente al gen de IL-4. Esta región del cromosoma 5q contiene secuencias génicas para otras citoquinas derivadas de linfocitos Th2 incluyendo GM-CSF e IL-5, cuyos niveles junto con IL-4 se ha demostrado que se correlacionan con la severidad de la enfermedad en asmáticos y modelos de roedores de inflamación alérgica [Nakamura, Y., et al. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1996. 15 (5): pág. 680-7, Robinson, D. S., et al. *N Engl J Med*, 1992.326 (5): pág. 298-304, Walker, C., et al. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994. 150 (4): p. 1038-48, Humbert, M., et al. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996, 154 (5): p. 1497-504, Corrigan, C.J. y A.B. Kay *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1991. 94 (1-4): pág. 270-1, Bentley, A. M., et al. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1993].

20 Aunque inicialmente se identifica como una citoquina derivada de linfocitos CD4+ Th2, IL-13 también es producida por células T CD4+ Th1, linfocitos T CD8+, células NK y poblaciones de células no T, tales como mastocitos, basófilos, eosinófilos, macrófagos, monocitos y células de músculo liso de las vías respiratorias.

25 Se reporta que la IL-13 media sus efectos a través de un sistema receptor que incluye la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-4 (IL-4R $\alpha$ ), que por sí misma puede unirse a IL-4 pero no a IL-13, y al menos otras dos proteínas de la superficie celular, IL-13R $\alpha_1$  y IL-13R $\alpha_2$  [Murata, T., et al. *Int J Hematol*, 1999.69 (1): pág. 13-20, Andrews, A.L., et al. *J Biol Chem*, 2002.277 (48): pág. 46073-8]. IL-13R $\alpha_1$  puede unirse a IL-13 con baja afinidad, reclutando posteriormente IL-4R $\alpha$  para formar un receptor funcional de alta afinidad que señala [Miloux, B., et al. *FEBS Lett*, 1997.401 (2-3): pág. 163-6, Hilton, D. J., et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996. 93 (1): pág. 497-501]. La base de datos del GenBank enlista la secuencia de aminoácidos y la secuencia de ácido nucleico de IL-13R $\alpha_1$  como NP 001551 y Y10659, respectivamente. Los estudios en ratones con deficiencia de STAT6 (transductor de señal y activador de la transcripción 6) han revelado que IL-13, de una manera similar a la IL-4, señala mediante la utilización de la ruta JAK-STAT6 [Kuperman, D., et al. *J Exp Med*, 1998. 187 (6): pág. 939-48, Nelms, K., et al. *Annu Rev Immunol*, 1999.17: pág. 701-38]. IL-13R $\alpha_2$  comparte un 37% de identidad de secuencia con IL-13R $\alpha_1$  a nivel de aminoácidos y se une a IL-13 con alta afinidad [Zhang, J.G., et al. *J Biol Chem*, 1997.272 (14): pág. 9474-80, Caput, D., et al. *J Biol Chem*, 1996.271 (28): pág. 16921-6]. Sin embargo, IL-13R $\alpha_2$  tiene una cola citoplasmática más corta que carece de motivos de señalización conocidos. Las células que expresan IL-13R $\alpha_2$  no responden a IL-13 incluso en presencia de IL-4R $\alpha$  [Kawakami, K., et al. *Blood*, 2001.97 (9): pág. 2673-9]. Por lo tanto, se postula que IL-13R $\alpha_2$  actúa como un receptor señuelo que regula la función de IL-13 pero no la de IL-4. Esto está respaldado por estudios en ratones deficientes en IL-13R $\alpha_2$  cuyo fenotipo era consistente con una mayor respuesta a IL-13 [Wood, N., et al. *J Exp Med*, 2003.197 (6): pág. 703-709, Chiaramonte, M.G., et al. *J Exp Med*, 2003.197 (6): pág. 687-701]. La base de datos del GenBank enlista la secuencia de aminoácidos y la secuencia de ácido nucleico de IL-13R $\alpha_2$  como NP000631 y Y08768, respectivamente.

Sumario de la invención

45 Una realización de la invención en la presente invención proporciona un anticuerpo IL13 humano aislado que comprende una región de unión al antígeno en la que las regiones H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 y L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 representadas en la secuencia de aminoácidos en conjunto son: SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21.

50 En una realización adicional de la invención, se proporciona un anticuerpo de IL13 humano aislado que comprende una región variable de HC de acuerdo con la SEQ ID NO: 31 y una región variable de LC de acuerdo con la SEQ ID NO: 33.

En una realización adicional, se proporciona un anticuerpo IL13 humano aislado, en el que la secuencia de aminoácidos de HC es la SEQ ID NO: 41 y la secuencia de aminoácidos de LC es la SEQ ID NO: 39.

En una realización relacionada, el anticuerpo aislado es una IgG. En otra realización relacionada, el anticuerpo aislado es una IgG1 o una IgG4.

En otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que tiene al menos uno cualquiera de los anticuerpos anteriores o fragmentos funcionales o variantes conservadoras, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable para ello.

5 En ciertas realizaciones, la invención proporciona el uso de los anticuerpos para tratar el asma bronquial, que es una enfermedad inflamatoria persistente común del pulmón caracterizada por hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR), sobreproducción de moco, fibrosis y niveles elevados de IgE en suero. Li et al., Resumen para poster presentado en la American Thoracic Society Annual Meeting, 2003, Seattle, reportaron efectos de un anticuerpo neutralizante anti-IL-13 de ratón en un modelo de ratón de asma crónica.

El tratamiento de acuerdo con la presente invención puede ser sintomático o profiláctico.

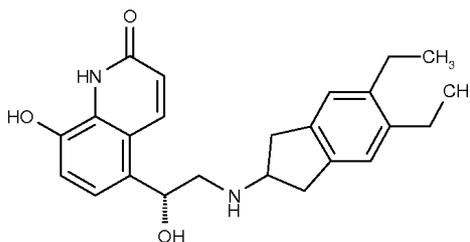
10 La eficacia de un agente de la invención en la inhibición de condiciones inflamatorias, por ejemplo, en enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias, puede demostrarse en un modelo animal, por ejemplo, modelo de ratón, rata o conejo, de inflamación de las vías respiratorias u otras condiciones inflamatorias, por ejemplo, como lo describen Wada et al., J. Exp. Med (1994) 180: 1135-40; Sekido et al., Nature (1993) 365: 654-57; Modeloska et al., Am. J. Respir. Crit. Cuidado. Med (1999) 160: 1450-56; y Laffon et al. (1999) Am. J. Respir. Crit. Care Med. 160: 1443-49.

15 Los anticuerpos de la invención pueden combinarse con un agente terapéutico adicional.

El agente terapéutico adicional puede seleccionarse del grupo que consiste en sustancias farmacológicas antiinflamatorias, broncodilatadoras, antihistamínicas o antitusivas, particularmente en el tratamiento de enfermedades de las vías respiratorias obstructivas o inflamatorias tales como las mencionadas anteriormente en este documento, por ejemplo como potenciadores de la actividad terapéutica de tales fármacos o como un medio para reducir la dosificación requerida o efectos secundarios potenciales de tales fármacos. Un agente terapéutico de la invención puede mezclarse con la otra sustancia farmacológica en una composición farmacéutica fija o puede administrarse por separado, antes, simultáneamente con o después de la otra sustancia farmacológica. Por consiguiente, una combinación de un agente de la invención como se ha descrito anteriormente con una sustancia farmacológica antiinflamatoria, broncodilatadora, antihistamínica o antitusiva, estando dicho agente de la invención y dicha sustancia fármaco en la misma o diferente composición farmacéutica.

Los fármacos antiinflamatorios adecuados incluyen esteroides, en particular glucocorticosteroides tales como budesonida, dipropionato de beclometasona, propionato de fluticasona, ciclesonida o furoato de mometasona, o esteroides descritos en los documentos WO 02/88167, WO 02/12266, WO 02/100879, WO 02/00679 (especialmente los de los Ejemplos 3, 11, 14, 17, 19, 26, 34, 37, 39, 51, 60, 67, 72, 73, 90, 99 y 101), WO 03/35668, WO 03/48181, WO 03/62259, WO 03/64445, WO 03/72592, WO 04/39827 y WO 04/66920; agonistas del receptor de glucocorticoides no esteroideos, tales como los descritos en los documentos DE 10261874, WO 00/00531, WO 02/10143, WO 03/82280, WO 03/82787, WO 03/86294, WO 03/104195, WO 03/101932, WO 04/05229, WO 04/18429, WO 04/19935 y WO 04/26248; antagonistas de LTB<sub>4</sub> tales como BIIL 284, CP-195543, DPC11870, LTB<sub>4</sub> etanolamida, LY 293111, LY 255283, CGS025019C, CP-195543, ONO-4057, SB 209247, SC-53228 y los descritos en la patente estadounidense No. 5.451.700; los antagonistas de LTD<sub>4</sub> tales como montelukast, pranlukast, zafirlukast, acolato, SR2640, Wy-48.252, ICI 198615, MK-571, LY-171883, Ro 24-5913 y L-648051; inhibidores de PDE4 tales como cilomilast (Ariflo® GlaxoSmithKline), Roflumilast (Byk Gulden), V-11294A (Napp), BAY19-8004 (Bayer), SCH-351591 (Schering-Plough), Arofilina (Almirall Prodesfarma), PD189659/PD168787 (Parke-Davis), AWD-12-281 (Asta Medica), CDC-801 (Celgene), SelCID<sup>MR</sup> CC-10004 (Celgene), VM554/UM565 (Vernalis), T-440 (Tanabe), KW-4490 Kyowa Hakko Kogyo), y los descritos en los documentos WO 92/19594, WO 93/19749, WO 93/19750, WO 93/19751, WO 98/18796, WO 99/16766, WO 01/13953, WO 03/104204, WO 03/104205, WO 03/39544, WO 04/000814, WO 04/000839, WO 04/005258, WO 04/018450, WO 04/018451, WO 04/018457, WO 04/018465, WO 04/018431, WO 04/018449, WO 04/018450, WO 04/018451, WO 04/018465, WO 04/019944, WO 04/019945, WO 04/045607 y WO 04/037805; agonistas de A<sub>2A</sub> tales como los descritos en los documentos EP 1052264, EP 1241176, EP 409595A2, WO 94/17090, WO 96/02543, WO 96/02553, WO 98/28319, WO 99/24449, WO 99/24450, WO 99/24451, WO 99/38877, WO 99/41267, WO 99/67263, WO 99/67264, WO 99/67265, WO 99/67266, WO 00/23457, WO 00/77018, WO 00/78774, WO 01/23399, WO 01/27130, WO 01/27131, WO 01/60835, WO 01/94368, WO 02/00676, WO 02/22630, WO 02/96462 y WO 03/086408; y antagonistas de A<sub>2B</sub> tales como los descritos en el documento WO 02/42298.

50 Los fármacos broncodilatadores adecuados incluyen agentes anticolinérgicos o antimuscarínicos, en particular bromuro de ipratropio, bromuro de oxitropio, sales de tiotropio y CHF 4226 (Chiesi) y glicopirrolato, pero también los descritos en los documentos EP 424021, US 3714357, US 5171744, WO 01/04118, WO 02/00652, WO 02/51841, WO 02/53564, WO 03/00840, WO 03/33495, WO 03/53966, WO 03/87094, WO 04/018422 y WO 04/05285; y agonistas beta-2 adrenoceptores tales como albuterol (salbutamol), metaproterenol, terbutalina, salmeterol fenoterol, procaterol, y especialmente, formoterol, carmoterol y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y compuestos (en forma libre o de sal o solvato) de fórmula I de WO 00/75114, cuyo documento se incorpora aquí como referencia, preferiblemente compuestos de los Ejemplos de los mismos, especialmente un compuesto de fórmula



es decir, (5-[(R)-2-(5,6-dietil-indan-2-ilamino)-1-hidroxi-etil]-8-hidroxi-1H-quinolin-2-ona) y sus sales farmacéuticamente aceptables, así como compuestos (en forma libre o en forma de sal o de solvato) de fórmula I del documento WO 04/16601, y también compuestos de los documentos EP 1440966, JP 05025045, WO 93/18007, WO 99/64035, US 2002/0055651, WO 01/42193, WO 01/83462, WO 02/66422, WO 02/70490, WO 02/76933, WO 03/24439, WO 03/42160, WO 03/42164, WO 03/72539, WO 03/91204, WO 03/99764, WO 04/22547, WO 04/32921, WO 04/33412, WO 04/37768, WO 04/37773, WO 04/37807, WO 04/39762, WO 04/39766, WO 04/45618, WO 04/46083, WO 04/80964, EP1460064, WO 04/087142, WO 04/089892, EP 01477167, US 2004/0242622, US 2004/0229904, WO 04/108675, WO 04/108676, WO 05/033121, WO 05/040103 y WO 05/044787.

5 Los fármacos anti-inflamatorios y broncodilatadores dobles adecuados incluyen agonistas beta-2 adrenoceptores /antagonistas muscarínicos tales como los descritos en los documentos US 2004/0167167, WO 04/74246 y WO 04/74812.

10 Las sustancias farmacológicas antihistamínicas adecuadas incluyen clorhidrato de cetirizina, acetaminofén, fumarato de clemastina, prometazina, loratidina, desloratidina, difenhidramina y clorhidrato de fexofenadina, activastina, astemizol, azelastina, ebastina, epinastina, mizolastina y tefenadina, así como las descritas en los documentos JP 2004107299, WO 03/099807 y WO 04/026841.

15 También pueden usarse combinaciones de agentes terapéuticos de la invención y agentes anticolinérgicos o antimuscarínicos, esteroides, agonistas beta-2, inhibidores de PDE4, agonistas de receptores de dopamina, antagonistas de LTD4 o antagonistas de LTB4. Otras combinaciones útiles de agentes de la invención con fármacos antiinflamatorios son aquellas con otros antagonistas de receptores de quimioquinas, por ejemplo, CCR-1, CCR-3, CCR-4, CCR-5, CCR-6, CCR-7, CCR-8, CCR-9 y CCR10, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, en particular antagonistas de CCR-5 tales como tales como los antagonistas SC-351125, SCH-55700 y SCH-D de Schering-Plough, antagonistas de Takeda tales como cloruro de N-[[4-[[[6,7-dihidro-2-(4-metilfenil)-5H-benzociclohepten-8-il]carbonil] amino]fenil]-metil]-tetrahidro-N,N-dimetil-2H-piran-4-amonio (TAK-770), antagonistas de CCR-5 descritos en la patente estadounidense No. US 6.166.037 (particularmente las reivindicaciones 18 y 19), los documentos WO 0066558 (en particular la reivindicación 8), WO 0066559 (en particular la reivindicación 9), WO 04/018425 y WO 04/026873.

20 El agente terapéutico adicional también puede seleccionarse del grupo que consiste en otras moléculas de unión a citoquinas, particularmente anticuerpos de otras citoquinas, en particular una combinación con un anticuerpo anti-IL4, tal como se describe en PCT/EP2005/00836, un anticuerpo anti-IgE, tal como Xolair®, un anticuerpo anti-IL31, un anticuerpo anti-IL31R, un anticuerpo anti-TSLP, un anticuerpo anti-receptor de TSLP, un anticuerpo antiendoglina, un anticuerpo anti-IL1b u otro anticuerpo anti-IL13, tal como se describe en el documento WO05/007699.

#### Descripción detallada de la invención

35 La presente invención se refiere a anticuerpos aislados, particularmente anticuerpos humanos, que se unen específicamente a IL-13 y que inhiben las propiedades funcionales de IL-13. En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención se derivan de secuencias de cadena pesada y ligera particulares y/o comprenden características estructurales particulares tales como regiones CDR que comprenden secuencias de aminoácidos particulares. La invención proporciona anticuerpos aislados y composiciones farmacéuticas que contienen los anticuerpos. La invención también se refiere al uso de los anticuerpos en el tratamiento del asma.

40 Con el fin de que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, se definen en primer lugar ciertos términos. Definiciones adicionales se exponen a lo largo de la descripción detallada.

45 El término 'interleuquina 13' o 'IL-13', excepto cuando el contexto dicta lo contrario, se refiere a IL-13 humana. La presente invención proporciona anticuerpos contra IL-13 humana, especialmente anticuerpos humanos, que son reactivos en forma cruzada con IL-13 de primate no humano, incluyendo IL-13 de mono cynomolgus y de mono Rhesus. Los anticuerpos de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención reconocen una variante de IL-13 en la que el residuo de arginina en la posición del aminoácido 130 se reemplaza por glutamina. En otros aspectos y realizaciones, la presente invención proporciona miembros de unión específicos contra IL-13 murina, específicamente IL-13 de ratón.

El término "respuesta inmune" se refiere a la acción, por ejemplo, de linfocitos, células presentadoras de antígeno, células fagocíticas, granulocitos y macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o el hígado (incluyendo anticuerpos, citoquinas y complemento) que resulta en daño selectivo, destrucción o eliminación del cuerpo humano de patógenos invasores, células o tejidos infectados con patógenos, células cancerosas o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

Una "ruta de transducción de señales" se refiere a la relación bioquímica entre una variedad de moléculas de transducción de señales que juegan un papel en la transmisión de una señal desde una porción de una célula a otra porción de una célula. Tal como se utiliza en la presente memoria, la frase "receptor de superficie celular" incluye, por ejemplo, moléculas y complejos de moléculas capaces de recibir una señal y capaces de transmitir dicha señal a través de la membrana plasmática de una célula. Un ejemplo de un "receptor de superficie celular" de la presente invención es el receptor de IL-13 al que se une la molécula de proteína de IL-13.

El término "anticuerpo" al que se hace referencia en la presente memoria incluye anticuerpos enteros y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "porción de unión a antígeno") o cadenas simples de los mismos. Un "anticuerpo" natural es una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como  $V_H$ ) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en este documento como  $V_L$ ) y una región constante de cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones  $V_H$  y  $V_L$  pueden subdividirse en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada  $V_H$  and  $V_L$  está, compuesta de tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el extremo terminal amino hasta el extremo terminal carboxilo en el orden siguiente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores huésped, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico de complemento.

El término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de antígeno"), tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, IL -13). Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios  $V_L$ ,  $V_H$ , CL y CH1; un fragmento F(ab)<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd que consiste en los dominios  $V_H$  y CH1; un fragmento Fv que consiste en los dominios  $V_L$  y  $V_H$  de un solo brazo de un anticuerpo; un fragmento dAb (Ward et al., 1989 Nature 341: 544-546), que consiste en un dominio  $V_H$ ; y una región aislada determinante de complementariedad (CDR).

Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv,  $V_L$  y  $V_H$ , están codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite elaborarlos como una única cadena proteica en la que el par de regiones  $V_L$  y  $V_H$  forman moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al., 1988 Science 242: 423-426 y Huston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci: 5879-5883). Tales anticuerpos de cadena sencilla también están destinados a estar comprendidos dentro del término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se seleccionan por su utilidad de la misma forma que los anticuerpos intactos.

Un "anticuerpo aislado", como se usa en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a IL-13 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos diferentes a IL-13). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a IL-13 puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de IL-13 de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o compuestos químicos.

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una única especificidad de unión y afinidad por un epítipo particular.

El término "anticuerpo humano", tal como se utiliza en la presente memoria, se pretende que incluya anticuerpos que tengan regiones variables en las que tanto las regiones marco como CDR se derivan de secuencias de origen humano. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de dichas secuencias humanas, por ejemplo, secuencias de líneas germinales humanas o versiones mutadas de secuencias de líneas germinales humanas. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias humanas (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio in vitro o por mutación somática in vivo). Sin embargo, el término "anticuerpo humano", tal como se utiliza en

la presente memoria, no pretende incluir anticuerpos en los que se han injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, sobre secuencias marco humanas.

5 El término "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que muestran una única especificidad de unión que tienen regiones variables en las que tanto las regiones marco como CDR se derivan de secuencias humanas. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos son producidos por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera fusionado a una célula inmortalizada.

10 El término "anticuerpo humano recombinante", tal como se utiliza aquí, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para los genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir de ellos, anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, de un transfectoma, anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatoria recombinante, y anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el empalme de todo o una porción de un gen de inmunoglobulina humana, secuencias con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones marco y CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis in vitro (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática in vivo) y por tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de y relacionadas con las secuencias de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de la línea germinal humana, no pueden existir naturalmente dentro del repertorio de la línea germinal del anticuerpo humano in vivo.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM, IgE, IgG tal como IgG1 o IgG4) que está codificada por los genes de la región constante de cadena pesada.

25 Las frases "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan indistintamente en la presente memoria con el término "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

30 Tal como se usa en la presente memoria, un anticuerpo que "se une específicamente a IL-13 humana" pretende referirse a un anticuerpo que se une a IL-13 humana con una K<sub>D</sub> de 5 x 10<sup>-9</sup> M o menos. Un anticuerpo que "reacciona de forma cruzada con un antígeno distinto de la IL-13 humana" pretende referirse a un anticuerpo que se une a ese antígeno con un 5 x 10<sup>-9</sup> M o menos. Un anticuerpo que "no reacciona de forma cruzada con un antígeno particular" pretende referirse a un anticuerpo que se une a ese antígeno, con una K<sub>D</sub> de 1,5 x 10<sup>-8</sup> M o mayor, o una K<sub>D</sub> de 5-10 x 10<sup>-8</sup> M o 1 x 10<sup>-7</sup> M o mayor. En ciertas realizaciones, tales anticuerpos que no reaccionan de forma cruzada con el antígeno exhiben una unión esencialmente indetectable contra estas proteínas en ensayos de unión convencionales.

35 Tal como se usa en la presente memoria, un anticuerpo que "inhibe la unión de IL-13 al receptor de IL-13" se refiere a un anticuerpo que inhibe la unión de IL-13 al receptor con una K<sub>D</sub> de 5 nM o menos.

Tal como se usa en la presente memoria, un anticuerpo que "inhibe la liberación del mediador inflamatorio" pretende referirse a un anticuerpo que inhibe la liberación de eotaxina inducida por IL-13 a partir de fibroblastos de pulmón humanos con un IC<sub>50</sub> inferior a 10 nM, 5 nM, 2,5 nM, 1,0 nM, 0,5 nM, o menos.

40 El término "K<sub>asoc</sub>" o "K<sub>a</sub>", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende referirse a la tasa de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, mientras que el término "K<sub>dis</sub>" o "K<sub>D</sub>", como se usa en la presente memoria, pretende referirse a la tasa de disociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno. El término "K<sub>D</sub>", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende referirse a la constante de disociación, que se obtiene a partir de la relación de K<sub>d</sub> con respecto a K<sub>a</sub> (es decir, K<sub>d</sub>/K<sub>a</sub>) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de K<sub>D</sub> para anticuerpos se pueden determinar usando métodos bien establecidos en la técnica. Un método para determinar la K<sub>D</sub> de un anticuerpo es mediante la utilización de resonancia de plasmón superficial o utilizando un sistema biosensor tal como un sistema Biacore®.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "alta afinidad" para un anticuerpo IgG se refiere a un anticuerpo que tiene una K<sub>D</sub> de 10<sup>-8</sup> M o menos, 10<sup>-9</sup> M o menos, o 10<sup>-10</sup> M o menos para un antígeno objetivo.

50 Tal como se utiliza aquí, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

Diversos aspectos de la invención se describen con más detalle en las siguientes subsecciones.

55 Los ensayos estándar para evaluar la capacidad de unión de los anticuerpos frente a IL-13 de diversas especies se conocen en la técnica, incluyendo, por ejemplo, ELISA, transferencias Western y RIA. Los ensayos adecuados se describen en detalle en los Ejemplos. La cinética de unión (por ejemplo, afinidad de unión) de los anticuerpos

también puede evaluarse mediante ensayos convencionales conocidos en la técnica, tal como por análisis Biacore. Los ensayos para evaluar los efectos de los anticuerpos sobre las propiedades funcionales de IL-13 se describen con más detalle en los Ejemplos.

5 Por consiguiente, un anticuerpo que "inhibe" una o más de estas propiedades funcionales de IL-13 (por ejemplo, actividades bioquímicas, inmunoquímicas, celulares, fisiológicas u otras actividades biológicas, o similares) como se determina de acuerdo con metodologías conocidas en la técnica y descritas en el presente documento, se entenderá que se refiere a una disminución estadísticamente significativa de la actividad particular con respecto a la observada en ausencia del anticuerpo (por ejemplo, o cuando está presente un anticuerpo control de especificidad irrelevante).  
10 Un anticuerpo que inhibe la actividad de la IL-13 produce tal disminución estadísticamente significativa en al menos el 10% del parámetro medido, al menos en un 50%, 80% o 90% y en ciertas realizaciones un anticuerpo de la invención puede inhibir más del 95 %, 98% o 99% de la actividad funcional de IL-13.

#### Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos de la invención son los anticuerpos monoclonales humanos, aislados y estructuralmente caracterizados como se describe, en los Ejemplos 1-5.

15 En una realización, el anticuerpo consiste en: una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 7; una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 8; una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 10; una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 17; una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 19; y una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 21.

20 Como se usa en la presente memoria, un anticuerpo humano comprende regiones variables de cadena pesada o ligera que es "el producto de" o "derivado de" una secuencia de línea germinal particular si las regiones variables del anticuerpo se obtienen a partir de un sistema que usa gene de inmunoglobulina de línea germinal humana. Tales sistemas incluyen la inmunización de un ratón transgénico que porta genes de inmunoglobulina humana con el antígeno de interés o el cribado de una biblioteca de genes de inmunoglobulina humana desplegada en fagos con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "derivado de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana puede ser identificado como tal comparando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulinas de línea germinal humana y seleccionando la secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana más próxima en secuencia (es decir, el mayor % de identidad) a la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "derivado de" una secuencia particular de inmunoglobulina de línea germinal humana puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de línea germinal, debido, por ejemplo, a mutaciones somáticas naturales o introducción intencional de mutación dirigida al sitio. Sin embargo, un anticuerpo humano seleccionado típicamente es al menos 90% idéntico en secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de línea germinal humana y contiene residuos de aminoácidos que identifican el anticuerpo humano como humano cuando se compara con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de línea germinal de otras especies (por ejemplo, secuencias de línea germinal murinas). En ciertos casos, un anticuerpo humano puede ser al menos 60%, 70%, 80%, 90%, o al menos 95%, o incluso al menos 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico en la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de la inmunoglobulina de línea germinal. Típicamente, un anticuerpo humano derivado de una secuencia particular de línea germinal humana mostrará no más de 10 diferencias de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertos casos, el anticuerpo humano puede mostrar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2, o 1 diferencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de la inmunoglobulina de línea germinal.

#### Los anticuerpos homólogos

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, el porcentaje de homología entre dos secuencias de aminoácidos es equivalente al porcentaje de identidad entre las dos secuencias. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = # de posiciones idénticas/# total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de espacios y la longitud de cada espacio, que deben introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede llevar a cabo usando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitativos que se muestran a continuación.

55 El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4: 11-17, 1988) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de residuos en peso PAM120, una penalización por longitud de espacio de 12 y una penalización por espacio de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 444-453, 1970) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), ya sea utilizando una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250, y ponderación por espacio de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y una ponderación por longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

Adicional o alternativamente, las secuencias de proteína de la presente invención pueden utilizarse además como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda contra bases de datos públicas, por ejemplo, para identificar secuencias relacionadas. Dichas búsquedas se pueden realizar usando el programa XBLAST (versión 2.0) de Altschul et al., 1990 J. Mol. Biol. 215: 403-10. Las búsquedas de proteína por BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de anticuerpo de la invención. Para obtener alineaciones con introducción de espacios para propósitos de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul et al., 1997 Nucleic Acids Res. 25 (17): 3389-3402. Cuando se utilizan programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden usar los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Vea <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

#### 10 Anticuerpos con modificaciones conservadoras

Tal como se usa en la presente memoria, el término "modificaciones de secuencia conservadoras" pretende referirse a modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Dichas modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y supresiones de aminoácidos. Pueden introducirse modificaciones en un anticuerpo de la invención mediante técnicas convencionales conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR.

Las sustituciones conservadoras de aminoácidos son aquéllas en las que el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). De este modo, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones CDR de un anticuerpo de la invención pueden ser reemplazados con otros residuos de aminoácidos de la misma familia de cadenas laterales, y el anticuerpo alterado puede ser probado para la función retenida usando los ensayos funcionales descritos en la presente memoria.

Los anticuerpos que se unen al mismo epítipo que los anticuerpos anti-IL-13 de la invención

Se pueden identificar anticuerpos adicionales con base en su capacidad para competir en forma cruzada (por ejemplo, para inhibir competitivamente la unión, en una manera estadísticamente significativa) con anticuerpos de la invención en ensayos de unión estándar de IL-13. La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión de anticuerpos de la presente invención a IL-13 humana demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con ese anticuerpo para la unión a IL-13 humana; tal anticuerpo puede, de acuerdo con la teoría no limitante, unirse al mismo o un epítipo relacionado (por ejemplo, estructuralmente similar o espacialmente proximal) en la IL-13 humana como el anticuerpo con el que compete. Un anticuerpo que se une al mismo epítipo en IL-13 humana como los anticuerpos de la presente invención puede ser un anticuerpo monoclonal humano. Tales anticuerpos monoclonales humanos pueden prepararse y aislarse como se describe en los Ejemplos.

Anticuerpos manipulados y modificados

Un anticuerpo puede prepararse adicionalmente usando un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias de V<sub>H</sub> y/o V<sub>L</sub> mostradas aquí como material de partida para manipular un anticuerpo modificado, donde el anticuerpo modificado puede tener propiedades alteradas a partir del anticuerpo de partida. Un anticuerpo puede manipularse mediante la modificación de uno o más residuos dentro de una o ambas regiones variables (es decir, V<sub>H</sub> y/o V<sub>L</sub>), por ejemplo, dentro de una o más regiones CDR y/o dentro de una o más regiones marco. Adicional o alternativamente, un anticuerpo puede ser manipulado genéticamente modificando residuos dentro de la región o regiones constantes, por ejemplo, para alterar la función o funciones efectoras del anticuerpo.

Un tipo de manipulación de la región variable que puede realizarse es el injerto de CDR. Los anticuerpos interactúan con antígenos objetivo predominantemente a través de residuos de aminoácidos que están localizados en las seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada y ligera. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre los anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos naturales específicos construyendo vectores de expresión que incluyen secuencias de CDR del anticuerpo natural específico injertado sobre secuencias marco de un anticuerpo diferente con diferentes propiedades (véase, por ejemplo, Riechmann, L. et al., 1998 Nature 332: 323-327, Jones, P. et al., 1986 Nature 321: 522-525; Queen, C. et al. 1989 Proc. Natl. Acad. Véase USA, 86: 10029-10033, patente estadounidense No. 5.225.539 de Winter y las patentes estadounidenses Nos. 5.530.101, 5.585.089, 5.693.762 y 6.180.370 de Queen et al.)

Dichas secuencias marco pueden obtenerse a partir de bases de datos públicas de ADN o referencias publicadas que incluyen secuencias génicas de anticuerpo de línea germinal. Por ejemplo, las secuencias de ADN de línea

germinal para los genes de la región variable de cadena pesada y ligera humana se pueden encontrar en la base de datos de secuencias de línea germinal humana "VBase" (disponible en Internet en [www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase)), así como como en Kabat, EA, et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Departamento de Servicios Humanos y de Salud de los Estados Unidos, publicación de NIH No. 91-3242; Tomlinson, I. M., et al., 1992 J. fol. Biol. 227: 776-798; y Cox, J. P. L. et al., 1994 Eur. J Immunol. 24: 827-836.

Un ejemplo de secuencias marco para uso en los anticuerpos de la invención, son aquellas que son estructuralmente similares a las secuencias marco usadas por anticuerpos seleccionados de la invención, por ejemplo, secuencias de consenso y/o secuencias marco usadas por anticuerpos monoclonales de la invención. Las secuencias de CDR1, 2 y 3 de V<sub>H</sub> y las secuencias de CDR1, 2 y 3 de V<sub>L</sub> pueden injertarse en regiones marco que tienen la secuencia idéntica a la encontrada en el gen de la inmunoglobulina de la línea germinal a partir de la cual se deriva la secuencia del marco, o pueden injertarse las secuencias de CDR en regiones marco que contienen una o más mutaciones en comparación con las secuencias de la línea germinal. Por ejemplo, se ha encontrado que en ciertos casos es beneficioso mutar residuos dentro de las regiones marco para mantener o potenciar la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 5.530.101, 5.585.089, 5.693.762 y 6.180.370 de Queen et al).

Otro tipo de modificación de región variable es mutar residuos de aminoácidos dentro de las regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3 de V<sub>H</sub> y/o V<sub>L</sub> para mejorar de este modo una o más propiedades de unión (por ejemplo, afinidad) del anticuerpo de interés, conocido como "maduración de afinidad". La mutagénesis dirigida al sitio o la mutagénesis mediada por PCR pueden realizarse para introducir la mutación o mutaciones y puede evaluarse el efecto sobre la unión al anticuerpo u otra propiedad funcional de interés en ensayos in vitro o in vivo como se describe aquí y se proporciona en la Ejemplos. Se pueden introducir modificaciones conservadoras (como se ha discutido anteriormente). Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos. Además, típicamente no se alteran más de uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos dentro de una región CDR.

Los anticuerpos manipulados de la invención incluyen aquéllos en los que se les han hecho modificaciones a los residuos en el marco dentro de V<sub>H</sub> y/o V<sub>L</sub>, por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Normalmente, tales modificaciones del marco se hacen para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque es "retromutar" uno o más residuos del marco a la secuencia de línea germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que ha sufrido una mutación somática puede contener residuos estructurales que difieren de la secuencia de la línea germinal a partir de la cual se deriva el anticuerpo. Dichos residuos pueden identificarse comparando las secuencias del marco del anticuerpo con las secuencias de la línea germinal de las que se deriva el anticuerpo. Para retornar las secuencias de la región marco a su configuración de línea germinal, las mutaciones somáticas pueden ser "mutadas de nuevo" a la secuencia de la línea germinal, por ejemplo, por mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis mediada por PCR. Tales anticuerpos "mutados de nuevo" también están destinados a ser abarcados por la invención.

Otro tipo de modificación del marco implica la mutación de uno o más residuos dentro de la región marco, o incluso dentro de una o más regiones CDR, para eliminar los epítopos de las células T para reducir así la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. Este enfoque se denomina también "desinmunización" y se describe con más detalle en la publicación de patente estadounidense No. 20030153043 de Carr et al.

Además, o de manera alternativa a las modificaciones hechas dentro de las regiones marco o CDR, los anticuerpos de la invención pueden ser manipulados genéticamente para incluir modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como la semivida en suero, la fijación del complemento, la unión al receptor Fc y/o la citotoxicidad celular dependiente del antígeno. Además, un anticuerpo de la invención puede modificarse químicamente (por ejemplo, una o más fracciones químicas pueden estar unidos al anticuerpo) o modificarse para alterar su glicosilación, de nuevo para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas realizaciones se describe con más detalle a continuación. La numeración de residuos en la región Fc es aquella del índice EU de Kabat.

La región bisagra de CH1 puede ser modificada de manera que el número de residuos de cisteína en la región bisagra se altere, por ejemplo, aumente o disminuya. Este enfoque se describe adicionalmente en la patente de Estados Unidos No. 5.677.425 de Bodmer et al. El número de residuos de cisteína en la región bisagra de CH1 se altera, por ejemplo, para facilitar el montaje de las cadenas ligera y pesada o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

Además, la región bisagra de Fc de un anticuerpo puede ser mutada para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región de interfaz del dominio CH2-CH3 del fragmento bisagra de Fc de tal manera que el anticuerpo tenga una unión alterada de proteína A estafilocócica (SpA) con respecto a la unión de SpA de dominio de bisagra de Fc nativa. Este enfoque se describe con más detalle en la patente de Estados Unidos No. 6.165.745 de Ward et al.

Además, puede modificarse el anticuerpo para aumentar su semivida biológica. Son posibles varios enfoques. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la patente de Estados Unidos No. 6.277.375 de Ward. Alternativamente, para aumentar la semivida biológica, se

puede alterar el anticuerpo dentro de la región CH1 o CL para contener un epítipo de unión al receptor de salvamento tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.869.046 y 6.121.022 de Presta et al.

5 Además, la región Fc puede ser alterada reemplazando al menos un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos pueden ser reemplazados con un residuo de aminoácido diferente de manera que el anticuerpo tenga una afinidad alterada para un ligando efector, pero retenga la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo original. El ligando efector al que se le afecta la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el componente C1 del complemento. Este enfoque se describe con más detalle en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.624.821 y 5.648.260, ambas de Winter et al.

10 Además, uno o más aminoácidos seleccionados de residuos de aminoácidos pueden reemplazarse con un residuo de aminoácido diferente, de manera que el anticuerpo tenga una unión al C1q alterada y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida o suprimida. Este enfoque se describe con más detalle en la patente de Estados Unidos NO. 6.,194.551 de Idusogie et al.

15 Además, pueden alterarse uno o más residuos de aminoácidos para alterar de este modo la capacidad del anticuerpo para fijarse al complemento. Este enfoque se describe adicionalmente en la publicación PCT WO 94/29351 de Bodmer et al.

20 Además, la región Fc puede modificarse para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fcγ modificando uno o más aminoácidos. Este enfoque se describe adicionalmente en la publicación PCT WO 00/42072 de Presta. Además, se han mapeado los sitios de unión en IgG1 humana para FcγR1, FcγRII, FcγRIII y FcRn y se han descrito variantes con unión mejorada (véase Shields, R.L. et al., 2001 J. Biol. Chem. 276: 6591-6604).

25 Además, se modifica la glicosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, se puede preparar un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación puede alterarse, por ejemplo, para aumentar la afinidad del anticuerpo por el "antígeno". Tales modificaciones de carbohidratos pueden lograrse, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, pueden hacerse una o más sustituciones de aminoácidos que resultan en la eliminación de uno o más sitios de glicosilación en el marco de regiones variables para eliminar de este modo la glicosilación en ese sitio. Esta aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tal enfoque se describe con más detalle en las patentes de Estados Unidos No. 5.714.350 y 6.350.861 de Co et al.

30 Adicional o alternativamente, puede elaborarse un anticuerpo que tiene un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos de fucosilo o un anticuerpo que tiene más estructuras de GlcNac bisectantes. Se ha demostrado que tales patrones de glicosilación alterados aumentan la capacidad ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones de carbohidratos pueden lograrse, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula huésped con maquinaria de glicosilación alterada. Las células con maquinaria de glicosilación alterada han sido descritas en la técnica y pueden usarse como células huésped en las que expresar anticuerpos recombinantes de la invención para producir de ese modo un anticuerpo con glicosilación alterada. Por ejemplo, el documento EP 1.176.195 de Hang et al. describe una línea celular con un gen FUT8 alterado funcionalmente, que codifica una fucosil transferasa, de tal manera que los anticuerpos expresados en dicha línea celular presentan hipofucosilación. La publicación PCT WO 03/035835 de Presta describe una variante de la línea celular CHO, células LecI3, con capacidad reducida para unir fucosa a carbohidratos enlazados a Asn (297), dando también como resultado la hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula huésped (véase también Shields, RL et al., 2002 J. Biol. Chem. 277: 26733-2640). La publicación PCT WO 99/54342 de Umana et al. describe líneas celulares manipuladas para expresar glicosil transferasas modificadoras de glucoproteínas (por ejemplo, beta(1,4)-N acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares manipuladas genéticamente presentan más estructuras GlcNac bisectantes que dan lugar a una mayor actividad ADCC de los anticuerpos (véase también Umana et al., 1999, Nat. Biotech., 17: 176-180).

35 Otra modificación de los anticuerpos de la presente invención que se contempla en la invención es la pegilación. Un anticuerpo puede ser pegilado, por ejemplo, para aumentar la semivida biológica (por ejemplo, en suero) del anticuerpo. Para pegilar un anticuerpo, el anticuerpo, o fragmento del mismo, típicamente se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o derivado de aldehído de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos PEG se unen al anticuerpo o fragmento del anticuerpo. La pegilación puede llevarse a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula reactiva de PEG (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Como se usa en el presente documento, el término "polietilenglicol" pretende abarcar cualquiera de las formas de PEG que se han utilizado para formar derivados de otras proteínas, tales como mono (C1-C10) alcoxi o ariloxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En ciertas realizaciones, el anticuerpo a ser pegilado es un anticuerpo aglicosilado. Los métodos para la pegilación de proteínas son conocidos en la técnica y pueden aplicarse a los anticuerpos de la invención. Véase, por ejemplo, el documento EP 0 154 316 de Nishimura et al. y el documento EP 0 401 384 de Ishikawa et al.

Métodos de modificación de anticuerpos

Como se discutió anteriormente, los anticuerpos anti-IL-13 que tienen secuencias de  $V_H$  y  $V_L$  mostradas en la presente memoria pueden usarse para crear nuevos anticuerpos anti-IL-13 modificando las secuencias de  $V_H$  y/o  $V_L$  o la región o regiones constantes unidas a ellas.

5 Se pueden usar técnicas de biología molecular estándar para preparar y expresar la secuencia de anticuerpo alterada. El anticuerpo codificado por la secuencia o secuencias de anticuerpo alteradas puede retener una, algunas o todas las propiedades funcionales de los anticuerpos anti-IL-13 descritos en la presente memoria, cuyas propiedades funcionales incluyen, pero no se limitan a, la unión específica a IL-13 humana; y el anticuerpo exhibe al menos una de las siguientes propiedades funcionales: el anticuerpo inhibe la unión de la proteína IL-13 al receptor de IL-13, o el anticuerpo inhibe la unión al receptor de IL-13 evitando o mejorando una condición inflamatoria, fibrótica o alérgica, particularmente una enfermedad inflamatoria u obstructiva de las vías respiratorias, o el anticuerpo inhibe la unión al receptor de IL-13, evitando o mejorando así el asma.

El anticuerpo alterado puede presentar una o más, dos o más, o tres o más de las propiedades funcionales discutidas anteriormente.

15 Las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados se pueden evaluar usando ensayos estándar disponibles en la técnica y/o descritos en la presente memoria, tales como los expuestos en los Ejemplos (por ejemplo, los ELISA).

20 En un método de manipulación de anticuerpos de la invención, se pueden introducir mutaciones de forma aleatoria o selectiva a lo largo de toda o parte de una secuencia codificadora del anticuerpo anti-IL-13 y los anticuerpos anti-IL-13 modificados resultantes pueden ser detectados respecto a la actividad de unión y/u otras propiedades funcionales como se describe aquí. En la técnica se han descrito métodos de mutaciones. Por ejemplo, la publicación PCT WO 02/092780 de Short describe métodos para crear y detectar mutaciones de anticuerpos usando mutagénesis de saturación, montaje de ligación sintética, o una combinación de los mismos. Alternativamente, la publicación PCT WO 03/074679 de Lazar et al. describe métodos mediante la utilización de métodos de detección informáticos para optimizar las propiedades fisicoquímicas de los anticuerpos.

Moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos de la invención

30 Se describen aquí moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular, o pueden ser ácidos nucleicos en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico está "aislado" o "se considera sustancialmente puro" cuando se purifica fuera de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándar, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, formación de bandas de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otras técnicas bien conocidas en la técnica. Véase F. Ausubel et al., Ed. 1987 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York. Un ácido nucleico puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede o no contener secuencias intrónicas. En un ejemplo, el ácido nucleico es una molécula de ADNc. El ácido nucleico puede estar presente en un vector tal como un vector de despliegue en fagos, o en un vector de plásmido recombinante.

40 Los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos de la invención se pueden obtener usando técnicas de biología molecular convencionales. Para los anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos que portan genes de inmunoglobulina humana como se describe más adelante), los ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo producido por el hibridoma pueden obtenerse por técnicas estándar de amplificación por PCR o clonación de ADNc. Para los anticuerpos obtenidos de una biblioteca de genes de inmunoglobulina (por ejemplo, usando técnicas de despliegue en fagos), el ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede recuperarse de varios clones de fago que son miembros de la biblioteca.

45 Una vez obtenidos los fragmentos de ADN que codifican los segmentos de  $V_H$  y  $V_L$ , estos fragmentos de ADN pueden manipularse adicionalmente mediante técnicas de ADN recombinante convencionales, por ejemplo, para convertir los genes de región variable en genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, en genes del fragmento Fab o en un gen de scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica  $V_L$  o  $V_H$  está operativamente enlazado a otra molécula de ADN, o a un fragmento que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible. El término "operativamente enlazado", tal como se utiliza en este contexto, pretende significar que los dos fragmentos de ADN se unen de una manera funcional, por ejemplo, de tal manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanezcan en el marco, o de manera que la proteína se exprese bajo el control de un promotor deseado.

55 El ADN aislado que codifica la región  $V_H$  puede convertirse en un gen de cadena pesada de longitud completa enlazando operativamente el ADN que codifica  $V_H$  a otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de los genes de la región constante de cadena pesada humana son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, EA, et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta Edición, Departamento de Servicios Humanos y de Salud de los Estados Unidos, publicación de NIH No. 91-3242) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden obtenerse mediante amplificación por

PCR estándar. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD. Para un gen de cadena pesada del fragmento Fab, el ADN que codifica V<sub>H</sub> puede estar operativamente enlazado a otra molécula de ADN que codifica solamente la región constante CH1 de cadena pesada.

5 El ADN aislado que codifica la región V<sub>L</sub> puede convertirse en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como en un gen de cadena ligera Fab) mediante el enlace operativo del ADN que codifica V<sub>L</sub> a otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de los genes de la región constante de cadena ligera humana son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, EA, et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta Edición, Departamento de Servicios Humanos y de Salud de los Estados Unidos, publicación de NIH No. 91-3242) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener por amplificación PCR estándar. La región constante de la cadena ligera puede ser una región constante kappa o una región constante lambda.

15 Para crear un gen de scFv, los fragmentos de ADN que codifican V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> están operativamente enlazados a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly4-Ser)<sub>3</sub>, de manera que las secuencias de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> pueden ser expresadas como una proteína de cadena sencilla contigua, con las regiones V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> unidas por el enlazador flexible (véase, por ejemplo, Bird et al., 1988 Science 242: 423-426, Huston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. 85: 5879-5883, McCafferty et al., Nature 1990 348: 552-554).

Producción de anticuerpos monoclonales de la invención

20 Los anticuerpos monoclonales (mAb) pueden producirse mediante una variedad de técnicas, incluyendo la metodología convencional de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la técnica estándar de hibridación de células somáticas de Kohler y Milstein, 1975 Nature 256: 495. Se pueden emplear muchas técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos B.

25 Un sistema animal para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento bien establecido. En la técnica se conocen protocolos y técnicas de inmunización para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para fusión. También se conocen compañeros de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y procedimientos de fusión.

30 Los anticuerpos quiméricos o humanizados pueden prepararse con base en la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado como se ha descrito anteriormente. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera puede obtenerse a partir del hibridoma murino de interés y manipularse para contener secuencias de inmunoglobulinas no murinas (por ejemplo, humanas) usando técnicas de biología molecular convencionales. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas pueden estar enlazadas a regiones constantes humanas usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 4.816.567 de Cabilly et al.). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones CDR de murino pueden insertarse en un marco humano usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 5.225.539 de Winter y las patentes de Estados Unidos Nos. 5.530.101, 5.585.089, 5.693.762 y 6.180.370 de Queen et al.

40 En una cierta realización, los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales humanos. Dichos anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra IL-13 pueden generarse usando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmune humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones a los que se hace referencia en la presente memoria como ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y se denominan colectivamente aquí "ratones con Ig humano".

45 El ratón HuMAb® (Medarex, Inc.) contiene miniloci del gen de la inmunoglobulina humana que codifica secuencias de inmunoglobulina humana de cadena pesada (μ y γ) y de cadena ligera κ no reordenadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci endógenos de cadena μ y κ (véase, por ejemplo, Lonberg, et al., 1994 Nature 368 (6474): 856-859). Por consiguiente, los ratones exhiben una expresión reducida de IgM o κ de ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes humanos de cadena pesada y ligera introducidos experimentan conmutación de clase y mutación somática para generar IgGκ monoclonales humanas de alta afinidad (Lonberg, N. et al., 1994, Revisado en Lonberg, N., 1994. Handbook of Experimental Pharmacology, 113: 49-101, Lonberg, N. y Huszar, D., 1995, Rev. Immunol.13: 65-93, y Harding, F. y Lonberg, N. 1995. Ann. NY Acad. Sci. 764: 536-546). La preparación y uso de ratones HuMAb, y las modificaciones genómicas llevadas por tales ratones, se describen adicionalmente en Taylor, L. et al., 1992 Nucleic Acids Research 20: 6287-6295; Chen, J. et al., International Immunology 5: 647-656; Tuailon et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 3720-3724; Choi et al., 1993 Nature Genetics 4: 117-123; Chen, J. et al., 1993 EMBO J. 12: 821-830; Tuailon et al., 1994 J. Immunol. 152: 2912-2920; Taylor, L. et al., 1994 International Immunology 579-591; y Fishwild, D. et al., 1996 Nature Biotechnology 14: 845-851.

55 Véase además las Patentes de Estados Unidos No. 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; todo a Lonberg y Kay; la Patente de Estados Unidos No. 5.545.807 de Surani et al.; Publicaciones PCT Nos. WO 92103918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97113852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas ellas a Lonberg y Kay; y Publicación PCT No. WO 01/14424 de Korman et al.

En otra realización, se pueden elevar los anticuerpos humanos de la invención usando un ratón que porta secuencias de inmunoglobulina humana sobre transgenes y transcromosomas tales como un ratón que porta un transgén de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena ligera humana. Tales ratones, denominados en la presente memoria como "ratones KM", se describen en detalle en la publicación PCT WO 02/43478 de Ishida et al.

Aún más, los sistemas animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y pueden usarse para elevar los anticuerpos anti-IL-13 de la invención. Por ejemplo, puede usarse un sistema transgénico alternativo denominado Xenomouse (Abgenix, Inc.); tales ratones se describen, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963 de Kucherlapati et al.

Además, están disponibles en la técnica sistemas animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana y pueden usarse para elevar los anticuerpos anti-IL-13 de la invención. Por ejemplo, se pueden usar ratones que portan tanto un transcromosoma de cadena pesada humana como un transcromosoma de cadena ligera humana, denominados "ratones TC"; tales ratones se describen en Tomizuka et al., 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 722-727. Además, se han descrito en la técnica vacas que portan transcromosomas de cadena pesada y ligera humanas (Kuroiwa et al., 2002 Nature Biotechnology 20: 889-894) y se pueden usar para elevar los anticuerpos anti-IL-13 de la invención.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención pueden prepararse también usando métodos de despliegue en fagos para cribar bibliotecas de genes de inmunoglobulina humana. Tales métodos de despliegue en fagos para aislar anticuerpos humanos están establecidos en la técnica. Véase, por ejemplo: las patentes de Estados Unidos Nos. 5.223.409; 5.403.484; y 5.571.698 de Ladner y otros; las patentes de Estados Unidos Nos. 5.427.908 y 5.580.717 de Dower et al.; las patentes de Estados Unidos Nos. 5.969.108 y 6.172.197 de McCafferty et al.; y las patentes de Estados Unidos Nos. 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 de Griffiths et al.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención se pueden preparar también utilizando ratones SCID en los que se han reconstituido células inmunitarias humanas de tal manera que se puede generar una respuesta de anticuerpos humanos tras la inmunización. Tales ratones se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.476.996 y 5.698.767 de Wilson et al.

#### Generación de anticuerpos monoclonales humanos contra IL-13

Se utiliza como antígeno IL-13 humana recombinante (hr) purificada conjugada con epítomos auxiliares T Pan DR (PADRE). Se preparan anticuerpos monoclonales completamente humanos para IL-13 usando cepas HCo7 de ratones transgénicos HuMab que expresan genes de anticuerpo humano. En esta cepa de ratón, el gen endógeno de la cadena ligera kappa de ratón puede ser interrumpido homocigóticamente como se describe en Chen et al., 1993 EMBO J. 12: 811-820 y el gen endógeno de cadena pesada de ratón puede ser alterado homocigóticamente como se describe en el Ejemplo 1 de la publicación PCT WO 01109187. Esta cepa de ratón porta un transgén de cadena ligera kappa humano, KCo5, como se describe en Fishwild et al., 1996 Nature Biotechnology 14: 845-851 y el transgén de cadena pesada humana HCo7 como se describe en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.545.806, 5,625,825 y 5.545.807.

Para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos para IL-13 de la invención, se inmunizan ratones HuMab con una mezcla de IL-13 recombinante purificada derivada del conjugado HEK-EBNA/PADRE (42 µg/ratón) y Quil A (15 µg/ratón, Accurate Chemical). Los esquemas generales de inmunización para ratones HuMab se describen en Lonberg, N. et al., 1994 Nature 368 (6474): 856-859; Fishwild, D. et al., 1996 Nature Biotechnology 14: 845-851 y la publicación PCT WO 98/24884. Los ratones transgénicos se inmunizan por vía intravenosa (IV) o subcutánea (SC) entre los días 1-71. Los ratones reciben refuerzo por vía intravenosa con antígeno (sin adyuvante) 2 días antes del sacrificio y remoción del bazo. Se aisló el ARN de los bazos utilizando el kit de aislamiento Nucleospin RNA II (BD Biosciences/Clontech). El ARN se utilizó para generar una biblioteca de despliegue en fagos de dominios variables de cadena H y L aleatoriamente clasificados en un vector de despliegue en fagos Fab tal como se describe en la patente de Estados Unidos No. 6.794.132. La biblioteca de presentación en fagos se sometió a cinco rondas de selección utilizando hrIL-13 biotinilado en un protocolo de unión en equilibrio en fase de solución como se describe en la patente. Las cuatro primeras rondas de selección emplearon hrIL-13 a  $10^{-8}$  M y la última ronda de selección empleó hrIL-13 a  $10^{-9}$  M. La relación final de señal a ruido determinada contando las pfu recuperadas en presencia de antígeno dividido por las pfu recuperadas en ausencia de antígeno fue 37 para esta biblioteca, lo que indica que más del 90% de los fagos seleccionados expresaban anticuerpos que se unían a hrIL-13. La biblioteca de despliegue en fagos se subclonó a continuación en un vector de plásmido para la expresión de Fab soluble tal como se describe en la patente de Estados Unidos No. 6.794.132.

#### Generación de transfectomas que producen anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos de la invención también pueden producirse en un transfectoma de células huésped utilizando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección de genes como es bien conocido en la técnica (por ejemplo, Morrison, S. (1985) *Science* 229: 1202).

5 Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos de los mismos, se pueden obtener los ADN que codifican cadenas ligeras y pesadas de longitud total o parcial, mediante técnicas estándar de biología molecular (por ejemplo, amplificación por PCR o clonación de ADNc usando un hibridoma que expresa el anticuerpo de interés) y los ADN pueden insertarse en vectores de expresión de modo que los genes estén operativamente enlazados a secuencias de control transcripcional y de traducción. En este contexto, el término "operativamente enlazado" pretende significar que un gen de anticuerpo se liga en un vector de modo que las secuencias de control transcripcional y de traducción dentro del vector sirvan a su función pretendida de regular la transcripción y traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de expresión se eligen para ser compatibles con la expresión de la célula huésped utilizada. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en un vector separado o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpo se insertan en el vector de expresión mediante métodos estándar (por ejemplo, ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen del anticuerpo y el vector, o ligación del extremo romo si no hay sitios de restricción presentes). Las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden usarse para crear genes de anticuerpo de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo insertándolos en vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de cadena pesada y constantes de cadena ligera del isotipo deseado de tal manera que el segmento V<sub>H</sub> está operativamente enlazado al segmento o segmentos CH dentro del vector y el segmento V<sub>L</sub> está operativamente enlazado al segmento CL dentro del vector. Adicional o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo a partir de una célula huésped. El gen de la cadena del anticuerpo puede clonarse en el vector de tal manera que el péptido señal se enlaza en el marco al extremo terminal amino del gen de la cadena del anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína que no es inmunoglobulina).

Además de los genes de la cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la invención portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena de anticuerpo en una célula huésped. El término "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de la cadena del anticuerpo. Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology, *Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA, 1990). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras para la expresión de células huésped de mamíferos incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteínas en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), virus 40 de simio (SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío principal del adenovirus (AdMLP)), y polioma. Alternativamente, pueden usarse secuencias reguladoras no virales, tales como el promotor de la ubiquitina o el promotor de la P-globina. Además, los elementos reguladores compuestos por secuencias de diferentes fuentes, tales como el sistema promotor SRa, que contiene secuencias del promotor temprano de SV40 y la repetición terminal larga del virus de leucemia de células T humanas tipo 1 (Takebe, Y. et al., 1988 *Mol. Cell. Biol.* 8: 466-472).

Además de los genes de la cadena del anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante de la invención pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células hospedadoras (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de las células huésped en las que se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas de Axel et al.). Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, sobre una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células huésped de dhfr con selección/amplificación de metotrexato) y el gen neo (para la selección de G418).

Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, el vector o los vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera se transfectan en una célula huésped mediante técnicas estándar. Se pretende que las diversas formas del término "transfección" abarquen una amplia variedad de técnicas comúnmente utilizadas para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procarionota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación de fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares. Es teóricamente posible expresar los anticuerpos de la invención en células huésped procarionotas o eucariotas. La expresión de anticuerpos en células eucariotas, en particular células huésped de mamífero, se discute debido a que tales células eucariotas, y en particular células de mamífero, son más apropiadas que las células procarionotas para ensamblar y secretar un anticuerpo debidamente plegado e inmunológicamente activo. La expresión procarionota de genes de anticuerpos ha sido reportada como ineficaz para la producción de altos rendimientos de anticuerpo activo (Boss, M. A. y Wood, C.R., 1985, *Immunology Today* 6: 12-13).

- Las células huésped de mamífero para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células CHO dhfr-, descritas por Urlaub y Chasin, 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220 usadas con un marcador seleccionable de DH FR, por ejemplo, como se describe en RJ Kaufman y PA Sharp, 1982 Mol. Biol. 159: 601-621, células de mieloma NSO, células COS y células SP2. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpo en células huésped de mamífero, se producen los anticuerpos cultivando las células huésped durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se cultivan las células huésped. Los anticuerpos pueden ser recuperados del medio de cultivo usando métodos estándar de purificación de proteínas.
- 5
- 10 Inmunoconjugados
- En otro aspecto, los anticuerpos de la presente invención pueden conjugarse con una fracción terapéutica, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina. Tales conjugados se denominan en la presente memoria como "inmunoconjugados". Los inmunoconjugados que incluyen una o más citotoxinas se denominan "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células (por ejemplo, que mata). Los ejemplos incluyen taxón, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, t. colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracín diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos de los mismos. Los agentes terapéuticos también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo dacarbazina), agentes de ablación (por ejemplo, mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino, antraciclinas (por ejemplo daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramycin (AMC)), y agentes antimitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).
- 15
- 20
- 25
- Otros ejemplos de citotoxinas terapéuticas que pueden conjugarse con un anticuerpo de la invención incluyen duocarmicinas, caliqueamicinas, maitansinas y auristatinas, y derivados de las mismas. Un ejemplo de un conjugado de anticuerpo de calicheamicina está disponible comercialmente (Mylotarg<sup>MR</sup>; Wyeth-Ayerst).
- 30
- Las citotoxinas pueden conjugarse con anticuerpos de la invención utilizando la tecnología de enlazador disponible en la técnica. Ejemplos de tipos de enlazadores que se han usado para conjugar una citotoxina con un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y enlazadores que contienen péptidos. Se puede elegir un enlazador que sea, por ejemplo, susceptible de escisión por pH bajo dentro del compartimento lisosómico o susceptible de escisión por proteasas, tales como proteasas expresadas preferentemente en tejido tumoral tales como catepsinas (por ejemplo, catepsinas B, C, D).
- 35
- Para más información sobre los tipos de citotoxinas, enlazadores y métodos para conjugar agentes terapéuticos con anticuerpos, véase también Saito, G. et al., 2003 Adv. Drug Deliv. Rev. 55: 199-215; Trail, P.A. et al., 2003 Cancer Immunol. Immunother. 52: 328-337; Payne, G., 2003 Cancer Cell 3: 207-212; Allen, T.M., 2002 Nat. Rev. Cancer 2: 750-763; Pastan, I. y Kreitman, R. J., 2002 Curr. Opin. Investig. Drugs 3: 1089-1091; Senter, P.D. y Springer, C.J., 2001 Adv. Drug Deliv. Rev. 53: 247-264.
- 40
- Los anticuerpos de la presente invención también pueden conjugarse con un isótopo radiactivo para generar radiofármacos citotóxicos, también denominados radioinmunoconjugados. Ejemplos de isótopos radiactivos que pueden conjugarse con anticuerpos para uso diagnóstico o terapéutico incluyen, pero no se limitan a, yodo<sup>131</sup>, indio<sup>111</sup>, itrio<sup>90</sup> y lutecio<sup>177</sup>. En la técnica se establecen métodos para preparar radioinmunoconjugados. Ejemplos de radioinmunoconjugados están disponibles comercialmente, incluyendo Zevalin<sup>MR</sup> (DEC Pharmaceuticals) y Bexxar<sup>MR</sup> (Corixa Pharmaceuticals), y pueden usarse métodos similares para preparar radioinmunoconjugados usando los anticuerpos de la invención.
- 45
- Los conjugados de anticuerpo pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada, y la fracción de fármaco no debe interpretarse como limitada a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la fracción de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de Pseudomonas o toxina de difteria; una proteína tal como el factor de necrosis tumoral o interferón  $\gamma$ ; o, modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfoquinas, interleuquina 1 (IL-1), interleuquina 2 (IL-2), interleuquina 6 (IL-6), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulador de colonias de granulocitos ("G-CSF") u otros factores de crecimiento.
- 50
- 55
- Las técnicas para la conjugación de dicha fracción terapéutica con anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo, Amon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2a Ed.), Robinson et al. (eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal

Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), págs. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), págs. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

## 5 Moléculas biespecíficas

En otro aspecto, los anticuerpos de la presente invención pueden ser parte de moléculas biespecíficas que comprenden un anticuerpo anti-IL-13, o un fragmento del mismo. Un anticuerpo de la invención o sus porciones de unión a antígeno puede ser sometido a derivación o ligarse a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, otro anticuerpo o ligando para un receptor) para generar una molécula biespecífica que se une a al menos dos sitios de unión diferentes o moléculas objetivo. De hecho, el anticuerpo de la invención puede ser sometido a derivación o enlazado a más de una molécula funcional para generar moléculas multiespecíficas que se unen a más de dos sitios de unión diferentes y/o moléculas objetivo; tales moléculas multiespecíficas también están destinadas a ser abarcadas por el término "molécula biespecífica" como se usa en el presente documento. Para crear una molécula biespecífica de la invención, un anticuerpo de la invención puede estar funcionalmente unido (por ejemplo, por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más moléculas de unión, tales como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o un mimético de unión, de manera que resulta una molécula biespecífica.

Por consiguiente, se prevén moléculas biespecíficas que comprenden al menos una primera especificidad de unión para IL-13 y una segunda especificidad de unión para un segundo epítipo objetivo. Por ejemplo, el segundo epítipo objetivo es un receptor Fc, por ejemplo, FcγR1 humano (CD64) o un receptor Fcα humano (CD89). Por lo tanto, las moléculas biespecíficas que comprenden anticuerpos de la invención pueden ser capaces de unirse a las células efectoras que expresan FcγR, FcαR o FcεR (por ejemplo, monocitos, macrófagos o células polimorfonucleares (PMN)), y a las células objetivo que expresan IL-13. Estas moléculas no específicas dirigen a las células que expresan IL-13 a células efectoras y desencadenan actividades de células efectoras mediadas por el receptor Fc, tales como fagocitosis de células que expresan IL-13, citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), liberación de citoquinas o generación de anión de superóxido.

Además, si la molécula biespecífica es multiespecífica, la molécula puede incluir además una tercera especificidad de unión, además de una especificidad de unión anti-Fc y una especificidad de unión anti-IL-13. Por ejemplo, la tercera especificidad de unión podría ser una porción del factor antimejoramiento (EF), por ejemplo, una molécula que se une a una proteína de superficie implicada en la actividad citotóxica y, de este modo, aumenta la respuesta inmune contra la célula objetivo. La "porción del factor antimejoramiento" podría ser un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo funcional o un ligando que se une a una molécula dada, por ejemplo, un antígeno o un receptor, y por lo tanto da como resultado un mejoramiento del efecto de los determinantes de unión para el receptor Fc o antígeno de célula objetivo.

La "porción del factor antimejoramiento" puede unirse a un receptor Fc o un antígeno de célula objetivo. Alternativamente, la porción del factor antimejoramiento podría unirse a una entidad que es diferente de la entidad a la que se unen las primeras y segundas especificidades de unión. Por ejemplo, la porción del factor antimejoramiento puede unirse a una célula T citotóxica (por ejemplo, por CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD44, ICAM-1 u otra célula inmunitaria que da como resultado una respuesta inmune aumentada contra la célula objetivo).

En una realización, las moléculas biespecíficas que comprenden anticuerpos de la invención comprenden como especificidad de unión al menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, incluyendo, por ejemplo, un fragmento Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, o un Fv de una sola cadena. El anticuerpo puede ser también un dímero de cadena ligera o de cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo tal como un Fv o un constructo de cadena sencilla como se describe en Ladner et al., patente de Estados Unidos No. 4.946.778, cuyo contenido se incorpora expresamente como referencia.

La especificidad de unión para un receptor Fcγ puede proporcionarse mediante un anticuerpo monoclonal, cuya unión no está bloqueada por la inmunoglobulina G humana (IgG). Como se usa en la presente memoria, el término "receptor de IgG" se refiere a cualquiera de los ocho genes de cadena y localizados en el cromosoma 1. Estos genes codifican un total de doce isoformas de receptor transmembrana o soluble que se agrupan en tres clases de receptor Fcγ: FcγR1 (CD64), FcγR2 (CD32) y FcγR3 (CD16). El receptor Fcγ puede ser un FcγRI humano de alta afinidad. El FcγRI humano es una molécula de 72 kDa, que muestra alta afinidad por IgG monomérica (10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup>).

La producción y caracterización de ciertos anticuerpos monoclonales anti-Fcγ son descritos por Fanger et al. En la publicación PCT WO 88/00052 y en la patente de los Estados Unidos No. 4.954.617. Estos anticuerpos se unen a un epítipo de FcγRI, FcγRII o FcγRIII en un sitio que es distinto del sitio de unión de Fcγ del receptor y, por lo tanto, su unión no está bloqueada sustancialmente por los niveles fisiológicos de IgG. Los anticuerpos anti-FcγRI específicos útiles en esta invención son mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 y mAb 197. El hibridoma que produce mAb 32 está disponible a través de la American Type Culture Collection, ATCC acceso No. HB9469. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-receptor Fcγ es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal 22 (H22). La producción y caracterización del anticuerpo H22 se describe en Graziano, R.F. et al., 1995 *J. Immunol* 155 (10): 4996-5002 y la

publicación PCT WO 94/10332. La línea celular productora de anticuerpo 1122 se depositó en la American Type Culture Collection bajo la designación HA022CL1 y tiene el número de acceso no. CRL 11177.

5 La especificidad de unión para un receptor Fc puede proporcionarse mediante un anticuerpo que se une a un receptor IgA humano, por ejemplo, un receptor Fc-alfa (Fc $\alpha$ RI (CD89), cuya unión no tiene que ser bloqueada por inmunoglobulina A humana (IgA). Se pretende que el término "receptor IgA" incluya al producto génico de un gen (Fc $\alpha$ RI) situado en el cromosoma 19. Se sabe que este gen codifica varias isoformas transmembrana empalmadas  
10 alternativamente de 55 a 110 kDa. Fc $\alpha$ RI (CD89) se expresa constitutivamente en monocitos/macrófagos, granulocitos eosinófilos y neutrófilos, pero no en poblaciones de células no efectoras, Fc $\alpha$ RI tiene afinidad media ( $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ) tanto para IgA1 como para IgA2, que se incrementa tras la exposición a citoquinas tales como G-CSF o GM-CSF (Morton, HC et al., 1996 Critical Reviews in Immunology 116: 423-440). Se han descrito cuatro anticuerpos monoclonales específicos de Fc $\alpha$ RI, identificados como A3, A59, A62 y A77, que se unen a Fc $\alpha$ RI fuera del dominio de unión al ligando de IgA (Monteiro, RC et al., 1992. J. Immunol. 148: 1764).

15 Fc $\alpha$ RI y Fc $\gamma$ RI son receptores de activación para uso en las moléculas biespecíficas que comprenden los anticuerpos de la invención porque se expresan principalmente en células efectoras inmunes, por ejemplo, monocitos, PMN, macrófagos y células dendríticas; expresados a niveles elevados (por ejemplo, 5.000-100.000 por célula); mediadores de actividades citotóxicas (por ejemplo, ADCC, fagocitosis); median la presentación mejorada antigénica de antígenos, incluyendo auto-antígenos, dirigidos a ellos.

Otros anticuerpos que se pueden emplear en las moléculas biespecíficas son anticuerpos monoclonales murinos, quiméricos y humanizados.

20 Las moléculas biespecíficas se pueden preparar conjugando las especificidades de unión constituyentes, por ejemplo, las especificidades de unión anti-FcR y anti-IL-13, utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula biespecífica puede ser generada separadamente y luego conjugadas entre sí. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, se puede usar una variedad de agentes de acoplamiento o entrecruzamiento para conjugación covalente. Ejemplos de agentes de entrecruzamiento incluyen la  
25 proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)-propionato (SPDP) y sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) (véase, por ejemplo, Karpovsky et al., 1984 J. Exp. Med. 160: 1686, Liu, MA et al., 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8648). Otros métodos incluyen los descritos en Paulus, 1985 Behring Ins. Mitt. No. 78.118-132; Brennan et al., 1985 Science 229: 81-83), y Glennie et al., 1987 J. Immunol. 139: 2367-2375). Los agentes de conjugación son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles a través de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

30 Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, pueden conjugarse mediante unión por sulfhidrilo de las regiones bisagra del extremo terminal C de las dos cadenas pesadas. En una realización particular, la región bisagra se modifica para contener un número impar de residuos sulfhidrilo, por ejemplo, uno, antes de la conjugación.

35 Alternativamente, ambas especificidades de unión pueden codificarse en el mismo vector y expresarse y ensamblarse en la misma célula huésped. Este método es particularmente útil cuando la molécula biespecífica es una proteína de fusión mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')<sub>2</sub> o ligando x Fab. Una molécula biespecífica puede ser una molécula de cadena sencilla que comprende un anticuerpo de cadena sencilla y un determinante de unión, o una molécula biespecífica de cadena sencilla que comprende dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas pueden comprender al menos dos moléculas de cadena sencilla. Los métodos para preparar moléculas biespecíficas se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos No. 5.260.203; la patente de Estados Unidos No. 5.455.030; la patente de Estados Unidos No. 4.881.175; la patente de Estados Unidos No. 5.132.405; la patente de Estados Unidos No. 5.091.513; la patente de Estados Unidos No. 5.476.786; la patente de Estados Unidos No. 5.013.653; la patente de Estados Unidos No. 5.258.498; y la patente de Estados Unidos No. 5.482.858.

40 La unión de las moléculas biespecíficas a sus objetivos específicos puede confirmarse, por ejemplo, mediante el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (REA), análisis FACS, bioensayo (por ejemplo, inhibición del crecimiento) o el ensayo de transferencia Western. Cada uno de estos ensayos detecta generalmente la presencia de complejos proteína-anticuerpo de particular interés empleando un reactivo marcado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés. Por ejemplo, los complejos FcR-anticuerpo pueden detectarse usando, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo enlazado a enzima que reconoce y se une específicamente a los complejos anticuerpo-FcR. Alternativamente, los complejos se pueden detectar usando cualquiera de una variedad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse radioactivamente y utilizarse en un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, marzo de 1986). El isótopo radiactivo puede ser detectado por medios tales como el uso de un contador y o un contador de centelleo o por autorradiografía.

45 Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene una o una combinación de anticuerpos monoclonales, o porción o porciones de unión a antígeno de la misma, de la presente invención, formulada junto con un portador farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones pueden incluir una o una combinación (por ejemplo, dos o más diferentes) de anticuerpos, o inmuoconjugados o moléculas biespecíficas de la invención. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención puede comprender una combinación de anticuerpos (o inmuoconjugados o biespecíficos) que se unen a diferentes epítopos en el antígeno objetivo o que tienen actividades complementarias.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden administrar en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo anti-IL-13 de la presente invención combinado con al menos otro agente antiinflamatorio. Los ejemplos de agentes terapéuticos que pueden usarse en terapia de combinación se describen con mayor detalle a continuación en la sección sobre usos de los anticuerpos de la invención.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye uno cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares que son fisiológicamente compatibles. El portador debe ser adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, anticuerpo, inmuoconjugado o molécula biespecífica, puede recubrirse con un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Los compuestos farmacéuticos de la invención pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto original y no imparte efectos toxicológicos no deseados (véase, por ejemplo, Berge, SM et al., 1977 J. Pharm. Sci. 66: 1-19). Ejemplos de tales sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como los ácidos, clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos mono y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos sustituidos en el fenilo, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición de base incluyen las derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletildiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

Una composición farmacéutica de la invención también puede incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y agentes quelantes metálicos, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y por el uso de tensoactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede asegurar tanto mediante procedimientos de esterilización, citados más arriba, como por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido sórbico fenólico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede ser provocada por la inclusión de agentes que retrasan la absorción tales como el monoestearato de aluminio y gelatina.

Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas de la invención. También se pueden incorporar compuestos activos suplementarios en las composiciones.

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una concentración elevada de fármaco. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol

- líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensoactivos. En muchos casos, se pueden incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede llevarse a cabo incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.
- Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con una o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por microfiltración para esterilización. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son secado al vacío y deshidratación por aspersion (liofilización) que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución del mismo filtrada previamente en forma estéril.
- La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del sujeto que se esté tratando y del modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una única forma de dosificación será generalmente la cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. Generalmente, del cien por ciento, esta cantidad oscilará entre aproximadamente 0,01 por ciento y aproximadamente noventa y nueve por ciento de ingrediente activo, entre aproximadamente 0,1 por ciento y aproximadamente 70 por ciento, o entre aproximadamente 1 por ciento y aproximadamente 30 por ciento de ingrediente activo en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.
- Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas en el tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación de las formas unitarias de dosificación de la invención está dictada por y depende directamente de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular que se pretende alcanzar, y de las limitaciones inherentes en la técnica de combinación de dicho compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en los individuos.
- Para la administración del anticuerpo, la dosificación oscila entre aproximadamente 0,0001 y 100 mg/kg, y más usualmente entre 0,01 y 5 mg/kg, del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Un ejemplo de tratamiento implica la administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez cada tres a seis meses. Los regímenes de dosificación para un anticuerpo anti-IL-13 de la invención pueden incluir 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal por administración intravenosa o subcutánea, con el anticuerpo administrado utilizando uno de los siguientes esquemas de dosificación: por ejemplo, cada cuatro semanas para seis dosis, luego cada tres meses; cada tres semanas; 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido de 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.
- En algunos métodos, dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión se administran simultáneamente, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado cae dentro de los intervalos indicados. El anticuerpo se administra generalmente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones individuales pueden ser, por ejemplo, semanales, mensuales, cada tres meses o anualmente. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indica midiendo los niveles en sangre de anticuerpo para el antígeno objetivo en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para conseguir una concentración de anticuerpo en plasma de aproximadamente 1-1000 µg/ml y en algunos métodos aproximadamente 25-300 µg/ml.
- Alternativamente, el anticuerpo se puede administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosis y la frecuencia varían dependiendo de la vida media del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la semivida más larga, seguida de anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. La dosis y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo periodo de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento por el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduce o termina o hasta que el paciente muestra una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Posteriormente, se puede administrar al paciente un régimen profiláctico.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares empleadas de la presente invención, o el éster, sal o amida de la misma, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que está siendo empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la condición, el estado de general de salud y la historia médica previa del paciente que está siendo tratado, y factores similares bien conocidos en la práctica médica.

Una "dosificación terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo anti-IL-13 de la invención puede dar como resultado una disminución de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento de la frecuencia y duración de los períodos libres de síntomas de la enfermedad, o una prevención del deterioro o discapacidad debidos a la aflicción por la enfermedad.

Una composición de la presente invención se puede administrar por una o más vías de administración usando uno o más de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciará el experto en la técnica, la ruta y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Las vías de administración de anticuerpos de la invención incluyen vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías parenterales, por ejemplo, por inyección o infusión. La frase "administración parenteral", tal como se usa en la presente memoria, significa modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, usualmente por inyección, e incluye, sin limitación, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbitaria, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal e infusión.

Alternativamente, un anticuerpo de la invención puede administrarse por vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosal, por ejemplo, por vía intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

Los compuestos activos se pueden preparar con portadores que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de vinil etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Las composiciones terapéuticas se pueden administrar con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización, se puede administrar una composición terapéutica de la invención con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos mostrados en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824 o 4.596.556. Ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente invención incluyen: la patente de Estados Unidos No. 4.487.603, que muestra una bomba de micro-infusión que puede ser implantada para dispensar medicamento a una velocidad controlada; la patente de Estados Unidos No. 4.486.194, que muestra un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; la patente de Estados Unidos No. 4.447.233, que muestra una bomba de infusión de medicación para suministrar una medicación a una velocidad de infusión precisa; la patente de Estados Unidos No. 4.447.224, que muestra un aparato de infusión que puede ser implantado de flujo variable para suministro continuo de fármaco; la patente de Estados Unidos No. 4.439.196, que muestra un sistema de administración de fármaco osmótico que tiene compartimentos de múltiples cámaras; y la patente de Estados Unidos No. 4.475.196, que muestra un sistema osmótico de administración de fármaco. Estas patentes se incorporan aquí como referencia. Muchos otros tales implantes, sistemas de suministro y módulos son conocidos por los expertos en la técnica.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanos de la invención pueden formularse para asegurar una distribución apropiada in vivo. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrofílicos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la invención atraviesan la BBB (si se desea), pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para métodos de fabricación de liposomas, véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender una o más fracciones que se transportan selectivamente dentro de células u órganos específicos, mejorando así la liberación dirigida del fármaco (véase, por ejemplo, V.V. Ranade, 1989 J. Cline Pharmacol., 29: 685). Los ejemplos de fracciones de direccionamiento incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 5.416.016 de Low et al.); manósidos (Umezawa et al., 1988 Biochem. Biophys Res. Commun. 153: 1038); (P.G. Bloeman et al., 1995, FEBS Lett., 357: 140, M. Owais et al., 1995, Antimicrob., Agents Chemoth., 39: 180); el receptor de la proteína A tensoactiva (Briscoe et al., 1995, Am. J. Physiol, 1233: 134); P120 (Schreier et al., 1994 J. Biol. Chem. 269: 9090); véase también K. Keinanen; M.L. Laukkanen, 1994 FEBS Lett. 346: 123; J.J. Killion; I.J. Fidler, 1994 Immunomethods 4: 273.

Usos y métodos de la invención

Los anticuerpos (e inmunoconjugados y moléculas biespecíficas que los comprenden) de la presente invención tienen utilidades diagnósticas y terapéuticas in vitro e in vivo. Por ejemplo, estas moléculas pueden administrarse a células en cultivo, por ejemplo, in vitro o in vivo, o en un sujeto, por ejemplo, in vivo, para tratar, prevenir o diagnosticar una variedad de trastornos. El término "sujeto" tal como se usa aquí en la presente memoria pretende incluir animales humanos y no humanos. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas, caballos, pollos, anfibios y reptiles. Los métodos son particularmente adecuados para tratar pacientes humanos que tienen un trastorno asociado con expresión aberrante de IL-13. Cuando se administran anticuerpos contra IL-13 junto con otro agente, los dos se pueden administrar en cualquier orden o simultáneamente.

Por ejemplo, los anticuerpos (e inmunoconjugados y moléculas biespecíficas) de la invención se pueden usar para detectar niveles de IL-13, o niveles de células que contienen IL-13. Esto puede conseguirse, por ejemplo, poniendo en contacto una muestra (tal como una muestra in vitro) y una muestra de control con el anticuerpo anti-IL-13 en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y la IL-13. Cualquier complejo formado entre el anticuerpo y la IL-13 se detecta y compara en la muestra y el control. Por ejemplo, se pueden realizar métodos de detección estándar, bien conocidos en la técnica, tales como ELISA y ensayos citométricos de flujo, utilizando las composiciones de la invención.

En otro ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden usarse en procedimientos para detectar la presencia de IL-13 (por ejemplo, antígeno IL-13 humano) en una muestra, o medir la cantidad de IL-13, que comprende poner en contacto la muestra, y una muestra de control, con un anticuerpo de la invención, o una porción de unión a antígeno de la misma, que se une específicamente a IL-13, en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo o parte de la misma y IL-13. Entonces se detecta la formación de un complejo, donde una diferencia en la formación de complejos entre la muestra comparada con la muestra de control es indicativa de la presencia de IL-13 en la muestra.

Los anticuerpos de la invención también se pueden usar en kits que consisten en las composiciones (por ejemplo, anticuerpos, anticuerpos humanos, inmunoconjugados y moléculas biespecíficas) de la presente invención e instrucciones de uso. El kit puede contener además al menos un reactivo adicional, o uno o más anticuerpos adicionales de la invención (por ejemplo, un anticuerpo que tiene una actividad complementaria que se une a un epítipo sobre el antígeno objetivo distinto del primer anticuerpo). Los kits incluyen típicamente una etiqueta que indica el uso pretendido del contenido del kit. El término etiqueta incluye cualquier material escrito o grabado suministrado en o con el kit, o que de otro modo acompaña al kit.

La invención que se ha descrito completamente, se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos y reivindicaciones, que son ilustrativos y no pretenden ser más limitativos.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1: Generación de anticuerpos específicos de IL-13 humana a partir de bibliotecas esplénicas inmunizadas

El ARN del bazo se utilizó para generar una biblioteca de despliegue en fagos de dominios variables de cadena H y L aleatoriamente clasificados en un vector de despliegue en fagos de Fab tal como se describe en la patente de Estados Unidos No. 6.794.132. La biblioteca de despliegue en fagos se sometió a cinco rondas de selección utilizando hrIL-13 biotinilado en un protocolo de unión en equilibrio en fase de solución como se describe en la patente. Las cuatro primeras rondas de selección emplearon hrIL-13 a  $10^{-8}$  M y la última ronda de selección empleó hrIL-13 a  $10^{-9}$  M. La relación final de señal/ruido determinada contando las pfu recuperadas en presencia de antígeno dividido por las pfu recuperadas en ausencia de antígeno fue de 37 para esta biblioteca, lo que indica que más del 90% de los fagos seleccionados expresaban anticuerpos que se unían a hrIL-13. La biblioteca de despliegue en fagos se subclonó a continuación en un vector de plásmido para la expresión de Fab soluble tal como se describe en la patente de Estados Unidos No. 6.794.132. La biblioteca subclonada comprende vectores plasmídicos en *E. Coli*, codificando cada plásmido un fragmento Fab monoclonal. La biblioteca de subclones se sembró en placas y se recogieron colonias que representaban clones individuales para inocular placas de 96 pozos. Después del crecimiento durante la noche, se usaron los cultivos de placas para archivar bancos de células congeladas para los clones en placas de 96 pozos y también para sembrar réplicas de placas de 96 pozos que se indujeron para expresar anticuerpos monoclonales. Al día siguiente, estos cultivos de placa de 96 pozos se sometieron a extracción con detergente y purificación para recuperar cantidades de microgramos de anticuerpos. Los anticuerpos purificados se trataron para eliminar la endotoxina y se filtraron en forma estéril de forma terminal. Los ensayos ELISA se llevaron a cabo usando rhIL-13 biotinilado recubierto en placas de avidina para identificar cuáles pozos contenían positivos funcionales. Se usaron ensayos tipo sándwich dirigidos a la región constante de los anticuerpos para determinar las concentraciones de anticuerpos en diferentes pozos. Las placas de 96 pozos que contenían los anticuerpos y los datos del ensayo se evaluaron en cuanto a la actividad biológica. Los clones de interés en los bancos de células congeladas de 96 pozos se secuenciaron a continuación para identificar los que expresaban anticuerpos únicos. Posteriormente, los bancos de células congeladas de estos clones únicos se usaron para sembrar cultivos en matraces con agitación a pequeña escala y se desarrollaron durante la noche. Los matraces a gran escala se sembraron usando los cultivos de la noche anterior y luego se indujeron para expresar anticuerpos. Al día siguiente, los cultivos en matraz se homogeneizaron mecánicamente y se purificaron para

producir cantidades de anticuerpos en miligramos. Los Fab purificados se procesaron para la eliminación de endotoxinas y se sometieron a filtración estéril terminal. La actividad funcional de estos anticuerpos se demostró por ELISA usando rhIL-13 biotinilado recubierto en placas de avidina. Las concentraciones de anticuerpo se determinaron mediante medición de la absorbancia a 280 nm. Los Fab purificados se evaluaron con respecto a la unión y actividad *in vitro* en un ensayo basado en células.

**Ejemplo 2:** Análisis cuantitativo de afinidades de unión: determinación de candidatos Fab de anti-IL-13 humano

Las mediciones de resonancia de plasmón de superficie que cuantifican la interacción de los Fab anti-IL-13 con varias hrIL-13 se realizan usando el biosensor óptico BIAcore 2000. La unión específica de IL-13 a un Fab IL-13 respectivo inmovilizado en un chip BIAcore puede medirse siguiendo la acumulación del ligando en el receptor. La asociación microscópica ( $K_{\text{asociación}}$ ) y las tasas de disociación ( $K_{\text{disociación}}$ ) se pueden obtener directamente de las tasas de acumulación de masa en el chip y se expresan en unidades de respuesta (RU). El Fab anti-IL-13 se inmoviliza en la superficie del chip a través de un anticuerpo anti-L $\kappa$  humano secundario (Jackson Immunochemicals). Este anticuerpo de captura se unió covalentemente utilizando el "kit de acoplamiento de amina" (BIAcore, No. de cat. BR-1000-50) según lo recomendado en los protocolos de los fabricantes. Se inyectaron 250  $\mu$ l de concentraciones variables de hrIL-13 a una velocidad de flujo de 20  $\mu$ l/min y se registró la traza cinética. La superficie del chip se regeneró mediante dos etapas de lavado con ácido usando HCl 100 mM y se inyectaron 10  $\mu$ l con una velocidad de flujo de 20  $\mu$ l/min. Este tratamiento conduce a la disociación del complejo Fab IL-13 debido a la desnaturalización ácida reversible. No se observó pérdida significativa de la actividad de unión cuando se volvió a inyectar el anticuerpo para un procedimiento posterior. Las trazas cinéticas se evaluaron con el software BIAcore aplicando el modelo de asociación de Langmuir 1:1

Los datos de afinidad resumidos sobre IL-13 humana se muestran en la Tabla 1 de la presente memoria descriptiva.

Tabla 1

Fab	KD [pM] de IL-13 humana
01471/G6	100 $\pm$ 2
03161/H2	197 $\pm$ 12
01951/G12	480 $\pm$ 68
01771/E10	343 $\pm$ 54

**Ejemplo 3:** Conversión en el formato de IgG

Las plantillas de secuenciación de ADN de anticuerpos se purificaron a partir de cultivos de 3 ml usando minipreps QIAprep (Qiagen Inc.). Las plantillas se secuenciaron usando un analizador genético Avant Applied Biosystems 3100 de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Las regiones variables de la cadena pesada y kappa de los clones seleccionados se amplificaron por separado de las plantillas de secuenciación mediante PCR, se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se cortaron y purificaron del gel. Los plásmidos que codifican la V<sub>H</sub> y la V<sub>L</sub> se clonaron en los casetes de expresión para las cadenas ligera kappa humana y pesada de IgG<sub>1</sub> humana. La línea celular parental Sp2/0 se transfectó con dos vectores, uno para los vectores de cadena pesada y el otro de cadena ligera. Las células transfectadas se seleccionaron y amplificaron usando G418 y metotrexato respectivamente, dando como resultado la aparición de agrupaciones de células amplificadas resistentes que producían anticuerpos con títulos que oscilaban entre 5 mg/L y 30 mg/L. Se empleó luego clonación por dilución, resultando en el aislamiento de 127 clones viables de seis placas de 96 pozos. Las líneas celulares emergentes se ensayaron entonces en cuanto a la productividad en un formato de agitador alimentado por lotes. También se realizaron ensayos de estabilidad para confirmar la integración estable de los constructos de expresión y la expresión robusta del producto durante un período de 90 días. Las transferencias de Northern exhibieron ARN de longitud completa únicos con intensidades de banda iguales, indicando niveles de expresión similares tanto para la cadena pesada como para la cadena ligera.

**Ejemplo 4:** Caracterización *in vitro* de anticuerpos completos anti-IL-13 en un ensayo basado en células

La IL-13 es un potente inductor de la liberación de eotaxina de fibroblastos de pulmón humanos. La capacidad de los anticuerpos para neutralizar la bioactividad de IL-13 se evaluó en un ensayo de liberación de eotaxina inducida por IL-13 utilizando fibroblastos de pulmón humanos. En pocas palabras, se sembraron en placa células (2 x 10<sup>4</sup> células por pozo en un volumen de 100  $\mu$ l) en cada pozo de una placa de cultivo de tejidos de 96 pozos. Las células se estimularon con una concentración de IL-13 que confiere el 80% de la liberación máxima de eotaxina, que se determinó previamente para cada lote de células usando una curva estándar de 0-100 ng/ml de IL-13. Se coaplicaron a las células concentraciones variables de los anticuerpos. Se incubaron las células durante 24 horas a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5% y el medio de cultivo se recogió y se almacenó a -20°C hasta que se requiriera. Los niveles de

eotaxina dentro de los medios se midieron mediante ELISA específico (R&D Systems) donde la sensibilidad del ensayo estaba entre 15 y 1.000 pg/ml.

Los Fab anti-IL-13 fueron luego analizados con respecto a EC<sub>50</sub> como se describió anteriormente y mostrados en la Tabla 2.

5

Tabla 2

Anticuerpo	EC <sub>50</sub> [nM] de IL-13 humana
01471/G6	1,23 ± 0,4
03161/H2	0,95 ± 0,2
01951/G12	0,33 ± 0,1
01771/E10	1,71 ± 0,5

**Ejemplo 5:** Análisis secuencial de los anticuerpos anti-IL-13

10

Se determinaron las secuencias de nucleótidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera (V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>) de todos los anticuerpos. Las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) se enumeran en las Tablas 3 y 4 de la presente memoria. Las CDR según la definición de Kabat (E. Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición, Servicio de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD), se enumeran en las Tablas 3a y 4a.

Tabla 3

Anticuerpo	HCDR1	SEQ ID No. HCDR1	HCDR2	SEQ ID No. HCDR2	HCDR3	SEQ ID No. HCDR3
01471/G6	GFTFSNYG	1	IWYDGSN	3	VKGSGDIP	4
03161/H2	GFTFSNYG	1	IWYDGSN	3	VKGSGDIP	4
01951/G12	GFTFSSYG	2	IWYDGSN	3	ARLWFGDLD	5
01771/E10	GFTFSSYG	2	IWYDGSN	3	ARLWFGDLD	5

15

Tabla 3a

Anticuerpo	HCDR1	SEQ ID No. HCDR1	HCDR2	SEQ ID No. HCDR2	HCDR3	SEQ ID No. HCDR3
01471/G6	NYGMH	6	IIWYDGSNKYYADSVKG	8	GSGDIPFDY	9
03161/H2	NYGMH	6	IIWYDGSNKYYADSVKG	8	GSGDIPFDY	9
01951/G12	SYGMH	7	IIWYDGSNKYYADSVKG	8	LWFGDLDAFDI	10
01771/E10	SYGMH	7	IIWYDGSNKYYADSVKG	8	LWFGDLDAFDI	10

Tabla 4

Antibody	LCDR1	SEQ ID No. LCDR1	LCDR2	SEQ ID No. LCDR2	LCDR3	SEQ ID No. LCDR3
01471/G6	QSVSSY	11	DA	12	HQRSHWPPI	13
03161/H2	QSVSSY	11	DA	12	HQRSHWPPI	13
01951/G12	QSVSSY	11	DA	12	QQRSSWPPV	14

01771/E10	QSVSSY	11	DA	12	HQRSSWPPI	15
-----------	--------	----	----	----	-----------	----

Tabla 4a

Anticuerpo	LCDR1	SEQ ID No. LCDR1	LCDR2	SEQ ID No. LCDR2	LCDR3	SEQ ID No. LCDR3
01471/G6	RASQSVSSYLA	16	DASNRAT	19	HQRSHWPPIFT	20
03161/H2	RASQSVSSYLA	16	DASNRAT	19	HQRSHWPPIFT	20
01951/G12	<b>RAGQSVSSYLV</b>	17	DASNRAT	19	<b>QQRSSWPPVYT</b>	21
01771/E10	RASQSVSSYLA	18	DASNRAT	19	HQRSSWPPIFT	22

5 A continuación, se muestran las secuencias de los anticuerpos de las tablas anteriores, incluyendo las regiones marco. Las regiones constantes de cadena ligera y pesada del anticuerpo IgG1 completo se muestran también a continuación, incorporando, como ejemplo, las regiones variables del anticuerpo 01951/G12 (en negrita).

Secuencia de anticuerpos 01471/G6

(i) Región variable de HC

10 La secuencia de aminoácidos variable de HC para 01471/G6 se muestra en la SEQ ID NO: 23 y está codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 24

```

E V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L
gaagtgcagctggtggagtctgggggagggcgtggtccagcctgggaggtccctgagactc 60

S C A A S G F T F S N Y G M H W V R Q A
tcctgtgcagcgtctggattcaccttcagtaactatggcatgcactgggtccgccaggct 120

P G K G L E W V A I I W Y D G S N K Y Y
ccaggcaaggggctggagtgggtggcaattatatggtatgatggaagtaataaataactat 180

A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y
gcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtat 240

L Q M N S L R A E D T A V Y Y C V K G S
ctgcaaatgaacagctctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgtgaaaggatct 300

G D I P F D Y W G Q G T L V T (SEQ ID NO : 23)
ggggatattccctttgactactggggccagggaaacctggtcacc 345 (SEQ ID NO :24)
    
```

(ii) Región variable de LC

La secuencia de aminoácidos variable de LC para 01471/G6 se muestra en la SEQ ID NO: 25 y está codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 26

# ES 2 642 487 T3

E I V L T Q S P A T L S S S P G E R A T  
gaaattgtgttgacgcagctctccagccaccctgtcttcgtctccaggggaaagagccacc 60

L S C R A S Q S V S S Y L A W Y Q Q K P  
ctctcctgcagggccagtcagagtgtagcagctacttagcctggtaccaacagaaacct 120

G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A  
ggccaggtcccaggtcctcatctatgatgcatccaacagggccactggcatcccagcc 180

R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P  
aggttcagtggtcagtggtctgggacagacttcactctcaccatcagcagcctagagcct 240

E D F A V Y Y C H Q R S H W P P I F T F  
gaagattdtgcagctctattactgtcatcagcgtagccactggcctcccatattcactttc 300

G P G T (SEQ ID NO: 25)  
ggccctgggacc 312 (SEQ ID NO: 26)

## Anticuerpo 03161/H2

### (i) Región variable de HC

5 La secuencia de aminoácidos variable de HC para 03161/H2 se muestra en la SEQ ID NO: 27 y está codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: SEQ ID NO: 28

E V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L  
gaagtgcagctggtggagctctgggggagggcgtggtccagcctgggaggtccctgagactc 60

S C A A S G F T F S N Y G M H W V R Q A  
tcctgtgcagcgtctggattcaccttcagtaactatggcatgactgggtccgccaggtc 120

P G K G L E W V A I I W Y D G S N K Y Y  
ccaggaaggggctggagtggtggcaattatattggtatgatggaagtaataaatactat 180

A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y  
gcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtat 240

L Q M N S L R A E D T A V Y Y C V K G S  
ctgcaaatgaacagctctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgtgaaaggatct 300

G D I P F D Y W G Q G T L V T (SEQ ID NO : 27)  
ggggatattccctttgactactggggccaggggaaccctggtcacc 345> (SEQ ID NO : 28)

### (ii) Región variable de LC

La secuencia de aminoácidos variable de LC para 03161/H2 se muestra en la SEQ ID NO: 29 y está codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 30

E I V L T Q S P A T L S S S P G E R A T  
gaaattgtgttgacgcagctcccagccaccctgtcttcgtctccaggggaaagagccacc 60

L S C R A S Q S V S S Y L A W Y Q Q K P  
ctctcctgcagggccagtcagagtgtagcagctacttagcctggtaccaacagaaacct 120

G Q A P R L L I Y D A S N R A T G T P A  
ggccaggtcccaggtcctcatctatgatgcatccaacagggccactggcaccaccagcc 180

R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P  
aggttcagtggtcagtggtctgggacagacttcactctcaccatcagcagcctagagcct 240

E D F A V Y Y C H Q R S H W P P I F T F  
gaagattdtgcagctctattactgtcatcagcgtagccactggcctcccatattcactttc 300

G P G T (SEQ ID NO :29)  
ggccctgggacc 312 (SEQ ID NO :30)

10

Secuencia de anticuerpos 01951/G12

## ES 2 642 487 T3

### (i) Región variable de HC

La secuencia de aminoácidos variable de HC para 01951/G12 se muestra en la SEQ ID NO: 31 y está codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 32

```
E V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L
gaagtgcagctggtggagctctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccctgagactc 60

S C A A S G F T F S S Y G M H W V R Q A
tcctgtgcagcgtctggattcaccttcagtagctatggcatgcactgggtccgccaggt 120

P G K G L E W V A I I W Y D G S N K Y Y
ccaggcaaggggctggagtggtggcaattatatggtatgatggaagtaataaatactat 180

A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y
gcgactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtat 240

L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R L W
ctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacagcgtgtgtattactgtgcgaggctatgg 300

F G D L D A F D I W G Q G T M V T (SEQ ID NO :31)
ttcggggacttagatgcttttgatatctggggccaagggacaatggtcacc 351 (SEQ ID
NO :32)
```

### 5 (ii) Región variable de LC

La secuencia de aminoácidos variable de LC para 01951/G12 se muestra en la SEQ ID NO: 33 y está codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 34

```
E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A I
gaaattgtgttgacgcagctctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccatc 60

L S C R A G Q S V S S Y L V W Y Q Q K P
ctctcctgcagggccggtcagagtgtagcagttacttagtctggtaccaacagaaacct 120

G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A
ggccaggctcccagcctcctcatctatgatgcatccaacagggccactggcatcccagcc 180

R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P
aggttcagtggtcagtggtctgggacagacttcactctcaccatcagcagcctagagcct 240

E D F A V Y Y C Q Q R S S W P P V Y T F
gaagatthttgcagtttattactgtcagcagcgcagcagctggcctccggtgtacactttt 300

G Q G T (SEQ ID NO :33)
ggccaggggacc 312 (SEQ ID NO :34)
```

Secuencia del anticuerpo 01771/E10

### 10 (i) Región variable de HC

La secuencia de aminoácidos variable de HC para 01771/E10 se muestra en la SEQ ID NO: 35 y está codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 36

## ES 2 642 487 T3

Q V Q L V Q S G G G V V Q P G R S L R L  
caggtgcagctggtgcagctctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccctgagactc 60

S C A A S G F T F S S Y G M H W V R Q A  
tcctgtgcggcgtctggattcaccttcagtagctatggcatgcactgggtccgccaggct 120

P G K G L E W V A I I W Y D G S N K Y Y  
ccaggcaaggggctggagtggtggcaattatatggtatgatggaagtaataaatactat 180

A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y  
gcggtaccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctatat 240

L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R L W  
ctacaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgagagctatgg 300

F G D L D A F D I W G Q G T M V T (SEQ ID NO :35)  
ttcggggacttagatgcttttgatatctggggccaagggacaatgggtcacc 351 (SEQ ID NO :36)

### (ii) Región variable de LC

La secuencia de aminoácidos variable de LC para 01771/E10 se muestra en la SEQ ID NO: 37 y está codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 38

E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T  
gaaattgtgttgacgcagctctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccacc 60

L S C R A S Q S V S S Y L A W Y Q Q K P  
ctctcctgcagggccagtcagagtgtagcagctacttagcctggtaccaacagaaacct 120

G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A  
ggccaggctcccaggctcctcatctatgatgcatccaacagggccactggcatcccagcc 180

R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P  
aggttcagtggtgagtggtctgggacagacttcaactctcaccatcagcagcctagagcct 240

E D F A V Y Y C H Q R S S W P P I F T F  
gaagatthtgcgggtttattactgtcatcagcgttagcagctggccccgatattcactttc 300

G P G T (SEQ ID NO :37)  
ggccctgggacc 312 (SEQ ID NO :38)

5

Secuencia completa de la cadena ligera del anticuerpo IgG1 que incorpora la región variable del anticuerpo 01951/G12 (en negrita)

La secuencia de aminoácidos de LC se muestra en la SEQ ID NO: 39 y está codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 40

ES 2 642 487 T3

```

1   M S V L T Q V L A L L L L W L T G
   ATGAGTGTGC TCACTCAGGT CCTGGCGTTG CTGCTGCTGT GGCTTACAGG

51  T R C E I V L T Q S P A T L S L S
   TACGCGTTGT GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGCCACC CTGTCTTTGT

101 P G E R A I L S C R A G Q S V S
   CTCCAGGGGA AAGAGCCATC CTCTCCTGCA GGGCCGGTCA GAGTGTTAGC

151 S Y L V W Y Q Q K P G Q A P R L L
   AGTTACTTAG TCTGGTACCA ACAGAAACCT GGCCAGGCTC CCAGGCTCCT

201 I Y D A S N R A T G I P A R F S G
   CATCTATGAT GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCAGCC AGGTTTAGTG

251 S G S G T D F T L T I S S L E P
   GCAGTGGGTC TGGGACAGAC TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGCCT

301 E D F A V Y Y C Q Q R S S W P P V
   GAAGATTTTG CAGTTTATTA CTGTCAGCAG CGCAGCAGCT GGCCTCCGGT

351 Y T F G Q G T K L E I K R T V A A
   GTACACTTTT GGCCAGGGGA CCAAGCTTGA AATCAAACGA ACTGTGGCTG

401 P S V F I F P P S D E Q L K S G
   CACCATCTGT CTTTCATCTT CCGCCATCTG ATGAGCAGTT GAAATCTGGA

451 T A S V V C L L N N F Y P R E A K
   ACTGCCTCTG TTGTGTGCCT GCTGAATAAC TTCTATCCCA GAGAGGCCAA

501 V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S
   AGTACAGTGG AAGGTGGATA ACGCCCTCCA ATCGGGTAAC TCCCAGGAGA

551 V T E Q D S K D S T Y S L S S T
   GTGTCACAGA GCAGGACAGC AAGGACAGCA CCTACAGCCT CAGCAGCACC

601 L T L S K A D Y E K H K V Y A C E
   CTGACGCTGA GCAAAGCAGA CTACGAGAAA CACAAAGTCT ACGCCTGCGA

651 V T H Q G L S S P V T K S F N R G
   AGTCACCCAT CAGGGCCTGA GCTCGCCCGT CACAAAGAGC TTCAACAGGG

701 E C * (SEQ ID NO:39)
   GAGAGTGTTA G (SEQ ID NO:40)

```

Secuencia completa de la cadena pesada del anticuerpo IgG1 que incorpora la región variable del anticuerpo 01951/G12 (en negrita)

5 La secuencia de aminoácidos de HC se muestra en la SEQ ID NO: 41 y está codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 42

ES 2 642 487 T3

1 M A W V W T L P F L M A A A Q S V  
 ATGGCTTGGG TGTGGACCTT GCCATTCCCTG ATGGCAGCTG CCCAAAGTGT  
 51 Q A E V Q L V E S G G G V V Q P G  
 CCAGGCAGAA GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCGTG GTCCAGCCTG  
 101 R S L R L S C A A S G F T F S S  
 GGAGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCGT CTGGATTCAC CTCAGTAGC  
 151 Y G M H W V R Q A P G K G L E W V  
 TATGGCATGC ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGCAAGGGGC TGGAGTGGGT  
 201 A I I W Y D G S N K Y Y A D S V K  
 GGCAATTATA TGGTATGATG GAAGTAATAA ATACTATGCG GACTCCGTGA  
 251 G R F T I S R D N S K N T L Y L  
 AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATT CCAAGAACAC GCTGTATCTG  
 301 Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R  
 CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAG  
 351 L W F G D L D A F D I W G Q G T M  
 GCTATGGTTC GGGGACTTAG ATGCTTTTGA TATCTGGGGC CAAGGGACAA  
 401 V T V S S A S T K G P S V F P L  
 TGGTCACCGT CTCTCAGCC TCCACCAAGG GCCCATCGGT CTCCCCCTG  
 451 A P S S K S T S G G T A A L G C L  
 GCACCCTCCT CCAAGAGCAC CTCTGGGGGC ACAGCGGCC TGGGCTGCCT  
 501 V K D Y F P E P V T V S W N S G A  
 GGTCAAGGAC TACTTCCCG AACCGGTGAC GGTGTCGTGG AACTCAGCG  
 551 L T S G V H T F P A V L Q S S G  
 CCCTGACCAG CGGCGTGCAC ACCTTCCCG CTGTCTACA GTCTCAGGA  
 601 L Y S L S S V V T V P S S S L G T  
 CTCTACTCCC TCAGCAGCGT CGTGACCGTG CCCTCCAGCA GCTTGGGCAC  
 651 Q T Y I C N V N H K P S N T K V D  
 CCAGACCTAC ATCTGCAACG TGAATCACAA GCCCAGCAAC ACCAAGGTGG  
 701 K R V E P K S C D K T H T C P P  
 ACAAGAGAGT TGAGCCCAA TCTTGTGACA AAACCTCACAC ATGCCACCG  
 751 C P A P E L L G G P S V F L F P P  
 TGCCCAGCAC CTGAACTCCT GGGGGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCC  
 801 K P K D T L M I S R T P E V T C V  
 AAAACCCAAG GACACCCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCACATCG  
 851 V V D V S H E D P E V K F N W Y  
 TGGTGGTGGG CGTGAGCCAC GAAGACCCTG AGGTCAAGTT CAACTGGTAC

ES 2 642 487 T3

```

901   V D G V   E V H   N A K   T K P R   E E Q
      GTGGACGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG ACAAAGCCGC GGGAGGAGCA

951   Y N S   T Y R V   V S V   L T V   L H Q D
      GTACAACAGC ACGTACCGTG TGGTCAGCGT CCTCACCGTC CTGCACCAGG

1001  W L N   G K E   Y K C K   V S N   K A L
      ACTGGCTGAA TGGCAAGGAG TACAAGTGCA AGGTCTCCAA CAAAGCCCTC

1051  P A P I   E K T   I S K   A K G Q   P R E
      CCAGCCCCCA TCGAGAAAAC CATCTCCAAA GCCAAAGGGC AGCCCCGAGA

1101  P Q V   Y T L P   P S R   E E M   T K N Q
      ACCACAGGTG TACACCCTGC CCCCATCCCG GGAGGAGATG ACCAAGAACC

1151  V S L   T C L   V K G F   Y P S   D I A
      AGGTCAGCCT GACCTGCCTG GTCAAAGGCT TCTATCCAG CGACATCGCC

1201  V E W E   S N G   Q P E   N N Y K   T T P
      GTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG AACAACTACA AGACCACGCC

1251  P V L   D S D G   S F F   L Y S   K L T V
      TCCCGTGCTG GACTCCGACG GCTCCTTCTT CCTCTATAGC AAGCTCACCG

1301  D K S   R W Q   Q G N V   F S C   S V M
      TGGACAAGAG CAGGTGGCAG CAGGGGAACG TCTTTCATG CTCCGTGATG

1351  H E A L   H N H   Y T Q   K S L S   L S P
      CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACGCAG AAGAGCCTCT CCCTGTCCCC

1401  G K * (SEQ ID NO:41)
      GGGTAAATGA (SEQ ID NO:42)

```

Listado de secuencias

- <110> Novartis AG Campbell, Emma Parveen, Sofia Buechler, Joe Valkirs, Gunars
- <120> Anticuerpos anti-I1,13
- 5 <130> 34582
- <140> PCT/EP/2006/010098
- <141> 2006-10-19
- <150> GB 0521509.0
- <151> 2005-10-21
- 10 <160> 42
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 8
- <212> PRT
- 15 <213> Homo sapiens
- <400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly  
 1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 2

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly  
1 5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 3

Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn  
1 5

<210> 4

<211> 8

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Val Lys Gly Ser Gly Asp Ile Pro  
1 5

<210> 5

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ala Arg Leu Trp Phe Gly Asp Leu Asp  
1 5

25 <210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Asn Tyr Gly Met His  
1 5

30

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Ser Tyr Gly Met His  
1 5

<210> 8

5 <211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

Gly

10 <210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

15 Gly Ser Gly Asp Ile Pro Phe Asp Tyr  
1 5

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 10

Leu Trp Phe Gly Asp Leu Asp Ala Phe Asp Ile  
1 5 10

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<400> 11

Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
1 5

<210> 12

<211> 2

30 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Asp Ala  
1

<210> 13

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

His Gln Arg Ser His Trp Pro Pro Ile  
1 5

<210> 14

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Gln Gln Arg Ser Ser Trp Pro Pro Val  
1 5

15 <210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

His Gln Arg Ser Ser Trp Pro Pro Ile  
1 5

20 <210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 16

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala  
1 5 10

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<400> 17

Arg Ala Gly Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Val  
1 5 10

<210> 18  
 <400> 18  
 000  
 <210> 19  
 5 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 19  
  
                   Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr  
                   1                                  5  
 10 <210> 20  
       <211> 11  
       <212> PRT  
       <213> Homo sapiens  
       <400> 20  
  
                   His Gln Arg Ser His Trp Pro Pro Ile Phe Thr  
 15                  1                                  5                                  10  
       <210> 21  
       <211> 11  
       <212> PRT  
       <213> Homo sapiens  
 20 <400> 21  
  
                   Gln Gln Arg Ser Ser Trp Pro Pro Val Tyr Thr  
                   1                                  5                                  10  
       <210> 22  
       <211> 11  
       <212> PRT  
 25 <213> Homo sapiens  
       <400> 22  
  
                   His Gln Arg Ser Ser Trp Pro Pro Ile Phe Thr  
                   1                                  5                                  10  
       <210> 23  
       <211> 115  
 30 <212> PRT  
       <213> Homo sapiens  
       <400> 23

ES 2 642 487 T3

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

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

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

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

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

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

Val Lys Gly Ser Gly Asp Ile Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr  
 115

<210> 24

<211> 345

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(345)

<400> 24

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

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

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

10 gca att ata tgg tat gat gga agt aat aaa tac tat gca gac tcc gtg 192

ES 2 642 487 T3

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

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

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

gtg aaa gga tct ggg gat att ccc ttt gac tac tgg ggc cag gga acc 336  
 Val Lys Gly Ser Gly Asp Ile Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

ctg gtc acc 345  
 Leu Val Thr  
 115

<210> 25

<211> 104

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 25

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

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

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

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

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

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

Ile Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr  
 100

<210> 26

<211> 312

10 <212> ADN

ES 2 642 487 T3

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(312)

5 <400> 26

```

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

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

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

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

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

gaa gat ttt gca gtc tat tac tgt cat cag cgt agc cac tgg cct ccc      288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser His Trp Pro Pro
                               85                               90                               95

ata ttc act ttc ggc cct ggg acc      312
Ile Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr
                               100

```

<210> 27

<211> 115

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 27



ES 2 642 487 T3

gaa gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg 48  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
  
 tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc acc ttc agt aac tat 96  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
  
 ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg 144  
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
  
 gca att ata tgg tat gat gga agt aat aaa tac tat gca gac tcc gtg 192  
 Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
  
 aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
  
 ctg caa atg aac agt ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
  
 gtg aaa gga tct ggg gat att ccc ttt gac tac tgg ggc cag gga acc 336  
 Val Lys Gly Ser Gly Asp Ile Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
  
 ctg gtc acc 345  
 Leu Val Thr  
 115

<210> 29

<211> 104

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 29

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Ser Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45

ES 2 642 487 T3

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

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

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

Ile Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr  
 100

<210> 30

<211> 312

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(312)

<400> 30

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

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

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

tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc acc cca gcc agg ttc agt ggc 192  
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

gaa gat ttt gca gtc tat tac tgt cat cag cgt agc cac tgg cct ccc 288  
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser His Trp Pro Pro  
 85 90 95

ata ttc act ttc ggc cct ggg acc 312  
 Ile Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr  
 100

10

<210> 31

<211> 117

<212> PRT

ES 2 642 487 T3

<213> Homo sapiens

<400> 31

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Leu Trp Phe Gly Asp Leu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Met Val Thr  
 115

<210> 32

5 <211> 351

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(351)

<400> 32

ES 2 642 487 T3

gaa	gtg	cag	ctg	gtg	gag	tct	ggg	gga	ggc	gtg	gtc	cag	cct	ggg	agg	48
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	
1				5					10					15		
tcc	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gca	gcg	tct	gga	ttc	acc	ttc	agt	agc	tat	96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
			20					25					30			
ggc	atg	cac	tgg	gtc	cgc	cag	gct	cca	ggc	aag	ggg	ctg	gag	tgg	gtg	144
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				
gca	att	ata	tgg	tat	gat	gga	agt	aat	aaa	tac	tat	gcg	gac	tcc	gtg	192
Ala	Ile	Ile	Trp	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
	50					55						60				
aag	ggc	cga	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	aat	tcc	aag	aac	acg	ctg	tat	240
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
65					70					75				80		
ctg	caa	atg	aac	agc	ctg	aga	gcc	gag	gac	acg	gct	gtg	tat	tac	tgt	288
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
			85						90					95		
gcg	agg	cta	tgg	ttc	ggg	gac	tta	gat	gct	ttt	gat	atc	tgg	ggc	caa	336
Ala	Arg	Leu	Trp	Phe	Gly	Asp	Leu	Asp	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	
			100					105					110			
ggg	aca	atg	gtc	acc												351
Gly	Thr	Met	Val	Thr												
			115													

<210> 33

<211> 104

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

ES 2 642 487 T3

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

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

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

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

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

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

Val Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr  
 100

<210> 34

<211> 312

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(312)

<400> 34

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

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

10

ES 2 642 487 T3

tta gtc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144  
 Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45  
  
 tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192  
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
  
 agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 65 70 75 80  
  
 gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgc agc agc tgg cct ccg 288  
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Trp Pro Pro  
 85 90 95  
  
 gtg tac act ttt ggc cag ggg acc 312  
 Val Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr  
 100

<210> 35

<211> 117

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 35

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

<210> 36

<211> 351

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

5 <221> CDS

<222> (1)..(351)

<400> 36

cag	gtg	cag	ctg	gtg	cag	tct	ggg	gga	ggc	gtg	gtc	cag	cct	ggg	agg	48
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	
1				5					10					15		
tcc	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gcg	gcg	tct	gga	ttc	acc	ttc	agt	agc	tat	96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
			20					25						30		
ggc	atg	cac	tgg	gtc	cgc	cag	gct	cca	ggc	aag	ggg	ctg	gag	tgg	gtg	144
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40						45			
gca	att	ata	tgg	tat	gat	gga	agt	aat	aaa	tac	tat	gcg	gac	tcc	gtg	192
Ala	Ile	Ile	Trp	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
	50					55					60					
aag	ggc	cga	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	aat	tcc	aag	aac	acg	cta	tat	240
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
65					70					75				80		
cta	caa	atg	aac	agc	ctg	aga	gcc	gag	gac	acg	gct	gtg	tat	tac	tgt	288
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
gcg	agg	cta	tgg	ttc	ggg	gac	tta	gat	gct	ttt	gat	atc	tgg	ggc	caa	336
Ala	Arg	Leu	Trp	Phe	Gly	Asp	Leu	Asp	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	
			100					105						110		
ggg	aca	atg	gtc	acc												351
Gly	Thr	Met	Val	Thr												
			115													

<210> 37

10 <211> 104

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

ES 2 642 487 T3

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

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

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

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

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

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

Ile Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr  
 100

<210> 38

<211> 312

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(312)

10 <400> 38

ES 2 642 487 T3

```

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

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

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

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

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

gaa gat ttt gcg gtt tat tac tgt cat cag cgt agc agc tgg ccc ccg      288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Ser Trp Pro Pro
           85           90           95

ata ttc act ttc ggc cct ggg acc      312
Ile Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr
           100

```

<210> 39

<211> 236

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 39

```

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1           5           10           15

Gly Thr Arg Cys Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser

```



<211> 711

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

5 <221> CDS

<222> (1)..(711)

<400> 40

ES 2 642 487 T3

atg agt gtg ctc act cag gtc ctg gcg ttg ctg ctg ctg tgg ctt aca	48
Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr	
1 5 10 15	
ggt acg cgt tgt gaa att gtg ttg acg cag tct cca gcc acc ctg tct	96
Gly Thr Arg Cys Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser	
20 25 30	
ttg tct cca ggg gaa aga gcc atc ctc tcc tgc agg gcc ggt cag agt	144
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Ile Leu Ser Cys Arg Ala Gly Gln Ser	
35 40 45	
gtt agc agt tac tta gtc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc	192
Val Ser Ser Tyr Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro	
50 55 60	
agg ctc ctc atc tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc	240
Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala	
65 70 75 80	
agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc	288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser	
85 90 95	
agc cta gag cct gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgc agc	336
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser	
100 105 110	
agc tgg cct ccg gtg tac act ttt ggc cag ggg acc aag ctt gaa atc	384
Ser Trp Pro Pro Val Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile	
115 120 125	
aaa cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat	432
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp	
130 135 140	
gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac	480
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Val Cys Leu Leu Asn Asn	
145 150 155 160	
ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc	528
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu	
165 170 175	
caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac	576
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp	
180 185 190	
agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac	624
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr	
195 200 205	
gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc	672
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser	
210 215 220	
tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag	711
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
225 230 235	

<210> 41

<211> 469

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

ES 2 642 487 T3

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

Val Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln  
 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 35 40 45

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala  
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Trp Phe Gly Asp Leu Asp Ala Phe Asp Ile  
 115 120 125

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

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 Arg Val Glu Pro Lys  
 225 230 235 240

ES 2 642 487 T3

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 245 250 255

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

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 275 280 285

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 290 295 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
 305 310 315 320

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 325 330 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 340 345 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 355 360 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
 370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys  
 465

<210> 42

<211> 1410

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1410)

<400> 42

ES 2 642 487 T3

atg gct tgg gtg tgg acc ttg cca ttc ctg atg gca gct gcc caa agt	48
Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser	
1 5 10 15	
gtc cag gca gaa gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag	96
Val Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln	
20 25 30	
cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc acc ttc	144
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe	
35 40 45	
agt agc tat ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg	192
Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu	
50 55 60	
gag tgg gtg gca att ata tgg tat gat gga agt aat aaa tac tat gcg	240
Glu Trp Val Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala	
65 70 75 80	
gac tcc gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac	288
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn	
85 90 95	
acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg	336
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val	
100 105 110	
tat tac tgt gcg agg cta tgg ttc ggg gac tta gat gct ttt gat atc	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Trp Phe Gly Asp Leu Asp Ala Phe Asp Ile	
115 120 125	
tgg ggc caa ggg aca atg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc acc aag ggc	432
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly	
130 135 140	
cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc	480
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly	
145 150 155 160	
aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg	528
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val	
165 170 175	
acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc	576
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Ser Gly Val His Thr Phe	
180 185 190	
ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtc gtg	624
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val	
195 200 205	
acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg	672
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val	
210 215 220	
aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag ccc aaa	720
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys	
225 230 235 240	

ES 2 642 487 T3

tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc	768
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu	
245 250 255	
ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc	816
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr	
260 265 270	
ctc atg atc tcc ccg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg	864
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val	
275 280 285	
agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg	912
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val	
290 295 300	
gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg ccg gag gag cag tac aac agc	960
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser	
305 310 315 320	
acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg	1008
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu	
325 330 335	
aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc	1056
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala	
340 345 350	
ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca	1104
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro	
355 360 365	
cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc ccg gag gag atg acc aag aac cag	1152
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln	
370 375 380	
gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc	1200
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala	
385 390 395 400	
gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg	1248
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr	
405 410 415	
cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc	1296
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu	
420 425 430	
acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc	1344
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser	
435 440 445	
gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc	1392
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser	
450 455 460	
ctg tcc ccg ggt aaa tga	1410
Leu Ser Pro Gly Lys	
465	

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo IL13 humano aislado que comprende una región de unión al antígeno en la que las regiones H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 y L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 representadas en una secuencia de aminoácidos conjuntamente son:
- 5 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, y  
SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21.
2. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una región variable de HC de acuerdo con la SEQ ID NO: 31 y una región variable de LC de acuerdo con la SEQ ID NO: 33.
- 10 3. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la secuencia de aminoácidos de HC es la SEQ ID NO: 41 y la secuencia de aminoácidos de LC es la SEQ ID NO: 39.
4. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que es una IgG1 o una IgG4.
5. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento funcional del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable para la misma.
6. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en el tratamiento del asma.

15