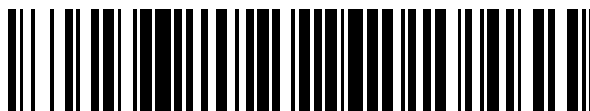


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 239**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2007 E 14175846 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2829551**

54 Título: **Antagonistas de anticuerpos de alta afinidad del receptor α_1 de interleucina-13**

30 Prioridad:

19.10.2006 US 852884 P

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

08.03.2018

73 Titular/es:

**CSL LIMITED (100.0%)
45 Poplar Road
Parkville, Victoria 3052, AU**

72 Inventor/es:

**NASH, ANDREW DONALD;
BACA, MANUEL;
FABRI, LOUIS JERRY;
ZALLER, DENNIS;
STROHL, WILLIAM R. y
AN, ZHIQIANG**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 658 239 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).

Antagonistas de anticuerpos de alta afinidad del receptor $\alpha 1$ de interleucina-13**Descripción****5 Introducción**

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente Provisional U.S. Nº de Serie 60/852.884, presentada el 19 de Octubre del 2006.

10 Antecedentes de la invención

Los datos de estudios humanos y modelos animales experimentales implican fuertemente citocinas derivadas de Th2 como contribuyentes a asma atópica, desempeñando la interleucina-4 (IL-4) e interleucina-13 (IL-13; véase, por ejemplo, Minty y col., 1993 Nature 362:248-250; McKenzie y col., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3735-3739; Acc. Nos: U31120 y L13029 (human) y NM_001032929 (*Macaca mulatta*)) la función más importante. Estas dos citocinas tienen similitudes estructurales significativas y comparten ciertos componentes de receptor. El receptor que comparte IL-4 y IL-13 es un receptor dual de IL-4R/IL-13 (o receptor tipo II) que se une tanto a IL-4 como a IL-13. Este receptor está compuesto por la cadena de IL-4R α (véase, por ejemplo, Idzerda y col., 1990 J. Exp. Med. 171:861-873) y la cadena de IL-13R $\alpha 1$ (véase, por ejemplo, Hilton y col., 1996 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:497-501; Aman y col., 1996 J. Biol. Chem. 271:29265-29270; Miloux y col., 1997 FEBS Lett. 401:163-166; Acc. Nos: U62858 y CAA70508 (humano) y AAP78901 (*Macaca fascicularis*)). El receptor dual de IL-4R/IL-13R se expresa en células hematopoyéticas y no hematopoyéticas, que incluyen células epiteliales pulmonares y de músculo liso. Tanto IL-4 como IL-13, adicionalmente, tienen cada uno un receptor que los reconoce para la exclusión del otro. Por ejemplo, el receptor de IL-4 (IL-4R) tipo I, compuesto por la cadena de IL-4R α y la cadena gamma común (γc), se une específicamente a IL-4. El IL-4R tipo I se expresa exclusivamente en células de origen hematopoyético. El receptor específico para IL-13, IL-13R $\alpha 2$, se une a IL-13 con alta afinidad, pero aparentemente no transduce señales. Más bien, el receptor actúa de señuelo para atenuar la respuesta a IL-13.

IL-13 y IL-4 realizan varias funciones y ambos regulan varias funciones relacionadas con el fenotipo alérgico, tales como conmutación de clase de isotipo a IgE en linfocitos B, activación de mastocitos y eosinófilos, regulación por incremento de moléculas de adhesión a células vasculares-1 (VCAM-1) en células endoteliales y producción de quimiocinas tales como eotaxinas, quimiocina regulada por el timo y por activación (TARC) y quimiocina derivada de macrófagos (MDC).

IL-4 y IL-13, sin embargo, tienen muchas funciones distintas *in vitro* e *in vivo* debido a diferencias en sus complejos de receptor. Por ejemplo, se ha mostrado que el secuestro de IL-13, pero no IL-4, previene la hiperreactividad de las vías respiratorias y reduce la producción de moco en modelos de asma de ratón. Esta correlación entre IL-13 y la respuesta asmática se ha soportado adicionalmente por otros estudios; véase, por ejemplo, Hershey y col., 2003 J. Allergy Clin. Immunol. 111(4):677-690; Grunig y col., 1998 Science 282 (5397):2261-2263; Mattes y col., 2001 J. Immunol. 167(3):1683-1692; y Fulkerson y col., 2006 Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 35(3):337-346. Se ha encontrado que la administración de IL-13 al pulmón, por ejemplo, es suficiente para inducir el fenotipo similar a asma entero en ratones. Animales tratados desarrollan hiperreactividad de las vías respiratorias, inflamación de células ricas en eosinófilos, hiperplasia de células caliciformes con producción en exceso de moco asociada, y fibrosis subepitelial; véase, por ejemplo, Wills-Karp y col., 1998 Science 282(5397): 2258-2261; Reiman y col., 2006 Infect. Immun. 74(3): 1471-1479; y Kaviratne y col., 2004 J. Immunol. 173(6):4020-4029. Además, se ha informado que la expresión de IL-13 es elevada en los pulmones de asmáticos humanos. Además, varios grupos han informado de asociaciones de polimorfismos en el gen IL-13 con un aumento del riesgo de rasgos alérgicos y síntomas de asma. Se ha mostrado que algunos de estos polimorfismos se correlacionan con el aumento de la expresión de IL-13; véase, por ejemplo, Huang y col., 1995 J. Immunol. 155(5):2688-2694; Naseer y col., 1997 Am. J. Respir. Crit. Care Med. 155(3):845-851; Vladich y col., 2005 J. Clin. Invest. 115(3):747-754; Chen y col., 2004 J. Allergy Clin. Immunol. 114(3):553-560; y Vercelli y col., 2002 Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 2(5):389-393.

La IL-13 también se ha asociado a diversas otras afecciones, que incluyen, pero no se limitan a, diversos trastornos respiratorios y mediados por alergia, fibrosis, esclerodermia, enfermedad inflamatoria del intestino y ciertos cánceres; véase, por ejemplo, Wynn, T.A., 2003 Annu. Rev. Immunol. 21:425-456; Terabe y col., 2000 Nat. Immunol. 1(6):515-520; Fuss y col., 2004 J. Clin. Invest. 113(10):1490-1497; Simms y col., 2002 Curr. Opin. Rheumatol. 14(6):717-722; y Hasegawa y col., 1997 J. Rheumatol. 24(2):328-332.

Un antagonista de IL-13 sería, por tanto, una molécula altamente atractiva para su uso en el desarrollo de un tratamiento para trastornos asociados a IL-13. Un antagonista de anticuerpo eficaz interferiría con la unión de IL-13 a IL-13R. Un antagonista de anticuerpo eficaz para IL-13R $\alpha 1$ puede también interferir con la unión de IL-13 y prevenir la heterodimerización de IL-4R α y IL-13R $\alpha 1$. Un anticuerpo tal podría inhibir la señalización de tanto IL-13 como IL-4 mediante el receptor tipo II, mientras que se ahorra la señalización de IL-4 mediante el receptor de tipo I. La señalización mediante el receptor de tipo I es esencial en la fase de inducción de la respuesta inmunitaria durante la cual se diferencian las células Th2. Los linfocitos T no expresan IL-13R $\alpha 1$, así el receptor de tipo II no desempeña

función en la diferenciación de Th2. Por tanto, un anticuerpo para IL-13R α 1 no debe afectar el equilibrio global de Th1/Th2. La señalización mediante el receptor de IL-4/IL-13 tipo II es crítica durante la etapa efectora de la respuesta inmunitaria durante la inflamación alérgica establecida. Así, el bloqueo del receptor de tipo II debe tener un efecto beneficioso sobre muchos de los síntomas de asma y otras afecciones mediadas por IL-13R y, por tanto, debe ser un agente modificador de la enfermedad eficaz.

En la materia se han descrito anticuerpos contra IL-13R α 1 (tanto monoclonales como policlonales); véanse, por ejemplo, los documentos EP1449851; WO 97/15663, WO 03/80675; WO 03/46009; WO 06/072564; Gauchat y col., 1998 Eur. J. Immunol. 28:4286-4298; Gauchat y col., 2000 Eur. J. Immunol. 30:3157-3164; Clement y col., 1997 Cytokine 9(11):959 (Resumen de la reunión); Ogata y col., 1998 J. Biol. Chem. 273:9864-9871; Graber y col., 1998 Eur. J. Immunol. 28:4286-4298; C. Vermot-Desroches y col., 2000 Tissue Antigens 5(Supp. 1):52-53 (Resumen de la reunión); Poudrier y col., 2000 Eur. J. Immunol. 30:3157-3164; Akaiwa y col., 2001 Cytokine 13:75-84; Cancino-Diaz y col., 2002 J. Invest. Dermatol. 119:1114-1120; Krause y col., 2006 Mol. Immunol. 43:1799-1807; y GM-1E7 (Krause y col., 2006).

Existe la necesidad de un anticuerpo con actividad biológica potenciada que pueda afectar las actividades asociadas a la alergia y respuesta asmática, además de otras diversas afecciones que se han atribuido al menos en parte a una expresión/funcionamiento elevados de IL-13R α 1. Hay además una necesidad para una molécula de anticuerpo con alta afinidad para IL-13R α 1 con baja inmunogenicidad en seres humanos. Por consiguiente, sería de gran importancia producir un antagonista de anticuerpo humano terapéutico de IL-13R α 1 que inhiba o antagonice con la actividad de IL-13R α 1 y el papel correspondiente que desempeña IL-13R α 1 en diversas afecciones terapéuticas.

Sumario de la invención

El anticuerpo de la invención se define en la reivindicación 1. Divulgamos antagonistas de anticuerpos de alta afinidad de IL-13R α 1 y particularmente IL-13R α 1 humano.

Se desvelan moléculas de anticuerpo que reconocen selectivamente IL-13R α 1, particularmente IL-13R α 1 humano, que presentan unión a IL-13R α 1 humano con una K_D de 5×10^{-9} o menos, más preferentemente 2×10^{-9} o menos, e incluso más preferentemente, 1×10^{-9} o menos. Las moléculas de anticuerpo específicas según la presente invención se unen adicionalmente a IL-13R α 1 de primate con alta afinidad, una calidad deseable dada la accesibilidad de modelos no humanos de primate a predecir los perfiles de eficacia y seguridad en seres humanos. Las moléculas de anticuerpo según la presente invención son eficaces en la inhibición de actividades mediadas por IL-13R α 1 y, así, son de importancia en el tratamiento de afecciones asociadas con las mismas, que incluyen, pero no se limitan a, asma, alergia, rinitis alérgica, sinusitis crónica, fiebre del heno, dermatitis atópica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica ("EPOC"), fibrosis pulmonar, eosinofilia esofágica, esclerodermia, psoriasis, artritis psoriásica, fibrosis, enfermedad inflamatoria del intestino (particularmente, colitis ulcerosa), anafilaxia y cáncer (particularmente, linfoma de Hodgkin, glioma y carcinoma renal) y trastornos/afecciones mediados por Th2 generales. Los anticuerpos específicos para IL-13R α 1 también tienen utilidad para diversos fines de diagnóstico en la detección y cuantificación de IL-13R α 1.

La presente invención proporciona, en un aspecto particular, el anticuerpo aislado, 10G5, que antagoniza muy eficazmente el funcionamiento de IL-13 mediante IL-13R α 1. 10G5 presenta la inhibición de la liberación de eotaxina inducida por IL-13 y IL-4 en células NHDF, fosforilación de STAT6 inducida por IL-13 y IL-4 en células NHDF y liberación estimulada por IL-13 de TARC en sangre o células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Así, la presente invención engloba anticuerpos como se producen por la línea celular de hibridoma depositada como depósito de ATCC nº PTA-6933. También en el presente documento se divulgan anticuerpos que compiten para unirse a hIL-13R α 1 con un anticuerpo de PTA-6933. Aspectos particulares de la presente divulgación incluyen moléculas de anticuerpo que incluyen secuencias de la región variable de la cadena pesada y/o ligera de 10G5, además de equivalentes (caracterizados por tener una o más sustituciones de aminoácidos conservativas) u homólogos de los mismos. Aspectos particulares engloban moléculas de anticuerpo aisladas que tienen los dominios de CDR divulgados en el presente documento o conjuntos de dominios de CDR de la cadena pesada y/o ligera desvelados en el presente documento, o equivalentes de los mismos, caracterizados por tener una o más sustituciones de aminoácidos conservativas. Específicamente, las moléculas de anticuerpo de la divulgación tienen una región variable de la cadena pesada con secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 como se expone en SEC ID Nº: 82, SEC ID Nº: 83 y SEC ID Nº: 121, respectivamente; y una región variable de la cadena ligera con secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 como se expone en SEC ID Nº: 84, SEC ID Nº: 85 y SEC ID Nº: 122. Más particularmente, las moléculas de anticuerpo de la divulgación tienen una región variable de la cadena pesada con una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID Nº: 45, SEC ID Nº: 51, SEC ID Nº: 55, SEC ID Nº: 59, SEC ID Nº: 63 o SEC ID Nº: 67; una región variable de la cadena ligera con una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID Nº: 49, SEC ID Nº: 71, SEC ID Nº: 75 o SEC ID Nº: 79; o una combinación de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera anteriormente citadas.

Como será apreciado por aquellos expertos en la materia, los fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad para unirse a hIL-13R α 1 pueden insertarse en diversas regiones estructurales, véase, por ejemplo, la

patente de EE.UU. n° 6.818.418, y referencias contenidas en su interior, que tratan diversos andamiajes que pueden usarse para expresar bucles de anticuerpos previamente seleccionados basándose en la unión al antígeno. Además, pueden unirse genes que codifican V_L y V_H usando procedimientos recombinantes, por ejemplo, usando un ligador sintético que les permite prepararse como una única cadena de proteína en la que el par de regiones V_L y V_H forman moléculas monovalentes, de otro modo conocidas como Fv monocatenario (scFv); véase, por ejemplo, Bird y col., 1988 Science 242: 423-426, y Huston y col., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883.

En otro aspecto, la presente invención proporciona ácido nucleico que codifica el anticuerpo de la invención. La presente divulgación también proporciona ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesadas y ligeras variables y componentes seleccionados de las mismas, particularmente las regiones CDR3 respectivas divulgadas. En otro aspecto, la presente invención proporciona vectores que incluyen un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención. En otro aspecto, la presente invención proporciona célula(s) aislada(s) que aloja(n) ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención. En otro aspecto, la presente invención proporciona célula(s) aislada(s) que comprende(n) un anticuerpo o vector de la presente invención.

En otro aspecto, en el presente documento se desvela un procedimiento para hacer una molécula de anticuerpo que se une selectivamente a IL-13R α 1 (incluidos anticuerpos, fragmentos de unión al antígeno, derivados, moléculas quiméricas, fusiones de cualquiera de los anteriores con otro polipéptido, o estructuras/composiciones alternativas que incorporan cualquiera de los anteriores) de la presente divulgación, que incluye incubar una célula que aloja ácido nucleico que codifica una cadena pesada y/o ligera (dependiendo de la molécula de anticuerpo que se produzca) en condiciones que permiten la expresión y/o ensamblaje de dichas cadenas pesadas y/o ligeras en la molécula de anticuerpo, y aislar dicha molécula de anticuerpo de la célula. Un experto en la materia pueden obtener las moléculas de anticuerpo desveladas en el presente documento usando técnicas de ADN recombinante convencionales.

En otro aspecto, en el presente documento se divulga un procedimiento de antagonización de la actividad o función de IL-13R α 1, sea señalización u otra, que incluye poner en contacto una célula que expresa IL-13R α 1 con una molécula de anticuerpo desvelada en el presente documento en condiciones que permiten que dicha molécula de anticuerpo se una a IL-13R α 1. Aspectos específicos de la presente divulgación incluyen procedimientos tales en los que la célula es una célula humana. Las moléculas de anticuerpo según la presente invención son eficaces en la inhibición de actividades mediadas por IL-13R α 1. Se encontró que las moléculas de anticuerpo según la presente invención inhibían eficazmente la liberación de eotaxina de células de fibroblastos dérmicos humanos normales (en lo sucesivo células "NHDF"). Se encontró que las moléculas de anticuerpo según la presente invención inhibían eficazmente la fosforilación de STAT6 estimulada por IL-13 y IL-4 en células NHDF y se encontró que inhibían eficazmente la liberación estimulada por IL-13 de TARC (CCL17) en sangre completa (humana/ rhesus).

En otro aspecto, en el presente documento se divulga un procedimiento de antagonización de la actividad de IL-13R α 1 en un sujeto que presenta una afección asociada a actividad de IL-13R α 1 (o una afección en la que el funcionamiento de IL-13R α 1 no se considera beneficioso para el sujeto particular), que implica administrar al sujeto una cantidad terapéutica y eficaz de una molécula de anticuerpo de la presente divulgación. En aspectos seleccionados, la afección puede ser asma, alergia, rinitis alérgica, sinusitis crónica, fiebre del heno, dermatitis atópica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica ("EPOC"), fibrosis pulmonar, eosinofilia esofágica, psoriasis, artritis psoriásica, fibrosis, esclerodermia, enfermedad inflamatoria del intestino (particularmente, colitis ulcerosa), anafilaxia y cáncer (particularmente, linfoma de Hodgkin, glioma y carcinoma renal) y trastornos/afecciones mediados por Th2 generales. En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica u otra composición que incluye una molécula de anticuerpo de la invención (o estructura de unión al antígeno alternativa o proteína que comprende una porción de unión al antígeno específica de IL-13R α 1 desvelada en el presente documento) y un vehículo farmacéuticamente aceptable, excipiente, diluyente, estabilizador, tampón o alternativa diseñada para facilitar la administración de la molécula de anticuerpo en la cantidad deseada al individuo tratado.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la identificación de un punto de contacto crítico entre los anticuerpos desvelados en el presente documento y hIL-13R α . Este punto de contacto crítico se identificó por la generación de una mutación específica que afectó la unión del receptor por el anticuerpo. Más específicamente, se encontró que la sustitución del residuo de fenilalanina en la posición 233 de SEC ID N°: 101 con un residuo de alanina produce una pérdida de la unión entre el anticuerpo y el receptor. Esto es un hallazgo muy útil en la caracterización de 10G5 y sus derivados. Los péptidos que explotan la estrecha región que rodea el aminoácido 233 serán útiles en la generación de anticuerpos monoclonales adicionales con especificidad similar. Por consiguiente, en el presente documento se divulgan péptidos aislados que incluyen la secuencia de hIL-13R con una mutación Phe233Ala, tanto si son de longitud completa como de fragmentos de la misma que incluyen la mutación. Adicionalmente, en el presente documento también se divulga el uso de dichos péptidos en un ensayo para evaluar 10G5 o derivados de 10G5, identificar anticuerpos con especificidad por un epítipo similar o, alternativamente, producir anticuerpos con especificidad similar.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado que (i) compite con el anticuerpo producido

por la línea celular de hibridoma depositada como el depósito de ATCC N° PTA-6933 para unir con hIL-13R α 1; (ii) inhibe la señalización de IL-13; y (iii) en donde una sustitución en el péptido de hIL-13R α 1 del residuo de fenilalanina que corresponde a la posición 233 de la SEC ID N°:101 con un residuo de alanina lleva a una pérdida de la unión entre dicho anticuerpo y el péptido de hIL-13R α 1 mutante resultante en comparación con la unión entre dicho anticuerpo y el péptido de hIL-13R α 1 sin dicha sustitución.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de cribado para moléculas de anticuerpo que apuntan a la misma región en hIL-13R α 1 que el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma depositada como el depósito de ATCC N° PTA-6933, que implica (a) analizar la unión de una molécula de anticuerpo de interés con (i) un polipéptido de hIL-13R α 1 aislado de la SEC ID N°:101 o un fragmento de 5 a 350 aminoácidos del mismo que incluye el aminoácido correspondiente al residuo 233 de la SEC ID N° 101; u (ii) un polipéptido de hIL-13R α 1 aislado o un fragmento de 5 a 350 aminoácidos del mismo en donde el aminoácido correspondiente al residuo 233 de la SEC ID N°: 101 es una alanina en lugar de una fenilalanina; (b) identificar aquellos anticuerpos que se unen con el polipéptido aislado o fragmento del paso (a) (i) pero muestran unión significativamente reducida con el polipéptido aislado o fragmento del paso (a) (ii); y (c) recuperar los anticuerpos identificados en el paso (b).

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos derivada de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 10G5. Las CDR y el ácido nucleico que codifica las CDR están subrayados.

La Figura 2 ilustra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos derivada de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 10G5. Las CDR y el ácido nucleico que codifica las CDR están subrayados.

La Figura 3 ilustra un mapa genético de pFab3d.

Las Figuras 4A y 4B ilustran construcciones de cadena pesada y ligera, SEC ID N°: 86 y 87, respectivamente, del Fab 10G5 en pFab3d.

La Figura 5 ilustra la unión de Fab mutados de preparaciones periplásmicas para IL-13R α 1 de rhesus.

La Figura 6 ilustra análisis de ELISA de la unión de preparaciones periplásmicas de mutantes de 10G5 a IL-13R α 1 humano.

La Figura 7 ilustra análisis de ELISA de la unión de preparaciones periplásmicas de mutantes de 10G5 a IL-13R α 1 humano.

La Figura 8 ilustra datos del ELISA de captura de Myc para clones de variantes de la cadena ligera.

La Figura 9 ilustra el funcionamiento de 10G5, 10G5H6 y 10G5-6 en un ensayo de liberación de eotaxina de NHDF.

La Figura 10 ilustra el funcionamiento de 10G5-6 en bloquear la liberación de eotaxina estimulada por IL-13 y IL-4 en células NHDF.

La Figura 11 ilustra el funcionamiento de 10G5 y 10G5H6 en un ensayo de STAT6 inducido por IL-13.

La Figura 12 ilustra el funcionamiento de 10G5 y 10G5H6 en un ensayo de STAT6 inducido por IL-4.

La Figura 13 ilustra el funcionamiento de 10G5-6 en bloquear la liberación estimulada por IL-13 de TARC (CCL17) en sangre humana completa.

La Figura 14 ilustra el funcionamiento de 10G5 y 10G5H6 en un ensayo de liberación de TARC estimulada por IL-13 en sangre humana completa.

La Figura 15 ilustra el funcionamiento de 10G5H6 y 10G5-6 en bloquear la liberación estimulada por IL-13 de rhesus de TARC en sangre de rhesus completa.

La Figura 16 ilustra una comparación de secuencias de los dominios de Fc de los isotipos IgG1 (SEC ID N°: 97), IgG2 (SEC ID N°: 98), IgG4 (SEC ID N°: 99) y IgG2m4 (SEC ID N°: 100).

La Figura 17 ilustra la inhibición de la proliferación celular de la línea celular de enfermedad de Hodgkin L1236 por 10G5, 10G5H6 y 10G5-6.

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación se refiere a antagonistas de anticuerpos de alta afinidad de IL-13R α 1 y particularmente IL-13R α 1 humano. Se desvelan moléculas de anticuerpo que reconocen selectivamente y se unen específicamente a IL-13R α 1. En realizaciones particulares, los anticuerpos se unen a IL-13R α 1 de primate (por ejemplo, IL-13R α 1 de cinomolgo) con alta afinidad, una calidad deseable dada la accesibilidad de modelos no humanos de primate para predecir perfiles de eficacia y seguridad en seres humanos. El uso de los términos "selectivo" o "específico" en el presente documento se refiere al hecho de que las moléculas de anticuerpo desveladas no muestran unión significativa a otros distintos de IL-13R α 1. Las moléculas de anticuerpo desveladas se unen a IL-13R α 1 humano con una K_D de 5×10^{-9} o menos, más preferentemente 2×10^{-9} o menos, e incluso más preferentemente, 1×10^{-9} o menos. K_D se refiere a la constante de disociación obtenida de la relación de K_d (la velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular) con respecto a K_a (la velocidad de asociación de la interacción anticuerpo-antígeno particular), o K_d/K_a que se expresa como concentración molar (M). Los valores de K_D pueden determinarse usando procedimientos bien establecidos en la materia. Un procedimiento preferido para determinar la K_D de un anticuerpo es usar resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo, un sistema de biosensor tal como un sistema BIACORE™ (Pharmacia AB Corporation).

Los anticuerpos, como se describen en el presente documento, son particularmente eficaces en antagonizar la función de IL-13R α 1, o la actividad mediada por IL-13R α 1 como se cita en el presente documento. El lenguaje actividad/función mediada por "IL-13R α 1" se usa en el presente documento para referirse a cualquier actividad/función que se requiere, o se agrava o potencia por, la función de IL-13R α 1. Se ha mostrado que las moléculas de anticuerpo desveladas presentan al menos una de las siguientes propiedades funcionales: (i) inhibición de la liberación de eotaxina inducida por IL-13 en células NHDF; (ii) inhibición de la liberación de eotaxina inducida por IL-4 en células NHDF; (iii) inhibición de la fosforilación de STAT6 inducida por IL-13 en células NHDF; (iv) inhibición de la fosforilación de STAT6 inducida por IL-4 en células NHDF; o (v) inhibición de la liberación estimulada por IL-13 de TARC en sangre o CMSP. Realizaciones específicas de la presente invención proporcionan moléculas de anticuerpo que antagonizan la liberación de eotaxina mediada por IL-13R α 1 de células NHDF con una CI₅₀ de 1,0 µg/ml o menos, más preferentemente 0,5 µg/ml o menos, y más preferentemente incluso 0,1 µg/ml o menos. Realizaciones específicas de la presente invención proporcionan moléculas de anticuerpo que antagonizan la fosforilación de STAT6 mediada por IL-13R α 1 en células NHDF. Realizaciones específicas de la presente invención proporcionan moléculas de anticuerpo que antagonizan la liberación de TARC (CCL17) mediada por IL-13R α 1 en sangre completa o CMSP con una CI₅₀ de 1000 ng/ml o menos, más preferentemente 500 ng/ml o menos, y más preferentemente incluso 250 ng/ml o menos. El grado de antagonismo por cualquier anticuerpo particular puede medirse cuantitativamente como el valor de CI₅₀ en comparación estadística con un control, o mediante cualquier procedimiento alternativo disponible en la materia para evaluar un efecto negativo sobre, o inhibición de, la función de IL-13R α 1 (es decir, cualquier procedimiento que pueda evaluar el antagonismo de la función de IL-13R α 1).

"Molécula de anticuerpo" o "anticuerpo", como se describe en el presente documento, se refiere a una estructura derivada de inmunoglobulina con unión selectiva a hIL-13R α 1 que incluye, pero no se limita a, un anticuerpo de longitud completa o completo, un fragmento de unión al antígeno (un fragmento derivado, físicamente o conceptualmente, de una estructura de anticuerpo), un derivado de cualquiera de los anteriores, una molécula quimérica, una fusión de cualquiera de los anteriores con otro polipéptido, o cualquier estructura/composición alternativa que incorpore cualquiera de los anteriores para los fines de unirse a/inhibir selectivamente la función de IL-13R α 1. Anticuerpos "completos" o anticuerpos de "longitud completa" se refieren a proteínas que tienen dos cadenas pesadas (H) y dos ligeras (L) inter-conectadas por enlaces disulfuro que incluyen: (1) en términos de las cadenas pesadas, una región variable (abreviada en el presente documento "V_H") y una región constante de la cadena pesada que tiene tres dominios, C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}; y (2) en términos de las cadenas ligeras, una región variable de la cadena ligera (abreviada en el presente documento "V_L") y una región constante de la cadena ligera que incluye un dominio, C_L. "Aislado", como se usa en el presente documento, describe una propiedad como se refiere a las moléculas de anticuerpo desveladas, ácido nucleico u otro que las haga diferentes de las encontradas en la naturaleza. La diferencia puede ser, por ejemplo, que son de una pureza diferente a la encontrada en la naturaleza, o que son de una estructura diferente o forma a la encontrada en la naturaleza. Una estructura no encontrada en la naturaleza, por ejemplo, incluye estructuras de inmunoglobulina humana recombinantes que incluyen, pero no se limitan a, estructuras de inmunoglobulina humana recombinantes con regiones determinantes de la complementariedad (CDR) optimizadas. Otros ejemplos de estructuras no encontradas en la naturaleza son moléculas de anticuerpo o ácido nucleico sustancialmente libres de otro material celular. Los anticuerpos aislados están generalmente libres de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (distintas de IL-13R α 1).

Fragmentos de anticuerpos y, más específicamente, fragmentos de unión al antígeno, son moléculas que poseen una región variable del anticuerpo o segmento del mismo (que incluye uno o más de los dominios de CDR 3 desvelados, pesados y/o ligeros), que confieren unión selectiva a IL-13R α 1, y particularmente IL-13R α 1 humano (hIL-13R α 1). Fragmentos de anticuerpos que contienen una región variable del anticuerpo tal incluyen, pero no se limitan a, las siguientes moléculas de anticuerpo: Fab, F(ab')₂, Fd, Fv, scFv, moléculas de anticuerpo biespecífico (es decir, moléculas de anticuerpo que incluyen un anticuerpo específico de IL-13R α 1 o fragmento de unión al antígeno como se desvela en el presente documento ligado a un segundo resto funcional que tiene una especificidad de unión diferente a la del anticuerpo, que incluye, sin limitación, otro péptido o proteína tal como un anticuerpo, o ligando de receptor), un fragmento de dímero de Fv monocatenario biespecífico, una CDR3 aislada, un minicuerpo, 'scAb', dAb, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo y anticuerpos artificiales basados en andamiajes de proteína, que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de polipéptido de fibronectina tipo III (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 6.703.199, documentos WO 02/32925 y WO 00/34784) o citocromo B (véase, por ejemplo, Nygren y col., 1997 Curr. Opin. Struct. Biol. 7:463-469). Las porciones de anticuerpo o fragmentos de unión pueden ser naturales, o producirse parcialmente o completamente sintéticamente. Tales porciones de anticuerpo pueden prepararse por diversos medios conocidos por un experto en la materia, que incluyen, pero no se limitan a, técnicas convencionales, tales como digestión con papaína o con pepsina.

La presente invención proporciona, en un aspecto particular, el anticuerpo aislado 10G5 que antagoniza muy eficazmente el funcionamiento de IL-13 mediante IL-13R α 1. 10G5 ha presentado inhibición de la liberación de eotaxina inducida por IL-13- y IL-4 en células NHDF, la fosforilación de STAT6 inducida por IL-13 y IL-4 en células NHDF y la liberación estimulada por IL-13 de TARC en sangre o células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Así, la presente invención engloba anticuerpos como se producen por la línea celular de hibridoma depositada como el depósito de ATCC n.º PTA-6933. También se divulgan en el presente documento moléculas de

anticuerpo que compiten para unirse a hIL-13R α 1 con un anticuerpo de PTA-6933. También se divulgan en el presente documento moléculas de anticuerpo que compiten para unirse a hIL-13R α 1 con anticuerpos divulgados en el presente documento. Realizaciones específicas de la presente divulgación proporcionan moléculas de anticuerpo aislado que inhiben la unión de IL-13 a hIL-13R α 1.

En el presente documento se divulgan moléculas de anticuerpo que tienen secuencias de la región variable de la cadena pesada y/o ligera de 10G5, además de equivalentes (caracterizados por tener una o más sustituciones de aminoácidos conservativas) u homólogos de los mismos. Realizaciones particulares son moléculas de anticuerpo aislado que incluyen los dominios CDR desvelados en el presente documento o conjuntos de dominios CDR de la cadena pesada y/o ligera desvelados en el presente documento, o equivalentes de los mismos, caracterizados por tener una o más sustituciones de aminoácidos conservativas. El uso de los términos “dominio” o “región” en el presente documento se refiere simplemente a la porción respectiva de la molécula de anticuerpo en la que la secuencia o segmento en cuestión residirá o, por el contrario, reside actualmente.

La Tabla 1 proporciona un resumen generalizado de secuencias divulgadas en el presente documento.

TABLA 1

SEQ ID NO:	DESCRIPCIÓN
SEQ ID NO: 1	VARIANTE OPTIMIZADA DE CDR3 DE LA CADENA PESADA
SEQ ID NO: 2	VARIANTE OPTIMIZADA DE CDR3 DE LA CADENA PESADA
SEQ ID NO: 3	VARIANTE OPTIMIZADA DE CDR3 DE LA CADENA PESADA
SEQ ID NO: 4	VARIANTE OPTIMIZADA DE CDR3 DE LA CADENA PESADA
SEQ ID NO: 5	VARIANTE OPTIMIZADA DE CDR3 DE LA CADENA PESADA
SEQ ID NO: 6	VARIANTE OPTIMIZADA DE CDR3 DE LA CADENA PESADA
SEQ ID NO: 7	VARIANTE OPTIMIZADA DE CDR3 DE LA CADENA PESADA
SEQ ID NO: 8	VARIANTE OPTIMIZADA DE CDR3 DE LA CADENA PESADA
SEQ ID NO: 9	VARIANTE OPTIMIZADA DE CDR3 DE LA CADENA PESADA
SEQ ID NO: 10	VARIANTE OPTIMIZADA DE CDR3 DE LA CADENA PESADA
SEQ ID NO: 11	VARIANTE OPTIMIZADA DE CDR3 DE LA CADENA PESADA
SEQ ID NO: 12	VARIANTE OPTIMIZADA DE CDR3 DE LA CADENA PESADA
SEQ ID NO: 13	VARIANTE OPTIMIZADA DE CDR3 DE LA CADENA PESADA
SEQ ID NO: 14	VARIANTE OPTIMIZADA DE CDR3 DE LA CADENA PESADA
SEQ ID NO: 15	VARIANTE OPTIMIZADA DE CDR3 DE LA CADENA PESADA
SEQ ID NO: 16	VARIANTE OPTIMIZADA DE CDR3 DE LA CADENA PESADA
SEQ ID NO: 17	VARIANTE OPTIMIZADA DE CDR3 DE LA CADENA PESADA
SEQ ID NO: 18	VARIANTE OPTIMIZADA DE CDR3 DE LA CADENA PESADA
SEQ ID NO: 19	VARIANTE OPTIMIZADA DE LA SECUENCIA W/ DE CDR3
SEQ ID NO: 20	VARIANTE OPTIMIZADA DE LA SECUENCIA W/ DE CDR3
SEQ ID NO: 21	VARIANTE OPTIMIZADA DE LA SECUENCIA W/ DE CDR3
SEQ ID NO: 22	VARIANTE OPTIMIZADA DE LA SECUENCIA W/ DE CDR3

(Continuación)

	SEQ ID NO:	DESCRIPCIÓN
5	SEQ ID NO: 23	VARIANTE OPTIMIZADA DE LA SECUENCIA W/ DE CDR3
	SEQ ID NO: 24	VARIANTE OPTIMIZADA DE LA SECUENCIA W/ DE CDR3
	SEQ ID NO: 25	VARIANTE OPTIMIZADA DE LA SECUENCIA W/ DE CDR3
	SEQ ID NO: 26	VARIANTE OPTIMIZADA DE CDR3 DE LA CADENA PESADA
10	SEQ ID NO: 27	VARIANTE OPTIMIZADA DE CDR3 DE LA CADENA LIGERA
	SEQ ID NO: 28	VARIANTE OPTIMIZADA DE CDR3 DE LA CADENA LIGERA
	SEQ ID NO: 29	VARIANTE OPTIMIZADA DE CDR3 DE LA CADENA LIGERA
15	SEQ ID NO: 30	VARIANTE OPTIMIZADA DE CDR3 DE LA CADENA LIGERA
	SEQ ID NO: 31	VARIANTE OPTIMIZADA DE CDR3 DE LA CADENA LIGERA
	SEQ ID NO: 32	VARIANTE OPTIMIZADA DE CDR3 DE LA CADENA LIGERA
	SEQ ID NO: 33	VARIANTE OPTIMIZADA DE CDR3 DE LA CADENA LIGERA
20	SEQ ID NO: 34	VARIANTE OPTIMIZADA DE CDR3 DE LA CADENA LIGERA
	SEQ ID NO: 35	VARIANTE OPTIMIZADA DE CDR3 DE LA CADENA LIGERA
	SEQ ID NO: 36	VARIANTE OPTIMIZADA DE CDR3 DE LA CADENA LIGERA
	SEQ ID NO: 37	VARIANTE OPTIMIZADA DE CDR3 DE LA CADENA LIGERA
25	SEQ ID NO: 38	VARIANTE OPTIMIZADA DE CDR3 DE LA CADENA LIGERA
	SEQ ID NO: 39	VARIANTE OPTIMIZADA DE CDR3 DE LA CADENA LIGERA
	SEQ ID NO: 40	CDR3 DE LA CADENA PESADA 10G5
30	SEQ ID NO: 41	CDR3 DE LA CADENA LIGERA 10G5
	SEQ ID NO: 42	10G5 VH SEQ W/LIDER& REGIÓN CONSTANTE ADICIONAL – ACIDO NUCLEICO
	SEQ ID NO: 43	SOLO SECUENCIA 10G5 VH – ACIDO NUCLEICO
	SEQ ID NO: 44	10G5 VH SEQ W/LIDER& REGIÓN CONSTANTE ADICIONAL – PROTEINA
35	SEQ ID NO: 45	SOLO SECUENCIA 10G5 VH – PROTEINA
	SEQ ID NO: 46	10G5 VL SEQ W/LIDER& REGIÓN CONSTANTE ADICIONAL – ACIDO NUCLEICO
	SEQ ID NO: 47	SOLO SECUENCIA 10G5 VL – ACIDO NUCLEICO
40	SEQ ID NO: 48	10G5 VL SEQ W/LIDER& REGIÓN CONSTANTE ADICIONAL – PROTEINA
	SEQ ID NO: 49	SOLO SECUENCIA 10G5 VL – PROTEINA
	SEQ ID NO: 50	CADENA PESADA* 10G5-1,3
	SEQ ID NO: 51	VH* 10G5- 1,3
45	SEQ ID NO: 52	ACIDO NUCLEICO* DE LA CADENA PESADA 10G5-1,3
	SEQ ID NO: 53	ACIDO NUCLEICO* 10G5-1,3
	SEQ ID NO: 54	CADENA PESADA 10G5-2
50	SEQ ID NO: 55	VH 10G5-2
	SEQ ID NO: 56	ACIDO NUCLEICO DE LA CADENA PESADA 10G5-2
	SEQ ID NO: 57	ACIDO NUCLEICO 10G5-2 VH
	SEQ ID NO: 58	CADENA PESADA 10G5-4,5
55	SEQ ID NO: 59	10G5-4,5 VH*
	SEQ ID NO: 60	ACIDO NUCLEICO* DE LA CADENA PESADA 10G5-4,5
	SEQ ID NO: 61	ACIDO NUCLEICO* 10G5-4,5
60	SEQ ID NO: 62	CADENA PESADA 10G5-6
	SEQ ID NO: 63	10G5-6 VH*
	SEQ ID NO: 64	ACIDO NUCLEICO* DE LA CADENA PESADA 10G5-6
	SEQ ID NO: 65	ACIDO NUCLEICO * 10G5-6
65	SEQ ID NO: 66	CADENA PESADA 10G5-7,8

(Continuación)

	SEQ ID NO:	DESCRIPCIÓN
5	SEQ ID NO: 67	10G5-7,8
	SEQ ID NO: 68	ACIDO NUCLEICO DE LA CADENA PESADA 10G5-7,8
	SEQ ID NO: 69	ACIDO NUCLEICO 10G5-7,8
	SEQ ID NO: 70	CADENA LIGERA* 10G5-1,2,4,6,7
10	SEQ ID NO: 71	10G5-1,2,4,6,7 VL*
	SEQ ID NO: 72	ACIDO NUCLEICO* DE LA CEDENA LIGERA 10G5-1,2,4,6,7
	SEQ ID NO: 73	ACIDO NUCLEICO* 10G5-1,2,4,6,7 VL
15	SEQ ID NO: 74	CADENA LIGERA 10G5-3
	SEQ ID NO: 75	10G5-3 VL
	SEQ ID NO: 76	ACIDO NUCLEICO DE LA CADENA LIGERA 10G5-3
	SEQ ID NO: 77	ACIDO NUCLEICO 10G5-3 VL
20	SEQ ID NO: 78	CADENA LIGERA* 10G5-5,8
	SEQ ID NO: 79	10G5-5,8 VL*
	SEQ ID NO: 80	ACIDO NUCLEICO* DE LA CADENA LIGERA 10G5-5,8
25	SEQ ID NO: 81	ACIDO NUCLEICO* 10G5-5,8 VL
	SEQ ID NO: 82	10G5 VH CDR1
	SEQ ID NO: 83	10G5 VH CDR2
	SEQ ID NO: 84	10G5 VL CDR1
30	SEQ ID NO: 85	10G5 VL CDR2
	SEQ ID NO: 86	PFAB3D-10G45H
	SEQ ID NO: 87	PFAB3D-10G5L
35	SEQ ID NO: 92	CONSTANTE DE IGG2M4
	SEQ ID NO: 93	ACIDO NUCLEICO DE LA CONSTANTE DE IGG2M4
	SEQ ID NO: 94	IGG2M4 DE LA CADENA PESADA 10G5-6
	SEQ ID NO: 95	ACIDO NUCLEICO IGG2M4 DE LA CADENA PESADA 10G5-6
40	SEQ ID NO: 96	IGG2M4 DE LA CADENA PESADA 10G5H6
	SEQ ID NO: 97	IGG1 FC
	SEQ ID NO: 98	IGG2 FC
	SEQ ID NO: 99	IGG4 FC
45	SEQ ID NO: 100	IGG2M4 FC
	SEQ ID NO: 101	RECEPTOR α 1 DE IL-13 DE HUMANO MADURO
	SEQ ID NO: 103	Hil-13R α 1.ECR
50	SEQ ID NO: 104	SECUENCIA IL-13R α 1 DE CYNOMOLGUS MADURO
	SEQ ID NO: 105	SECUENCIA IL-13R α 1 DE MURINE MADURO
	SEQ ID NO: 106	ACIDO NUCLEICO VH CDR1
	SEQ ID NO: 107	ACIDO NUCLEICO VH CDR2
55	SEQ ID NO: 108	ACIDO NUCLEICO VH CDR3
	SEQ ID NO: 109	ACIDO NUCLEICO VL CDR1
	SEQ ID NO: 110	ACIDO NUCLEICO VL CDR2
60	SEQ ID NO: 111	ACIDO NUCLEICO VL CDR3
	SEQ ID NO: 112	ACIDO NUCLEICO VH CDR3 10G5-6
	SEQ ID NO: 113	ACIDO NUCLEICO VL CDR3 10G5-6
	SEQ ID NO: 120	RECEPTOR α 1 DE IL-13 DE HUMANO MUTANTE
65	SEQ ID NO: 121	VH CDR3

(Continuación)

SEQ ID NO:	DESCRIPCIÓN
SEQ ID NO: 122	VL CDR3
SEQ ID NO: 123	ACIDO NUCLEICO VL CDR1
* Nota: Donde una SEQ ID NO: particular sea relevante para mas de un anticuerpo designado, se utilizara el siguiente formato como abreviatura de los diferente anticuerpos: Designación base de anticuerpo-un numero asignado, otro numero asignado, etc. Un ejemplo de esto es lo siguiente: 10G5-1,3 se refiere a ambos 10G5-1 y 10G5-3.	

En el presente documento se divulgan moléculas de anticuerpo aislado que incluyen una región variable de la cadena pesada de SEC ID N°: 45, equivalentes de las mismas caracterizadas por tener una o más sustituciones de aminoácidos conservativas, y homólogos de las mismas. Los anticuerpos desvelados presentan al menos una de las siguientes propiedades funcionales: (i) inhibición de la liberación de eotaxina inducida por IL-13 en células NHDF; (ii) inhibición de la liberación de eotaxina inducida por IL-4 en células NHDF; (iii) inhibición de la fosforilación de STAT6 inducida por IL-13 en células NHDF; (iv) inhibición de la fosforilación de STAT6 inducida por IL-4 en células NHDF; o (v) inhibición de la liberación estimulada por IL-13 de TARC en sangre o CMSP. En el presente documento se divulgan homólogos de las moléculas de anticuerpo desveladas caracterizados por ser al menos el 90 % homólogos a las mismas y presentar al menos una de las propiedades funcionales anteriores. Los anticuerpos específicos proporcionados competirán para unirse a hIL-13R α 1 con un anticuerpo como se produce por la línea celular de hibridoma depositada como el depósito de ATCC n° PTA-6933.

En el presente documento se divulgan moléculas de anticuerpo aislado que incluyen una región variable de la cadena ligera de SEC ID N°: 49, equivalentes de las mismas caracterizadas por tener una o más sustituciones de aminoácidos conservativas, y homólogos de las mismas. Los anticuerpos desvelados presentan al menos una de las siguientes propiedades funcionales: (i) inhibición de la liberación de eotaxina inducida por IL-13 en células NHDF; (ii) inhibición de la liberación de eotaxina inducida por IL-4 en células NHDF; (iii) inhibición de la fosforilación de STAT6 inducida por IL-13 en células NHDF; (iv) inhibición de la fosforilación de STAT6 inducida por IL-4 en células NHDF; y (v) inhibición de la liberación estimulada por IL-13 de TARC en sangre o CMSP. En el presente documento se desvelan homólogos de las moléculas de anticuerpo desveladas caracterizados por ser al menos el 90 % homólogos a las mismas y presentar al menos una de las propiedades funcionales anteriores. Los anticuerpos específicos proporcionados competirán para unirse a hIL-13R α 1 con un anticuerpo como se produce por la línea celular de hibridoma depositada como el depósito de ATCC n° PTA-6933.

En el presente documento se divulgan moléculas de anticuerpo aislado que comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende SEC ID N°: 45 y región variable de la cadena ligera que comprende SEC ID N°: 49; o equivalente de las mismas caracterizadas por tener una o más sustituciones de aminoácidos conservativas. Aspectos específicos son dichos anticuerpos que presentan al menos una de las siguientes propiedades funcionales: (i) inhibición de la liberación de eotaxina inducida por IL-13 en células NHDF; (ii) inhibición de la liberación de eotaxina inducida por IL-4 en células NHDF; (iii) inhibición de la fosforilación de STAT6 inducida por IL-13 en células NHDF; (iv) inhibición de la fosforilación de STAT6 inducida por IL-4 en células NHDF; y (v) inhibición de la liberación estimulada por IL-13 de TARC en sangre o CMSP.

En el presente documento se divulgan moléculas de anticuerpo para IL-13R α 1 aislado que incluyen la secuencia de CDR3 pesada variable, SEC ID N°: 40, y modificaciones conservativas de la misma, que presentan al menos una de las siguientes propiedades funcionales: (i) inhibición de la liberación de eotaxina inducida por IL-13 en células NHDF; (ii) inhibición de la liberación de eotaxina inducida por IL-4 en células NHDF; (iii) inhibición de la fosforilación de STAT6 inducida por IL-13 en células NHDF; (iv) inhibición de la fosforilación de STAT6 inducida por IL-4 en células NHDF; y (v) inhibición de la liberación estimulada por IL-13 de TARC en sangre o CMSP. Las secuencias de CDR3 de la región variable de la cadena pesada desveladas en el presente documento se enumeran en la Tabla 2.

TABLA 2

SECUENCIA ID NO:	Secuencia V _H CDR3
SEQ ID NO: 1	FPNWGALDQ
SEQ ID NO: 2	VPNWGSLDT
SEQ ID NO: 3	FPNWGSM DA
SEQ ID NO: 4	FPNWGSLDH
SEQ ID NO: 5	MPNWGSFDY
SEQ ID NO: 6	MPNWGSFDT

(Continuación)

SECUENCIA ID NO:	Secuencia V _H CDR3
SEQ ID NO: 7	MPNWGSLDH
SEQ ID NO: 8	MPNWGSFDH
SEQ ID NO: 9	MPNWGSLDT
SEQ ID NO: 10	MPNWGSLDA
SEQ ID NO: 11	MPNWGSLDN
SEQ ID NO: 12	MPNWGALDS
SEQ ID NO: 13	MPNWGSFDN
SEQ ID NO: 14	MPNWGSLDY
SEQ ID NO: 15	MPNWGSFDH
SEQ ID NO: 16	MPNWGSLDS
SEQ ID NO: 17	MPNWGSLDG
SEQ ID NO: 18	VPNWGSLDN
SEQ ID NO: 19	CARFPNWGSLDHWGQGTLTVSSASIKG
SEQ ID NO: 20	CARMPNWGSLDHWGQGTLTVSSASTKG
SEQ ID NO: 21	CARMPNWGSFDYWGQGTLTVSSASIKG
SEQ ID NO: 22	VRMPNWGSLDHW
SEQ ID NO: 23	VRMPNWGSLDHWGQGTLTVSSASIKG
SEQ ID NO: 24	ARMPNWGSLDHWGQGTLTVSSASIKG
SEQ ID NO: 25	FPNWGSFDYWGQGTLTVSSASIKG
SEQ ID NO: 26	VPNWGSLDA

Aspectos específicos proporcionan moléculas de anticuerpo aislado que incluyen una región variable de la cadena pesada en las que las secuencias de CDR1, CDR2 y/o CDR3 son SEC ID N°: 82, SEC ID N°: 83 y/o SEC ID N°: 40, respectivamente; o equivalentes de las mismas caracterizadas por tener una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en una cualquiera o más de las secuencias de CDR. Aspectos adicionales proporcionan moléculas de anticuerpo aislado que incluyen una región variable de la cadena pesada en la que las secuencias CDR1, CDR2 y/o CDR3 son SEC ID N°: 82, SEC ID N°: 102 y/o SEC ID N°: 40, respectivamente; o equivalentes de las mismas caracterizadas por tener una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en una cualquiera o más de las secuencias de CDR.

En el presente documento se divulgan moléculas de anticuerpo para IL-13R α 1 aislado que tienen una secuencia de CDR3 ligera variable de SEC ID N°: 41, y modificaciones conservativas de las mismas, que presentan al menos una de las siguientes propiedades funcionales: (i) inhibición de la liberación de eotaxina inducida por IL-13 en células NHDF; (ii) inhibición de la liberación de eotaxina inducida por IL-4 en células NHDF; (iii) inhibición de la fosforilación de STAT6 inducida por IL-13 en células NHDF; (iv) inhibición de la fosforilación de STAT6 inducida por IL-4 en células NHDF; y (v) inhibición de la liberación estimulada por IL-13 de TARC en sangre o CMSP. Las secuencias de CDR3 de la región variable de la cadena ligera divulgadas en el presente documento se enumeran en la Tabla 3.

TABLA 3

SECUENCIA ID NO:	Secuencia V _L CDR3
SEQ ID NO: 27	QRYAT
SEQ ID NO: 28	QRYST
SEQ ID NO: 29	QMYST
SEQ ID NO: 30	QQVGT
SEQ ID NO: 31	QVYST
SEQ ID NO: 32	QQYST
SEQ ID NO: 33	QSYST
SEQ ID NO: 34	QQYAT
SEQ ID NO: 35	QQYSS
SEQ ID NO: 36	QTYST

(Continuación)

SECUENCIA ID NO:	Secuencia V _L CDR3
SEQ ID NO: 37	QQYGS
SEQ ID NO: 38	QQYAS
SEQ ID NO: 39	QQYEA

Realizaciones específicas proporcionan moléculas de anticuerpo aislado que incluyen una región variable de la cadena ligera en la que las secuencias de CDR1, CDR2 y/o CDR3 se exponen en SEC ID N°: 84, SEC ID N°: 85 y/o SEC ID N°: 41, respectivamente; o un equivalente de las mismas caracterizadas por tener una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en una cualquiera o más de las secuencias de CDR.

En el presente documento se divulgan moléculas de anticuerpo para IL-13R α 1 aislado que incluyen la secuencia de CDR3 de la región variable de la cadena pesada y la secuencia de CDR3 de la región variable de la cadena ligera de SEC ID N°: 40 y 41, respectivamente, o modificaciones conservativas de las mismas en una cualquiera o más de las secuencias de CDR3, que presentan al menos una de las siguientes propiedades funcionales: (i) inhibición de la liberación de eotaxina inducida por IL-13 en células NHDF; (ii) inhibición de la liberación de eotaxina inducida por IL-4 en células NHDF; (iii) inhibición de la fosforilación de STAT6 inducida por IL-13 en células NHDF; (iv) inhibición de la fosforilación de STAT6 inducida por IL-4 en células NHDF; y (v) inhibición de la liberación estimulada por IL-13 de TARC en sangre o CMSP.

En el presente documento se divulgan moléculas de anticuerpo para IL-13R α 1 aislado que incluyen secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada y secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera de SEC ID N°: 82, 83, 40, 84, 85 y 41, respectivamente; y equivalentes de las mismas caracterizadas por tener una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en una cualquiera o más de las secuencias de CDR.

Sustituciones de aminoácidos conservativas, como un experto habitual en la materia apreciará, son sustituciones que sustituyen un residuo de aminoácido con uno que confiere características funcionales y/o químicas similares o mejores (para el fin previsto). Por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservativas son frecuentemente aquellas en las que el residuo de aminoácido se sustituye con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la materia familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. 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 sin cargar (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 beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Tales modificaciones no reducen o alteran significativamente la unión o características de inhibición funcional del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos, pero pueden mejorar tales propiedades. El fin de hacer una sustitución no es significativo y puede incluir, pero ni mucho menos se limita a, sustituir un residuo con uno mejor capaz de mantener o potenciar la estructura de la molécula, la carga o hidrofobia de la molécula, o el tamaño de la molécula. Por ejemplo, puede desearse simplemente sustituir un residuo menos deseado con uno de la misma polaridad o carga. Tales modificaciones pueden introducirse por técnicas convencionales conocidas en la materia, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Un medio específico por el que aquellos expertos en la materia realizan sustituciones de aminoácidos conservativas es la mutagénesis de barrido con alanina como se trata en, por ejemplo, MacLennan y col., 1998 Acta Physiol. Scand. Suppl. 643:55-67, y Sasaki y col., 1998 Adv. Biophys. 35:1-24. Las moléculas de anticuerpo alteradas se prueban entonces para función retenida o mejor función usando ensayos funcionales disponibles en la materia o descritos en el presente documento. Las moléculas de anticuerpo que poseen una o más de tales sustituciones de aminoácidos conservativas que retienen la capacidad para unirse selectivamente a hIL-13R α 1 y antagonizar IL-13R α 1 que funcionan a un nivel igual o mejor que la molécula que no posee tales alteraciones de aminoácidos se denominan en el presente documento "equivalentes funcionales" de los anticuerpos desvelados y forman realizaciones específicas de la presente invención.

En otro aspecto, en el presente documento se divulgan moléculas de anticuerpo que incluyen regiones variables de la cadena pesada y/o ligera que comprenden secuencias de aminoácidos que son homólogas a las secuencias de aminoácidos correspondientes de los anticuerpos desvelados, en el que las moléculas de anticuerpo presentan una constante de disociación en equilibrio (K_D) inferior a 5 nM con receptor α 1 de interleucina 13 humana (hIL-13R α 1) y antagonizan la actividad mediada por hIL-13R α 1. Aspectos específicos son moléculas de anticuerpo que incluyen regiones variables de la cadena pesada y/o ligera que son al menos el 90 % homólogas a las regiones variables de la cadena pesada y/o ligera desveladas, respectivamente, que presentan al menos una de las siguientes propiedades funcionales: (i) inhibición de la liberación de eotaxina inducida por IL-13 en células NHDF; (ii) inhibición de la liberación de eotaxina inducida por IL-4 en células NHDF; (iii) inhibición de la fosforilación de STAT6 inducida por IL-13 en células NHDF; (iv) inhibición de la fosforilación de STAT6 inducida por IL-4 en células NHDF; o (v)

inhibición en sangre o CMSP. En el presente documento también se divulgan moléculas de anticuerpo que incluyen regiones variables de la cadena pesada y/o ligera que son al menos el 90 % homólogas a las regiones variables de la cadena pesada y/o ligera desveladas, respectivamente, que compiten para unirse a hIL-13R α 1 con un anticuerpo como se produce por la línea celular de hibridoma depositada como el depósito de ATCC nº PTA-6933. Referencia a "al menos el 90 % homólogas" en regiones variables incluye al menos el 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 y el 100 % de secuencias homólogas.

Anticuerpos con secuencias de aminoácidos homólogas a las secuencias de aminoácidos de las moléculas de anticuerpo específicas descritas en el presente documento se producen normalmente para mejorar una o más de las propiedades del anticuerpo sin cambiar su especificidad por IL-13R α 1. Un procedimiento de obtención de tales secuencias, que no es el único procedimiento disponible para el experto, es mutar la secuencia que codifica regiones variables de la cadena pesada y/o ligera desveladas en el presente documento por mutagénesis dirigida al sitio o al azar, expresar una molécula de anticuerpo que comprende la(s) región (regiones) variable(s) mutada(s) y probar la molécula de anticuerpo codificada para función retenida usando los ensayos funcionales descritos en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, la homología en porcentaje entre dos secuencias de aminoácidos es equivalente a la identidad en porcentaje entre las dos secuencias. La identidad en porcentaje entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = nº de posiciones idénticas/nº total de posiciones X 100), teniendo en cuenta el número de huecos, y longitud de cada hueco, que necesita introducirse para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación de identidad en porcentaje entre secuencias pueden determinarse usando procedimientos generalmente conocidos para aquellos expertos en la materia y pueden llevarse a cabo usando un algoritmo matemático. Por ejemplo, la identidad en porcentaje entre secuencias de aminoácidos y/o secuencias de nucleótidos puede determinarse usando el algoritmo de Meyers y Miller, 1988 Comput. Appl. Biosci. 4:11-17, que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0). Además, la identidad en porcentaje entre secuencias de aminoácidos o secuencias de nucleótidos puede determinarse usando el programa GAP en el paquete de software de GCG disponible en línea de Accelrys, usando sus parámetros por defecto.

Los anticuerpos específicos de la presente invención inhiben la unión de IL-13 a hIL-13R α 1. Los anticuerpos específicos de la presente invención compiten para unirse a hIL-13R α 1 con cualquiera de los anticuerpos desvelados en el presente documento y, particularmente, 10G5. Tales anticuerpos de competición pueden identificarse basándose en su capacidad para competir de forma cruzada (por ejemplo, para inhibir competitivamente la unión de, en un modo estadísticamente significativo) con 10G5 o sus derivados desvelados en el presente documento en ensayos de unión a IL-13R α 1 convencionales. La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión de 10G5 o derivado a IL-13R α 1 humano demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con ese anticuerpo para unirse a IL-13R α 1 humano. Un anticuerpo tal puede, según teoría no limitante, unirse al mismo epítipo o uno relacionado (por ejemplo, uno estructuralmente similar o espacialmente proximal) sobre IL-13R α 1 humano como el anticuerpo con el que compete. Anticuerpos que compiten por la unión con 10G5 o sus derivados desvelados pueden entonces evaluarse para tener al menos una de las siguientes propiedades funcionales: (i) inhibición de la liberación de eotaxina inducida por IL-13 en células NHDF; (ii) inhibición de la liberación de eotaxina inducida por IL-4 en células NHDF; (iii) inhibición de la fosforilación de STAT6 inducida por IL-13 en células NHDF; (iv) inhibición de la fosforilación de STAT6 inducida por IL-4 en células NHDF; y (v) inhibición de la liberación estimulada por IL-13 de TARC en sangre o CMSP. Los anticuerpos también pueden entonces evaluarse para la sensibilidad de unión en el residuo Phe233Ala de IL-13R α 1 humano descrito en el presente documento.

En realizaciones particulares, la presente invención proporciona moléculas de anticuerpo aislado que antagonizan la función de IL-13R α 1 (actividad mediada por IL-13R α 1) y que presentan una constante de disociación en equilibrio (K_D) con hIL-13R α 1 que es inferior a 100 pM, como se ha determinado por tecnologías de resonancia de plasmones superficiales fácilmente disponibles y entendidas por aquellos expertos en la materia, que incluyen, pero no se limitan a, BIACORE™ (Upsala, Suecia) y KINEXA® (Sapidyne Instruments, Boise, ID) o equivalente adecuado de las mismas. En realizaciones específicas, las moléculas de anticuerpo aislado presentan la K_D anterior, además de una de las siguientes propiedades funcionales: (i) inhibición de la liberación de eotaxina inducida por IL-13 en células NHDF; (ii) inhibición de la liberación de eotaxina inducida por IL-4 en células NHDF; (iii) inhibición de la fosforilación de STAT6 inducida por IL-13 en células NHDF; (iv) inhibición de la fosforilación de STAT6 inducida por IL-4 en células NHDF; y (v) inhibición de la liberación estimulada por IL-13 de TARC en sangre o CMSP.

En aspectos específicos, la presente divulgación proporciona moléculas de anticuerpo aislado que presentan la K_D anterior, antagonizan la actividad mediada por IL-13R α 1 y comprenden una región variable de la cadena pesada con un dominio de la región determinante de la complementariedad 3 (CDR3) como se expone en SEC ID Nº: 5 o un equivalente de las mismas caracterizado por tener sustituciones de aminoácidos conservativas en las posiciones de aminoácidos 1, 7 y/o 9 en ellas. En aspectos específicos, la presente divulgación proporciona moléculas de anticuerpo aislado que presentan la K_D anterior y región variable de la cadena pesada y adicionalmente incluyen una región variable de la cadena ligera con un dominio de CDR3 como se expone en SEC ID Nº: 38 o un equivalente de las mismas caracterizadas por tener sustituciones de aminoácidos conservativas en las posiciones de aminoácidos

2, 4 y/o 5 en ellas. En aspectos específicos, tales sustituciones de aminoácidos conservativas engloban las siguientes:

en SEC ID N°: 5, posición 1, una sustitución seleccionada del grupo que consiste en: F, M, Q, L y V;
 en SEC ID N°: 5, posición 7, una sustitución seleccionada del grupo que consiste en: F, L, A y M;
 en SEC ID N°: 5, posición 9, una sustitución seleccionada del grupo que consiste en: Y, Q, K, R, W y H;
 en SEC ID N°: 38, posición 2, una sustitución seleccionada del grupo que consiste en: Q, R, M, S y T;
 en SEC ID N°: 38, posición 4, una sustitución seleccionada del grupo que consiste en: E, A, G y S; y/o
 en SEC ID N°: 38, posición 5, una sustitución seleccionada del grupo que consiste en: T, A y S.

Por consiguiente, en el presente documento se divulga una molécula de anticuerpo con una región variable de la cadena pesada de CDR3 que tiene la secuencia Xaa₁-Pro-Asn-Trp-Gly-Xaa₂-Xaa₃-Asp-Xaa₄ (SEC ID N°: 121), en la que Xaa₁ es Phe, Met, Gln, Leu o Val; Xaa₂ es Ser o Ala; Xaa₃ es Phe, Leu, Ala o Met; y Xaa₄ es Tyr, Gln, Lys, Arg, Trp, His, Ala, Thr, Ser, Asn o Gly. Otro aspecto engloba una molécula de anticuerpo con una región variable de la cadena ligera de CDR3 que tiene la secuencia Gln-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄ (SEC ID N°: 122), en la que Xaa₁ es Gln, Arg, Met, Ser, Thr o Val; Xaa₂ es Tyr o Val; Xaa₃ es Glu, Ala, Gly o Ser; y Xaa₄ es Thr, Ala o Ser.

Un aspecto de la presente divulgación es un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno que incluye:

una región variable de la cadena pesada con un dominio de CDR3 que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 13, SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 15, SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 18 y SEC ID N°: 26; o una región variable de la cadena pesada con una secuencia que incluye un dominio de CDR3, dichas secuencias seleccionadas del grupo que consiste en: SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 22, SEC ID N°: 23, SEC ID N°: 24 y SEC ID N°: 25; y/o

una región variable de la cadena ligera con un dominio de CDR3 que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 27, SEC ID N°: 28, SEC ID N°: 29, SEC ID N°: 30, SEC ID N°: 31, SEC ID N°: 32, SEC ID N°: 33, SEC ID N°: 34, SEC ID N°: 35, SEC ID N°: 36, SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 38 y SEC ID N°: 39;

en el que aspectos específicos del mismo presentan una K_D con hIL-13Rα1 que es inferior a 200 pM.

Aspectos específicos tienen una cadena pesada que incluye una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 50, SEC ID N°: 54, SEC ID N°: 58, SEC ID N°: 62 y SEC ID N°: 66. Aspectos específicos tienen un dominio variable de la cadena pesada que incluye una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 51, SEC ID N°: 55, SEC ID N°: 59, SEC ID N°: 63 y SEC ID N°: 67. Aspectos específicos tienen una cadena ligera que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 70, SEC ID N°: 74 y SEC ID N°: 78. Aspectos específicos tienen un dominio variable de la cadena ligera que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 71, SEC ID N°: 75 y SEC ID N°: 79.

Otro aspecto de la presente divulgación es un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno según la presente divulgación que posee lo siguiente:

una región variable de la cadena ligera que incluye un dominio de CDR2 con la secuencia expuesta en SEC ID N°: 85;

una región variable de la cadena pesada que incluye un dominio de CDR2 con la secuencia expuesta en SEC ID N°: 83;

una región variable de la cadena ligera que incluye un dominio de CDR1 con la secuencia expuesta en SEC ID N°: 84; y/o

una región variable de la cadena pesada que incluye un dominio de CDR1 con la secuencia expuesta en SEC ID N°: 82. Por consiguiente, en el presente documento se divulgan moléculas de anticuerpo específicas para receptor de IL-13 humana que incluyen una región de unión al antígeno que tiene regiones variables de la cadena pesada y ligera, y un conjunto de CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) como se describen en el presente documento. También se desvelan composiciones que incluyen uno y/o ambos de los siguientes componentes (1) una región variable de la cadena pesada que tiene un conjunto de CDR, y (2) una región variable de la cadena ligera que tiene un conjunto de CDR.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona moléculas de anticuerpo aislado para IL-13Rα1 humano que tienen en ellas al menos un dominio variable de la cadena ligera y al menos un dominio variable de la cadena pesada (V_L y V_H, respectivamente).

En aspectos específicos, una molécula de anticuerpo que tiene una región variable de la cadena pesada según la presente descripción se expresa con una región variable de la cadena ligera con secuencia de CDR3 como se expone en SEC ID N°: 41. En otros aspectos, una molécula de anticuerpo que tiene una región variable de la cadena ligera según la presente descripción se expresa con una secuencia variable de la cadena pesada con secuencia de CDR3 como se expone en SEC ID N°: 40. En aspectos específicos, cadenas ligeras y pesadas de las fórmulas

descritas anteriormente se usan en combinación. Aspectos específicos de la presente divulgación proporcionan moléculas de anticuerpo que incluyen adicionalmente lo siguiente:

una región variable de la cadena ligera con un dominio de CDR2 como se expone en SEC ID N°: 85;
una región variable de la cadena pesada con un dominio de CDR2 como se expone en SEC ID N°: 83;
una región variable de la cadena ligera con un dominio de CDR1 como se expone en SEC ID N°: 84; y/o
una región variable de la cadena pesada con un dominio de CDR1 como se expone en SEC ID N°: 82, o equivalentes adecuados o derivados de la misma, que incluyen dichos dominios que contienen sustituciones de aminoácidos conservativas como se ha descrito anteriormente.

Cualquier molécula de anticuerpo que incluye las CDR pesadas y/o ligeras desveladas, regiones variables o cadenas ligeras o pesadas, o cualquier combinación de las mismas, está englobada dentro de la presente divulgación que incluye, pero no se limita a, las siguientes moléculas de anticuerpo: (1) una molécula de anticuerpo aislado que tiene una región variable de la cadena pesada que tiene en ella la secuencia de CDR3 como se expone en SEC ID N°: 5, y una región variable de la cadena ligera que tiene en ella la secuencia de CDR3 como se expone en SEC ID N°: 38; (2) una molécula de anticuerpo aislado que tiene una región variable de la cadena pesada que tiene en ella la secuencia de CDR3 como se expone en SEC ID N°: 5 y una región variable de la cadena ligera que tiene en ella la secuencia de CDR3 como se expone en SEC ID N°: 39; (3) una molécula de anticuerpo aislado que tiene una región variable de la cadena pesada que tiene en ella la secuencia de CDR3 como se expone en SEC ID N°: 5 y una región variable de la cadena ligera que tiene en ella la secuencia de CDR3 como se expone en SEC ID N°: 41; (4) una molécula de anticuerpo aislado que tiene una región variable de la cadena pesada que tiene en ella la secuencia de CDR3 como se expone en SEC ID N°: 22 y una región variable de la cadena ligera que tiene en ella la secuencia de CDR3 como se expone en SEC ID N°: 38; (5) una molécula de anticuerpo aislado que tiene una región variable de la cadena pesada que tiene en ella la secuencia de CDR3 como se expone en SEC ID N°: 23 y una región variable de la cadena ligera que tiene en ella la secuencia de CDR3 como se expone en SEC ID N°: 38; y (6) una molécula de anticuerpo aislado que tiene una región variable de la cadena pesada que tiene en ella la secuencia de CDR3 como se expone en SEC ID N°: 7 y una región variable de la cadena ligera que tiene en ella la secuencia de CDR3 como se expone en SEC ID N°: 38.

En algunos aspectos, un anticuerpo aislado de la presente divulgación tiene una región variable de la cadena ligera que incluye un dominio CDR2 con la secuencia expuesta en SEC ID N°: 85; una región variable de la cadena pesada que incluye un dominio CDR2 con la secuencia expuesta en SEC ID N°: 83; una región variable de la cadena ligera que incluye un dominio CDR1 con la secuencia expuesta en SEC ID N°: 84; y una región variable de la cadena pesada que incluye un dominio CDR1 con la secuencia expuesta en SEC ID N°: 82.

En otros aspectos, una molécula de anticuerpo aislado de la invención tiene una región variable de la cadena pesada con secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 como se exponen en SEC ID N°: 82, SEC ID N°: 83 y SEC ID N°: 7, respectivamente, y una región variable de la cadena ligera que incluye secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 como se exponen en SEC ID N°: 84, SEC ID N°: 85 y SEC ID N°: 38, respectivamente.

Adicionalmente se engloban en el presente documento moléculas de anticuerpo que incluyen (i) una región variable de la cadena pesada como se expone en SEC ID N°: 63 y/o una región variable de la cadena ligera como se expone en SEC ID N°: 71; (ii) una cadena pesada como se expone en SEC ID N°: 62 y una región variable de la cadena ligera como se expone en SEC ID N°: 71, y (iii) una cadena pesada como se expone en SEC ID N°: 94 y una región variable de la cadena ligera como se expone en SEC ID N°: 71.

La manipulación de anticuerpos monoclonales y otros para producir otros anticuerpos o moléculas químicas que retienen la especificidad del anticuerpo original está perfectamente dentro del ámbito de un experto en la materia. Esto puede llevarse a cabo, por ejemplo, usando técnicas de tecnología de ADN recombinante. Tales técnicas pueden implicar la introducción de ADN que codifica la región variable de inmunoglobulina, o una o más de las CDR, de un anticuerpo a la región variable, región constante o región constante más regiones estructurales, según convenga, de una inmunoglobulina diferente. Tales moléculas forman importantes aspectos de la presente invención. Inmunoglobulinas específicas en las que pueden insertarse las secuencias desveladas o, por el contrario, formar la parte esencial de, incluyen, pero no se limitan a, las siguientes moléculas de anticuerpo que forman realizaciones particulares de la presente invención: un Fab (fragmento monovalente con dominios ligero variable (V_L), pesado variable (V_H), ligero constante (C_L) y pesado constante 1 (C_{H1})), un $F(ab')_2$ (fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados por un puente de disulfuro o alternativa en la región bisagra), un Fd (dominios V_H y C_{H1}), un Fv (dominios V_L y V_H), un scFv (un Fv monocatenario en el que V_L y V_H se unen por un ligador, por ejemplo, un ligador de péptido, véase, por ejemplo, Bird y col., 1988 Science 242:423-426, Huston y col., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883), una molécula de anticuerpo biespecífico (una molécula de anticuerpo que comprende un anticuerpo específico para IL-13R α 1 o fragmento de unión al antígeno como se desvela en el presente documento ligado a un segundo resto funcional que tiene una especificidad de unión diferente a la del anticuerpo, que incluye, sin limitación, otro péptido o proteína tal como un anticuerpo, o ligando de receptor), un dímero de Fv monocatenario biespecífico (véase, por ejemplo, el documento WO1993/011161), una CDR3 aislada, un minicuerpo (fusión de cadena sencilla- C_{H3} que se autoensambla en un dímero bivalente de aproximadamente 80 kDa), un 'scAb' (un fragmento de anticuerpo que contiene V_H y V_L , además de o bien C_L o bien

C_{H1}), un fragmento de dAb (dominio V_H, véase, por ejemplo, Ward y col., 1989 Nature 341:544-546, y McCafferty y col., 1990 Nature 348:552-554; o dominio V_L; Holt y col., 2003 Trends in Biotechnology 21:484-489), un diacuerpo (véase, por ejemplo, Holliger y col., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 y documento WO 94/13804), un triacuerpo, un tetracuerpo, un minicuerpo (un scFv unido a un C_{H3}; véase, por ejemplo, Hu y col., 1996 Cancer Res. 56:3055-3061), IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgD, IgA, IgE o cualquier derivado de las mismas, y anticuerpos artificiales basados en andamiajes de proteína, que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de polipéptido de fibronectina tipo III (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 6.703.199 y el documento WO 02/32925) o citocromo B; véanse, por ejemplo, Koide y col., 1998 J. Mol. Biol. 284:1141-1151, y Nygren y col., 1997 Current Opinion in Structural Biology 7:463-469. Ciertas moléculas de anticuerpo que incluyen, pero no se limitan a, Fv, scFv y moléculas de diacuerpo pueden estabilizarse incorporando puentes de disulfuro para revestir los dominios V_H y V_L, véase, por ejemplo, Reiter y col., 1996 Nature Biotech. 14:1239-1245. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse usando tecnologías convencionales (véase, por ejemplo, Holliger & Winter, 1993 Current Opinion Biotechnol. 4:446-449, procedimientos específicos de los cuales incluyen producción químicamente, o a partir de hibridomas híbridos) y otras tecnologías que incluyen, pero no se limitan a, la tecnología BITE™ (moléculas que poseen regiones de unión al antígeno de diferente especificidad con un ligador de péptido) e ingeniería de botones en ojales (véase, por ejemplo, Ridgeway y col., 1996 Protein Eng. 9:616-621). Los diacuerpos biespecíficos pueden producirse en *E. coli*, y estas moléculas, además de otras moléculas de anticuerpo, como apreciará un experto en la materia, pueden seleccionarse usando expresión en fago en las bibliotecas apropiadas (véase, por ejemplo, el documento WO 94/13804).

Dominios variables, en los que las CDR de interés se insertan, pueden obtenerse de cualquier línea germinal o dominio variable humano reorganizado. Los dominios variables también pueden producirse sintéticamente. Las regiones CDR pueden introducirse en los dominios variables respectivos usando tecnología de ADN recombinante. Un medio por el que esto puede lograrse se describe en Marks y col., 1992 Bio/Technology 10:779-783. La expresión y selección puede lograrse usando tecnologías adecuadas que incluyen, pero no se limitan a, expresión en fago (véanse, por ejemplo, el documento WO 92/01047, Kay y col., 1996 Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual, San Diego: Academic Press), expresión en levadura, expresión bacteriana, expresión en T7 y expresión en ribosomas (véase, por ejemplo, Lowe & Jermutus, 2004 Curr. Pharm. Biotech. 517-527). Un dominio pesado variable puede emparejarse con un dominio ligero variable para proporcionar un sitio de unión al antígeno. Además, pueden usarse regiones independientes (por ejemplo, un dominio pesado variable solo) para unirse al antígeno. El experto conoce muy bien, además, que dos dominios de un fragmento Fv, V_L y V_H, aunque quizás estén codificados por genes separados, pueden unirse, usando procedimientos recombinantes, por un ligador sintético que les permite formar una cadena monocaténaria de proteína en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (scFv).

Aspectos específicos proporcionan la(s) CDR(s) en regiones estructurales de la línea germinal. Realizaciones específicas en el presente documento proporcionan CDR(s) de la cadena pesada de interés en VH5-51 (JH4) en lugar de la(s) CDR(s) relevante(s); como, por ejemplo, en SEC ID N°: 50, 54, 58, 62 y 66. Realizaciones específicas en el presente documento proporcionan la(s) CDR(s) de la cadena ligera en Vκ3 A27 (JK1) en lugar de la(s) CDR(s) relevante(s); como, por ejemplo, en SEC ID N°: 70, 74 y 78.

La presente invención engloba moléculas de anticuerpo que son humanas, humanizadas, desinmunizadas, quiméricas y primatizadas. La invención también engloba anticuerpos producidos mediante el procedimiento de inactivación; véase, por ejemplo, Mark y col., 1994 Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 113: The pharmacology of monoclonal Antibodies, Springer-Verlag, pág. 105-134 y la patente de EE.UU. n° 6.797.492. "Humano", en referencia a las moléculas de anticuerpo desveladas específicamente, se refiere a moléculas de anticuerpo que tienen regiones variables y/o constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana, en las que dichas secuencias pueden, pero no necesitan, modificarse/alterarse para tener ciertas sustituciones de aminoácidos o residuos que no están codificados por secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Tales mutaciones pueden introducirse mediante procedimientos que incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis al azar o específica de sitio *in vitro*, o por mutación somática *in vivo*. Ejemplos específicos de técnicas de mutación tratadas en la bibliografía son las desveladas en Gram y col., 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576-3580; Barbas y col., 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3909-3813, y Schier y col., 1996 J. Mol. Biol. 263:551-567. Éstos son solo ejemplos específicos y no representan las únicas técnicas disponibles. Hay una plétora de técnicas de mutación en la bibliografía científica que están disponibles para, y ampliamente apreciadas por, el experto. "Humanizado", en referencia a las moléculas de anticuerpo desveladas, se refiere específicamente a moléculas de anticuerpo en las que las secuencias de CDR derivadas de otras especies de mamífero, tales como un ratón, se injertan sobre secuencias de la región estructural humana. "Primatizado" en referencia a las moléculas de anticuerpo desveladas se refiere a moléculas de anticuerpo en las que las secuencias de CDR de un no primate se insertan en secuencias de la región estructural de primate, véanse, por ejemplo, los documentos WO 93/02108 y WO 99/55369.

Anticuerpos específicos de la presente invención son anticuerpos monoclonales y, en realizaciones particulares, están en uno de los siguientes formatos de anticuerpo: IgD, IgA, IgE, IgM, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o cualquier derivado de cualquiera de los anteriores. El lenguaje "derivados de los mismos" o "derivados" incluye, entre otros, (i) anticuerpos y moléculas de anticuerpo con modificaciones en la región estructural o regiones CDR de una o ambas

regiones variables (es decir, V_H y/o V_L), (ii) anticuerpos y moléculas de anticuerpo con manipulaciones en las regiones constantes de las cadenas pesadas y/o ligeras, y (iii) anticuerpos y moléculas de anticuerpo que contienen restos químicos adicionales que no son normalmente una parte de la molécula de inmunoglobulina (por ejemplo, pegilación).

Las manipulaciones de las regiones variables pueden estar dentro de una o más de las regiones CDR de V_H y/o V_L . La mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis al azar puede realizarse para introducir la(s) mutación (mutaciones) y el efecto sobre la propiedad funcional del anticuerpo de interés puede evaluarse usando puede evaluarse por ensayos *in vitro* o *in vivo* disponibles que incluyen aquellos descritos en el presente documento.

Los anticuerpos de la presente invención también incluyen aquellos en los que se han hecho modificaciones a los residuos de la región estructural dentro de V_H y/o V_L para mejorar una o más propiedades del anticuerpo de interés. Normalmente, tales modificaciones de la región estructural se hacen para reducir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque es "retromutar" uno o más residuos de la región estructural a la secuencia de la línea germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que ha experimentado mutación somática puede contener residuos de la región estructural que se diferencian de la secuencia de la línea germinal de la que se derivó el anticuerpo. Tales residuos pueden identificarse comparando las secuencias de la región estructural del anticuerpo con las secuencias de la línea germinal de las que se deriva el anticuerpo. Tales anticuerpos "retromutados" también pretenden estar englobados por la invención. Otro tipo de modificación de la región estructural implica mutar uno o más residuos dentro de la región estructural, o incluso dentro de una o más regiones CDR, para eliminar epítopes de linfocitos T para así reducir la posible inmunogenicidad del anticuerpo. Este enfoque también se denomina "desinmunización" y se describe en más detalle en la publicación de patente de EE.UU. n° 20030153043 por Carr y col.

Además de o alternativo a modificaciones hechas dentro de la región estructural o regiones CDR, los anticuerpos de la invención pueden manipularse para incluir modificaciones dentro de la región Fc, si está presente, normalmente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tal como semivida en suero, fijación del complemento, unión al receptor de Fc y/o citotoxicidad celular dependiente del antígeno.

En una realización, la región bisagra de C_{H1} se modifica de forma que se altere el número de residuos de cisteína en la región bisagra, por ejemplo, aumente o disminuya, para, por ejemplo, facilitar el ensamblaje de las cadenas ligeras y pesadas o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo. Este enfoque se describe adicionalmente en la patente de EE.UU. n° 5.677.425 por Bodmer y col.

En otra realización, la región bisagra Fc de un anticuerpo se muta para reducir la semivida biológica del anticuerpo. Este enfoque se describe en más detalle en la patente de EE.UU. n° 6.165.745 por Ward y col.

En otra realización, el anticuerpo se modifica para aumentar su semivida biológica. Son posibles diversos enfoques. Por ejemplo, pueden introducirse una o más de una de las siguientes mutaciones: Thr252Leu, Thr254Ser, Thr256Phe, como se describen en la patente de EE.UU. n° 6.277.375 por Ward. Alternativamente, para aumentar la semivida biológica, el anticuerpo puede alterarse dentro de la región C_{H1} o C_L para contener un epítipo de unión al receptor de rescate tomado de dos bucles de un dominio C_{H2} de una región Fc de una IgG, como se describe en las patentes de EE.UU. n° 5.869.046 y 6.121.022 por Presta y col.

En todavía otras realizaciones, la región Fc se altera reemplazando al menos un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido diferente para alterar la(s) función (funciones) efectora(s) del anticuerpo. Por ejemplo, véanse las patentes de EE.UU. n° 5.624.821 y 5.648.260, ambas por Winter y col.

En otro ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácidos 329, 331 y 322 pueden sustituirse con un residuo de aminoácido diferente de forma que el anticuerpo tenga unión a C1q alterada y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida o abolida. Este enfoque se describe en más detalle en la patente de EE.UU. n° 6.194.551 por Idusogie y col.

En otro ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las posiciones de aminoácidos 231 y 239 se modifican para así alterar la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Este enfoque se describe adicionalmente en el documento WO 94/29351 por Bodmer y col.

En otro ejemplo más, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor de $Fc\gamma$ modificando uno o más aminoácidos; véase, por ejemplo, el documento WO 00/42072 por Presta. Además, los sitios de unión sobre IgG1 humana para $Fc\gamma R1$, $Fc\gamma RII$, $Fc\gamma RIII$ y $FcRn$ se han mapeado y se han descrito variantes con unión mejorada (véase Shields y col., J. Biol. Chem. 276:6591-6604, 2001).

Generalmente se ha descrito el concepto de generación de formas de IgG "híbridas" o "combinatorias" que comprenden diversos isotipos de anticuerpo para centrar el objetivo sobre la funcionalidad efectora deseada; véase, por ejemplo, Tao y col., 1991 J. Exp. Med. 173:1025-1028. Una realización específica de la presente invención

engloba moléculas de anticuerpo que poseen manipulaciones específicas en la región Fc que se ha encontrado que producen unión reducida a receptores FcγR o C1q sobre parte del anticuerpo. Por tanto, la presente invención engloba anticuerpos según la presente descripción que no provocan (o provocan a un menor grado) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), citotoxicidad mediada por el complemento (CMC), o forman complejos inmunitarios, mientras que retienen propiedades farmacocinéticas normales (PK). Realizaciones específicas de la presente invención proporcionan una molécula de anticuerpo como se define según la presente invención que incluye, como parte de su estructura de inmunoglobulina, la secuencia expuesta en SEC ID N°: 92. La Figura 16 ilustra una comparación de IgG2m4 (como se describe en la publicación de patente de EE.UU. n° US20070148167(A1)), que contiene SEC ID N°: 92, con la secuencia de aminoácidos de IgG1, IgG2 e IgG4. Un ejemplo específico de la realización anteriormente descrita es una molécula de anticuerpo que incluye SEC ID N°: 94 que posee secuencia basada en un anticuerpo 10G5-6. Otro ejemplo específico de la realización anteriormente descrita es una molécula de anticuerpo que incluye SEC ID N°: 96 que posee secuencia basada en un anticuerpo 10G5H6.

En todavía otra realización, la glicosilación de un anticuerpo se modifica. Por ejemplo, puede prepararse un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación puede alterarse para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tales modificaciones de hidrato de carbono pueden llevarse a cabo por, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia de anticuerpos. Por ejemplo, pueden hacerse una o más sustituciones de aminoácidos que producen eliminación de uno o más sitios de glicosilación de la región estructural de la región variable para así eliminar la glicosilación en ese sitio. Un enfoque tal se describe en más detalle en las patentes de EE.UU. n° 5.714.350 y 6.350.861 por Co y col.

Adicionalmente o alternativamente, puede prepararse 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 elevadas estructuras de GlcNac bisecantes. Se ha demostrado que tales patrones de glicosilación alterados aumentan la capacidad de ADCC de anticuerpos. Tales modificaciones de hidrato de carbono pueden llevarse a cabo, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula huésped con maquinaria de glicosilación alterada. Células con maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la materia y pueden usarse como células huésped en las que expresar anticuerpos recombinantes de la invención para así producir un anticuerpo con glicosilación alterada.

Las moléculas de anticuerpo específicas pueden llevar una marca detectable, o pueden conjugarse con una toxina (por ejemplo, una citotoxina), un isótopo radiactivo, un radionúclido, un liposoma, un resto que elige diana, un biosensor, una cola catiónica o una enzima (por ejemplo, mediante un enlace o ligador de peptidilo). Tales composiciones de moléculas de anticuerpo forman un aspecto adicional de la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de la invención. El ácido nucleico puede estar presente en células completas, en un lisado celular, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico se "aisla" o "convierte en sustancialmente puro" cuando se purifica de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, por ejemplo, usando técnicas convencionales, que incluyen sin limitación, tratamiento alcalino/SDS, bandeo con CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otros procedimientos adecuados conocidos en la técnica. El ácido nucleico puede incluir ADN (incluidos ADNc) y/o ARN. Los ácidos nucleicos de la presente invención pueden obtenerse usando técnicas de biología molecular convencionales. Para anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos que llevan genes de inmunoglobulina humana), los ADNc que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo hechas por el hibridoma pueden obtenerse por técnicas convencionales de amplificación por PCR o clonación de ADNc. Para anticuerpos obtenidos de una biblioteca de genes de inmunoglobulina (por ejemplo, usando técnicas de expresión en fago), el ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede recuperarse de la biblioteca.

En el presente documento se divulga ácido nucleico aislado que codifica las cadenas pesadas y/o ligeras variables desveladas y componentes seleccionados del mismo, particularmente las regiones CDR3 respectivas desveladas. En aspectos específicos del presente documento, la(s) CDR(s) se proporciona(n) dentro de regiones estructurales del anticuerpo. Aspectos específicos proporcionan ácido nucleico aislado que codifica la(s) CDR(s) insertada(s) en las regiones estructurales de la línea germinal. Aspectos específicos en el presente documento proporcionan ácido nucleico aislado que codifica la(s) CDR(s) de la cadena pesada insertada(s) en una línea germinal VH5-51 (JH4) en lugar del ácido nucleico que codifica la(s) CDR(s) correspondiente(s); como, por ejemplo, en SEC ID N°: 52, 56, 60, 64 y 68. Aspectos específicos en el presente documento proporcionan ácido nucleico aislado que codifica la(s) CDR(s) de la cadena ligera insertada(s) en la línea germinal VK3 A27 (JK1) en lugar del ácido nucleico que codifica la(s) CDR(s) correspondiente(s); como, por ejemplo, en SEC ID N°: 72, 76 y 80. El ácido nucleico aislado que codifica las regiones variables pueden proporcionarse dentro de cualquier formato de molécula de anticuerpo deseado que incluye, pero no se limita a, el siguiente: F(ab')₂, un Fab, un Fv, un scFv, moléculas de anticuerpo biespecífico (moléculas de anticuerpo que comprende un anticuerpo específico de IL-13Rα1 o fragmento de unión al antígeno como se desvela en el presente documento ligado a un segundo resto funcional que tiene una especificidad de unión diferente que el anticuerpo, que incluye, sin limitación, otro péptido o proteína tal como un anticuerpo, o ligando de receptor), un dímero de Fv monocatenario específico, un minicuerpo, un fragmento dAb, diacuerpo,

triacuerpo o tetracuerpo, IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgD, IgA, IgE o cualquier derivado de los mismos.

Aspectos específicos proporcionan un ácido nucleico aislado que codifica una molécula de anticuerpo que incluye una cadena pesada que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 52, SEC ID N°: 56, SEC ID N°: 60, SEC ID N°: 64 y SEC ID N°: 68. Aspectos específicos proporcionan un ácido nucleico aislado que codifica una molécula de anticuerpo que incluye un dominio variable de la cadena pesada que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 43, SEC ID N°: 53, SEC ID N°: 57, SEC ID N°: 61, SEC ID N°: 65 y SEC ID N°: 69. En el presente documento se divulga un ácido nucleico aislado que codifica una molécula de anticuerpo que incluye (i) secuencia de nucleótidos de CDR1 de la cadena pesada SEC ID N°: 106, (ii) secuencia de nucleótidos de CDR2 de la cadena pesada SEC ID N°: 107, y/o (iii) secuencia de nucleótidos de CDR3 de la cadena pesada SEC ID N°: 108 o SEC ID N°: 112. Aspectos específicos proporcionan un ácido nucleico aislado que codifica una molécula de anticuerpo que incluye una cadena ligera que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 72, SEC ID N°: 76 y SEC ID N°: 80. Aspectos específicos proporcionan un ácido nucleico aislado que codifica una molécula de anticuerpo que incluye un dominio variable de la cadena ligera que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 47, SEC ID N°: 73, SEC ID N°: 77 y SEC ID N°: 81. En el presente documento se divulga un ácido nucleico aislado que codifica una molécula de anticuerpo que incluye (i) secuencia de nucleótidos de CDR1 de la cadena ligera SEC ID N°: 109 o SEC ID N°: 123, (ii) secuencia de nucleótidos de CDR2 de la cadena ligera SEC ID N°: 110, y/o (iii) secuencia de nucleótidos de CDR3 de la cadena ligera SEC ID N°: 111 o SEC ID N°: 113. En el presente documento se desvela un ácido nucleico que codifica una molécula de anticuerpo que posee manipulaciones en la región Fc que producen unión reducida a receptores FcγR o C1q sobre la parte del anticuerpo. Una realización específica de la presente invención es un ácido nucleico aislado que incluye SEC ID N°: 93. Un ejemplo específico de tal realización es una molécula de anticuerpo que incluye la secuencia de SEC ID N°: 95, o ácido nucleico que codifica un fragmento de unión al antígeno de SEC ID N°: 94. En realizaciones específicas, moléculas de anticuerpo sintéticas pueden producirse por expresión de ácido nucleico generado a partir de oligonucleótidos sintetizados y ensamblados dentro de vectores de expresión adecuados; véase, por ejemplo, Knappick y col., 2000 J. Mol. Biol. 296:57-86, y Krebs y col., 2001 J. Immunol. Methods 254:67-84.

También se incluyen dentro de la presente invención ácidos nucleicos que incluyen secuencias de nucleótidos que son al menos aproximadamente el 90 % idénticas y más preferentemente al menos aproximadamente el 95 % idénticas a las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento, y cuyas secuencias de nucleótidos codifican anticuerpos de la presente invención. Los procedimientos de comparación de secuencias para determinar la identidad son conocidos para aquellos expertos en la materia e incluyen aquellos tratados anteriormente. Referencia a "al menos aproximadamente el 90 % idéntico" incluye al menos aproximadamente el 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o el 100 % idéntico.

En el presente documento también se divulgan ácidos nucleicos que se hibridan con el complemento de ácido nucleico desvelado en el presente documento (por ejemplo, el complemento de ácido nucleico que incluye (i) secuencia de nucleótidos de la cadena pesada SEC ID N°: 52, SEC ID N°: 56, SEC ID N°: 60, SEC ID N°: 64, SEC ID N°: 68 o SEC ID N°: 95, (ii) secuencia de nucleótidos de V_H SEC ID N°: 43, SEC ID N°: 53, SEC ID N°: 57, SEC ID N°: 61, SEC ID N°: 65 o SEC ID N°: 69; (iii) secuencia de nucleótidos de CDR1 de la cadena pesada SEC ID N°: 106, (iv) secuencia de nucleótidos de CDR2 de la cadena pesada SEC ID N°: 107, (v) secuencia de nucleótidos de CDR3 de la cadena pesada SEC ID N°: 108 o SEC ID N°: 112, (vi) secuencia de nucleótidos de la cadena ligera SEC ID N°: 72, SEC ID N°: 76 o SEC ID N°: 80, (vii) secuencia de nucleótidos de V_L SEC ID N°: 47, SEC ID N°: 73, SEC ID N°: 77 o SEC ID N°: 81, (viii) secuencia de nucleótidos de CDR1 de la cadena ligera SEC ID N°: 109 o SEC ID N°: 123, (ix) secuencia de nucleótidos de CDR2 de la cadena ligera SEC ID N°: 110, o (x) secuencia de nucleótidos de CDR3 de la cadena ligera que comprende SEC ID N°: 111 o SEC ID N°: 113) bajo condiciones de hibridación particulares, cuyos ácidos nucleicos codifican moléculas de anticuerpo que se unen específicamente a hIL-13Rα1 y antagonizan la actividad mediada por IL-13Rα1. Los procedimientos para hibridar ácidos nucleicos son muy conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 6.3.1-6.3.6, 1989. Como se define en el presente documento, condiciones de hibridación moderadamente rigurosas pueden usar una disolución de prelavado que contiene 5X cloruro sódico/citrato de sodio (SSC), 0,5 % en peso/volumen de SDS, EDTA 1,0 mM (pH 8,0), tampón de hibridación de aproximadamente 50 % en v/v de formamida, 6X SSC, y una temperatura de hibridación de 55 °C (u otras disoluciones de hibridación similares, tales como aquellas que contienen aproximadamente 50 % en v/v de formamida, con una temperatura de hibridación de 42 °C), y condiciones de lavado de 60 °C, en 0,5X SSC, 0,1 % en peso/volumen de SDS. Una condición de hibridación rigurosa puede ser 6X SSC a 45 °C, seguido de uno o más lavados en 0,1X SSC, 0,2 % de SDS a 68 °C. Además, un experto en la materia puede manipular la hibridación y/o condiciones de lavado para aumentar o disminuir la rigurosidad de hibridación de forma que ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos que son al menos el 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 o el 99 % idénticas entre sí normalmente sigan hibridadas entre sí. Los parámetros básicos que afectan la elección de condiciones de hibridación y orientación para idear condiciones adecuadas se exponen por Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, Capítulos 9 y 11. 1989; y Ausubel y col. (eds). Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., secciones 2.10 y 6.3-6.4, 1995, y puede determinarse fácilmente por aquellos expertos habituales en la materia basándose en, por ejemplo, la longitud y/o composición de bases del ADN.

En el presente documento se desvelan anticuerpos aislados que incluyen un dominio variable de la cadena ligera y/o pesada que está codificado al menos en parte por una secuencia de nucleótidos que se hibrida bajo condiciones moderadamente rigurosas con el complemento de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un dominio variable de la cadena ligera y/o pesada desvelado en el presente documento (por ejemplo, seleccionado del grupo que consiste en SEC ID N°: 43, SEC ID N°: 47, SEC ID N°: 53, SEC ID N°: 57, SEC ID N°: 61, SEC ID N°: 65, SEC ID N°: 69, SEC ID N°: 73, SEC ID N°: 77 y SEC ID N°: 81). En el presente documento también se desvelan anticuerpos aislados que incluyen un dominio variable de la cadena ligera y/o pesada que está codificado al menos en parte por una secuencia de nucleótidos que se hibrida bajo condiciones rigurosas con el complemento de una secuencia de ácidos nucleicos que comprende un dominio variable de la cadena ligera y/o pesada desvelado en el presente documento.

En otro aspecto, la presente invención proporciona vectores que incluyen dicho ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención. Vectores según la presente invención incluyen, pero no se limitan a, plásmidos y otras construcciones de expresión (por ejemplo, fago o fagémido, según convenga) adecuadas para la expresión de la molécula de anticuerpo deseada al nivel apropiado para el fin previsto; véase, por ejemplo, Sambrook & Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Para la mayoría de los fines de clonación pueden usarse vectores de ADN. Vectores típicos incluyen plásmidos, virus modificados, bacteriófago, cósmidos, cromosomas artificiales de levadura, y otras formas de ADN episómico o integrado. Está perfectamente dentro del alcance del experto determinar un vector apropiado para una transferencia de genes particular, generación de un anticuerpo humano recombinante, u otro uso. En realizaciones específicas, además de un gen recombinante, el vector también puede contener un origen de replicación para la replicación autónoma en una célula huésped, secuencias reguladoras apropiadas tales como un promotor, una secuencia de terminación, una secuencia de poliadenilación, una secuencia potenciadora, un marcador de selección, un número limitado de sitios útiles de enzimas de restricción, otras secuencias según convenga y las posibilidades de alto número de copias. Ejemplos de vectores de expresión para la producción de anticuerpos y de fragmentos de anticuerpo son muy conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, Persic y col., 1997 *Gene* 187:9-18; Boel y col., 2000 *J. Immunol. Methods* 239:153-166, y Liang y col., 2001 *J. Immunol. Methods* 247:119-130. Si se desea, el ácido nucleico que codifica un anticuerpo puede integrarse en el cromosoma huésped usando técnicas muy conocidas en la técnica; véase, por ejemplo, Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, 1999, y Marks y col., documento WO 95/17516. Los ácidos nucleicos también pueden expresarse sobre plásmidos mantenidos episómicamente o incorporados en un cromosoma artificial; véanse, por ejemplo, Csonka y col., 2000 *J. Cell Science* 113:3207-3216; Vanderbyl y col., 2002 *Molecular Therapy* 5:10. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en vector separado o, más normalmente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión mediante procedimientos convencionales (por ejemplo, ligación de sitios de restricción complementarios sobre el fragmento del gen del anticuerpo y vector, o ligación de extremos romos si no están presentes sitios de restricción). Las regiones variables de la cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos en el presente documento pueden usarse para crear genes de anticuerpos de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo insertándolos en vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de la cadena pesada y constantes de la cadena ligera del isotipo deseado de forma que el segmento de V_H esté operativamente ligado al (a los) segmento(s) de C_H dentro del vector y el segmento de V_L esté operativamente ligado al segmento de C_L dentro del vector. Adicionalmente o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena del anticuerpo de una célula huésped. El gen de la cadena del anticuerpo puede clonarse en el vector de forma que el péptido señal se ligue en marco con el extremo amino del gen de cadena del anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o una señal de péptido heteróloga (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulina). Cualquier técnica disponible para el experto puede emplearse para introducir el ácido nucleico en la célula huésped; véase, por ejemplo, Morrison, 1985 *Science*, 229:1202. Son muy conocidos procedimientos de subclonación de moléculas de ácidos nucleicos de interés en vectores de expresión, células huésped transformantes o transfectantes que contienen los vectores, y procedimientos de preparación de proteína sustancialmente pura que incluyen las etapas de introducir el vector de expresión respectivo en una célula huésped, y cultivar la célula huésped bajo condiciones apropiadas. El anticuerpo así producido puede recogerse de las células huésped en formas convencionales. Técnicas adecuadas para la introducción de ácido nucleico en células de interés dependerán del tipo de célula que se use. Técnicas generales incluyen, pero no se limitan a, transfección con fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, transfección y transducción mediada por liposomas usando virus apropiados a la línea celular de interés (por ejemplo, retrovirus, variolovacuna, baculovirus o bacteriófago).

En otro aspecto, la presente invención proporciona célula(s) aislada(s) que incluye(n) ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención. Puede usarse una variedad de líneas celulares diferentes para la producción recombinante de moléculas de anticuerpo, que incluyen, pero no se limitan a, aquellas de organismos procariotas (por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus* y *Streptomyces*) y de eucariotas (por ejemplo, levadura, baculovirus y de mamífero); véase, por ejemplo, Breitling y col., *Recombinant Antibodies*, John Wiley & Sons, Inc. y Spektrum Akademischer Verlag, 1999. Células vegetales, que incluyen plantas transgénicas, y células animales, que incluyen animales transgénicos (distintos de seres humanos), que incluyen el ácido nucleico o moléculas de anticuerpo desveladas en el presente documento también se contemplan como parte de la presente invención. Líneas celulares de mamífero adecuadas que incluyen, pero no se limitan a, aquellas derivadas de células de ovario de hámster chino (CHO), que

incluyen, pero no se limitan a, células DHFR-CHO (descritas en Urlaub y Chasin, 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220) usadas, por ejemplo, con un marcador de selección DHFR (por ejemplo, como se describe en Kaufman y Sharp, 1982 Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NS0 (en las que puede usarse un sistema de expresión de GS como se describe en los documentos WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338.841), células COS, células SP2, células HeLa, células de riñón de hámster bebé, células de mieloma de rata YB2/O, células de riñón embrionario humano, células de retina embrionaria humana y otras que alojan el ácido nucleico o moléculas de anticuerpo desveladas en el presente documento forman realizaciones adicionales de la presente invención. Realizaciones específicas de la presente invención pueden emplear *E. coli*; véase, por ejemplo, Plückthun, 1991 Bio/Technology 9:545-551, o levadura, tal como *Pichia*, y derivados recombinantes de los mismos (véase, por ejemplo, Li y col., 2006 Nat. Biotechnol. 24:210-215). Realizaciones específicas adicionales de la presente invención pueden emplear células eucariotas para la producción de moléculas de anticuerpo, véanse, Chadd & Chamow, 2001 Current Opinion in Biotechnology 12:188-194, Andersen & Krummen, 2002 Current Opinion in Biotechnology 13:117, Larrick & Thomas, 2001 Current Opinion in Biotechnology 12:411-418. Realizaciones específicas de la presente invención pueden emplear células de mamífero que puede producir moléculas de anticuerpo con modificaciones postraduccionales apropiadas. Las modificaciones postraduccionales incluyen, pero ni mucho menos se limitan a, formación de enlace disulfuro y glicosilación. Otro tipo de modificación postraducciona es la escisión de señales de péptido. Realizaciones específicas en el presente documento tienen la glicosilación apropiada; véase, por ejemplo, Yoo y col., 2002 J. Immunol. Methods 261:1-20. Anticuerpos que se producen naturalmente contienen al menos un hidrato de carbono ligado en N unido a una cadena pesada. Ídem. Pueden usarse diferentes tipos de células huésped de mamífero para proporcionar eficaces modificaciones postraduccionales. Ejemplos de tales células huésped incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), HeLa, C6, PC12 y de mieloma; véanse, Yoo y col., 2002 J. Immunol. Methods 261:1-20, y Persic y col., 1997 Gene 187:9-18.

En otro aspecto, la presente invención proporciona célula(s) aislada(s) que comprende(n) un anticuerpo de la presente invención.

En otro aspecto, en el presente documento se desvela un procedimiento de preparación de una molécula de anticuerpo de la presente invención, que implica incubar una célula que aloja un ácido nucleico que codifica una cadena pesada y/o ligera (impuesta por la molécula de anticuerpo deseada) con especificidad por IL-13R α 1 humano en condiciones que permiten la expresión y ensamblaje de dichas cadenas pesadas y/o ligeras en una molécula de anticuerpo, y aislar dicha molécula de anticuerpo de la célula. Un ejemplo por el que generar la secuencia de la cadena pesada y/o ligera deseada es amplificar primero (y modificar) las secuencias variables de la cadena pesada y/o ligera de la línea germinal usando PCR. La secuencia de la línea germinal para regiones variables pesadas y/o ligeras humanas está fácilmente disponible para el experto, véanse, por ejemplo, la base de datos de secuencias de la línea germinal humana "Vbase", y Kabat, E.A. y col., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, Departamento Estadounidense de Salud y Servicios Humanos, Publicación del NIH nº 91-3242; Tomlinson, I.M. y col., 1992 "The Repertoire of Human Germline VH Sequences Reveals about Fifty Groups of VH Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227:776-798; y Cox, J.P.L. y col., 1994 "A Directory of Human Germline V κ Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" Eur. J. Immunol. 24:827-836. La mutagénesis de las secuencias de la línea germinal pueden llevarse a cabo usando procedimientos convencionales, por ejemplo, mutagénesis mediada por PCR en la que las mutaciones se incorporan en los cebadores de PCR, o mutagénesis dirigida al sitio. Si se desean anticuerpos de longitud completa, la secuencia está disponible para los genes de la región constante de la cadena pesada humana; véase, por ejemplo, Kabat, E.A. y col., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, Departamento Estadounidense de Salud y Servicios Humanos, Publicación del NIH nº 91-3242. Los fragmentos que contienen estas regiones pueden obtenerse, por ejemplo, por amplificación por PCR convencional. Alternativamente, al experto pueden serle útiles vectores que ya codifican regiones constantes de la cadena pesada y/o ligera.

Existen técnicas disponibles para producir recombinantemente otras moléculas de anticuerpo que retienen la especificidad de un anticuerpo original. Un ejemplo específico de esto es cuando el ADN que codifica la región variable de inmunoglobulina o las CDR se introduce en las regiones constantes, o regiones constantes y regiones estructurales, de otra molécula de anticuerpo; véanse, por ejemplo, los documentos EP-184.187, GB 2188638 y EP-239400, y la bibliografía científica en el área. La clonación y expresión de moléculas de anticuerpo, que incluyen anticuerpos quiméricos, se describe en la bibliografía; véanse, por ejemplo, los documentos EP 0120694 y EP 0125023, y otra bibliografía científica en el área.

Pueden producirse anticuerpos adicionales según la presente invención y luego seleccionarse para las características identificadas en el presente documento usando técnicas conocidas. Técnicas básicas para la preparación de anticuerpos monoclonales se describen en la bibliografía, véase, por ejemplo, Kohler y Milstein (1975, Nature 256:495-497). Anticuerpos monoclonales completamente humanos se producen por procedimientos disponibles. Estos procedimientos incluyen, pero ni mucho menos se limitan a, el uso de cepas de ratón genéticamente manipuladas que poseen un sistema inmunitario por el cual los genes del anticuerpo de ratón se han inactivado y a su vez sustituido con un repertorio de genes de anticuerpos humanos funcionales, mientras que dejan otros componentes del sistema inmunitario del ratón sin cambiar. Tales ratones genéticamente manipulados permiten la respuesta inmunitaria *in vivo* natural y el procedimiento de maduración por afinidad que produce anticuerpos monoclonales humanos completos de alta afinidad. Esta tecnología es muy conocida en la materia y se

detalla completamente en diversas publicaciones que incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. n° 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; 5.770.249 (cedida a GenPharm International y disponible mediante Medarex, bajo la protección del "sistema de desarrollo de anticuerpos humanos UltraMab"); además de las patentes de EE.UU. n° 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y miembros de familia relacionados (cedida a Abgenix, que desvela su XENOMOUSE®). Véanse también las revisiones de Kellerman y Green, 2002 Curr. Opin. in Biotechnology 13:593-597, y Kontermann & Stefan, 2001 Antibody Engineering, Springer Laboratory Manuals.

Alternativamente, una biblioteca de fragmentos de unión al antígeno según la presente invención puede ponerse en contacto con IL-13R α 1, y puede demostrarse la unión al nivel prescrito, por ejemplo, que presenta una K_D con el antígeno que es inferior a 200 pM y la capacidad para antagonizar actividad mediada por IL-13R α 1 seleccionada. Están disponibles técnicas para el experto para la selección de fragmentos de anticuerpos de bibliotecas usando tecnologías de enriquecimiento que incluyen, pero no se limitan a, expresión en fago (por ejemplo, véase la tecnología de Cambridge Antibody Technology (CAT) desvelada en las patentes de EE.UU. n° 5.565.332; 5.733.743; 5.871.907; 5.872.215; 5.885.793; 5.962.255; 6.140.471; 6.225.447; 6.291.650; 6.492.160; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915; 6.593.081, además de otros miembros de la familia de EE.UU. y/o solicitudes que se basan en la presentación de prioridad GB 9206318, presentada el 24 de mayo de 1992; véase también Vaughn y col., 1996, Nature Biotechnology 14:309-314), expresión en ribosomas (véase, por ejemplo, Hanes y Pluckthün, 1997 Proc. Natl. Acad. Sci. 94:4937-4942), expresión bacteriana (véase, por ejemplo, Georgiou, y col., 1997 Nature Biotechnology 15:29-34) y/o expresión en levadura (véase, por ejemplo, Kieke y col., 1997 Protein Engineering 10:1303-1310). Una biblioteca, por ejemplo, puede expresarse sobre la superficie de partículas de bacteriófago, codificando el ácido nucleico los fragmentos de unión al antígeno expresados y mostrados sobre su superficie. Los ácidos nucleicos pueden entonces aislarse de partículas de bacteriófago que presentan el nivel deseado de actividad y los ácidos nucleicos usados en el desarrollo de moléculas de anticuerpo. También pueden usarse clones individuales de la cadena pesada o ligera según la presente divulgación para cribar cadenas pesadas o ligeras complementarias, respectivamente, que pueden interaccionar con las mismas para formar una molécula de cadenas pesadas y ligeras combinadas; véase, por ejemplo, el documento WO 92/01047. La expresión en fago se ha descrito en la bibliografía; véase, por ejemplo, Kontermann & Stefan, arriba, y el documento WO 92/01047.

Los anticuerpos monoclonales (mAb) pueden purificarse por técnicas disponibles para un experto en la materia. Títulos de anticuerpos del ascitis relevante, líquidos de cultivo de hibridomas, o muestra de prueba de interés, pueden determinarse por diversos ensayos serológicos o inmunológicos que incluyen, pero no se limitan a, precipitación, aglutinación pasiva, técnicas de anticuerpos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA) y técnicas de radioinmunoensayo (RIA).

En otro aspecto, en el presente documento se divulga un procedimiento de antagonización de la actividad de IL-13R α 1 que implica poner en contacto una célula que expresa IL-13R α 1 con una molécula de anticuerpo desvelada en el presente documento en condiciones que permiten que dicha molécula de anticuerpo se una a IL-13R α 1. Aspectos específicos de la presente divulgación incluyen procedimientos tales en los que la célula es una célula humana.

En otro aspecto, la presente divulgación propociona un procedimiento de antagonización de la actividad de IL-13R α 1 en un sujeto que presenta una afección asociada a actividad de IL-13R α 1, que implica administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de anticuerpo de la presente invención. "Antagonizar" en el presente documento se refiere al acto de oponer, contrarrestar o acortar una o más funciones de la diana, sea esa la unión, señalización u otra. La inhibición o antagonismo de una o más de las propiedades funcionales de IL-13R α 1 puede determinarse fácilmente según metodologías conocidas en la técnica, además de aquellas descritas en el presente documento. Además, se entenderá que tal inhibición o antagonismo debe efectuar una disminución en la actividad particular con respecto a la observada en ausencia del anticuerpo o, por ejemplo, la observada cuando está presente un anticuerpo de control de especificidad irrelevante. Preferentemente, una molécula de anticuerpo según la presente invención antagoniza el funcionamiento de IL-13R α 1 mediado por IL-13 y/o IL-4 hasta el punto que haya una disminución de al menos el 10 % del parámetro medido, y más preferentemente, una disminución de al menos el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, el 90 % y el 95 % del parámetro medido. Tal inhibición/antagonismo del funcionamiento de IL-13R α 1 es particularmente eficaz en aquellos casos en los que el funcionamiento del receptor esté contribuyendo al menos en parte a un fenotipo particular, enfermedad, trastorno o afección que está afectando negativamente al sujeto.

También se contemplan procedimientos de uso de las moléculas de anticuerpo desveladas en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección mediada por IL-13R α 1. Así, en otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéuticamente aceptable que comprende una molécula de anticuerpo de la invención y un vehículo, excipiente, diluyente, estabilizador, tampón farmacéuticamente aceptable, o alternativa diseñada para facilitar la administración de la molécula de anticuerpo en el formato y cantidad deseados al individuo tratado. Las moléculas de anticuerpo desveladas en el presente documento pueden usarse en un procedimiento de tratamiento o diagnóstico de un individuo particular (ser humano o primate). El procedimiento de tratamiento puede ser de naturaleza profiláctica o terapéutica. Los procedimientos de tratamiento

según la presente invención incluyen administrar a un individuo una cantidad terapéuticamente (o profilácticamente) eficaz de una molécula de anticuerpo de la presente invención. Cantidad "terapéuticamente eficaz" o "profilácticamente eficaz" se refiere a la cantidad necesaria a la dosificación prevista para lograr el efecto terapéutico/profiláctico deseado durante el periodo de tiempo deseado. El efecto deseado puede ser, por ejemplo, mejora de al menos un síntoma asociado a la afección tratada. Estas cantidades variarán, como apreciará el experto, según diversos factores, que incluyen, pero no se limitan a, el estado de enfermedad, edad, sexo y peso del individuo y la capacidad de la molécula de anticuerpo para provocar el efecto deseado en el individuo. La respuesta puede documentarse por ensayo *in vitro*, estudios de animal no humano *in vivo*, y/o respaldarse adicionalmente de ensayos clínicos. La composición farmacéutica basada en anticuerpo de la presente invención puede formularse por cualquier número de estrategias conocidas en la técnica, véase, por ejemplo, McGoff y Scher, 2000 Solution Formulation of Proteins/Peptides, en: McNally, E.J., ed. Protein Formulation and Delivery, New York, NY: Marcel Dekker; pág. 139-158; Akers & Defilippis, 2000, Peptides and Proteins as Parenteral Solutions, en: Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, Philadelphia, PA: Taylor y Francis; pág. 145-177; Akers y col., 2002, Pharm. Biotechnol. 14:47-127. Una composición farmacéuticamente aceptable adecuada para la administración al paciente contendrá una cantidad eficaz de la molécula de anticuerpo en una formulación que tanto retiene la actividad biológica mientras que también promueve la máxima estabilidad durante el almacenamiento dentro de un intervalo de temperatura aceptable.

La composición farmacéuticamente aceptable basada en anticuerpos puede ser estar en forma líquida o sólida. Puede utilizarse cualquier técnica para la producción de formulaciones líquidas o sólidas. Tales técnicas están perfectamente dentro del ámbito de las capacidades del experto. Las formulaciones sólidas pueden producirse por cualquier procedimiento disponible que incluye, pero no se limita a, liofilización, secado por pulverización o secado por tecnología de fluidos supercríticos. Las formulaciones sólidas para administración por vía oral pueden estar en cualquier forma que convierta la molécula de anticuerpo en accesible al paciente en la cantidad prescrita y dentro del periodo de tiempo prescrito. La formulación oral puede tomar la forma de varias formulaciones sólidas que incluyen, pero no se limitan a, un comprimido, cápsula o polvo. Las formulaciones sólidas pueden liofilizarse alternativamente y disolverse antes de la administración para tanto dosificación individual como múltiple. Las composiciones de anticuerpo deben formularse generalmente dentro de un intervalo de pH biológicamente relevante y pueden tamponarse para mantener un intervalo de pH apropiado durante el almacenamiento. Tanto las formulaciones líquidas como sólidas generalmente requieren almacenamiento a menores temperaturas (por ejemplo, 2-8 °C) con el fin de retener la estabilidad durante periodos más largos. Las composiciones de anticuerpo formuladas, especialmente formulaciones líquidas, pueden contener un bacteriostático para prevenir o minimizar la proteólisis durante el almacenamiento, que incluye, pero no se limita a, concentraciones eficaces (por ejemplo, ≤ 1 % en peso/volumen) de alcohol bencílico, fenol, m-cresol, clorobutanol, metilparabeno y/o propilparabeno. Un bacteriostático puede contraindicarse para algunos pacientes. Por tanto, una formulación liofilizada puede reconstituirse en una disolución que tanto contiene como que no contiene un componente tal. Componentes adicionales pueden añadirse a tanto una formulación de anticuerpo líquida como sólida tamponada, que incluyen, pero no se limita a, azúcares como crioprotector (que incluyen, pero no se limitan a, polihidroxihidrocarburos tales como sorbitol, manitol, glicerol y dulcitol y/o disacáridos tales como sacarosa, lactosa, maltosa o trehalosa) y, en algunos casos, una sal relevante (que incluyen, pero no se limitan a, NaCl, KCl o LiCl). Tales formulaciones de anticuerpo, especialmente formulaciones líquidas seleccionadas para almacenamiento a largo plazo, se basarán en un intervalo útil de osmolaridad total para tanto promover la estabilidad a largo plazo a temperaturas de, por ejemplo, 2-8 °C o superiores, mientras que también se hace la formulación útil para inyección parenteral. Según convenga pueden incluirse conservantes, estabilizadores, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos. Las formulaciones pueden contener un catión divalente (que incluye, pero no se limita a, $MgCl_2$, $CaCl_2$ y $MnCl_2$); y/o un tensioactivo no iónico (que incluye, pero no se limita a, Polysorbate-80 (TWEEN 80™), Polysorbate-60 (TWEEN 60™), Polysorbate-40 (TWEEN 40™) y Polysorbate-20 (TWEEN 20™), poli(éteres de oxietilenaalquilo) que incluyen, pero no se limitan a, BRIJ 58™, BRIJ 35™, además de otros tales como TRITON X-100™, TRITON X-114™, NP40™, Span 85 y la serie PLURONIC® de tensioactivos no iónicos (por ejemplo, PLURONIC® 121). Cualquier combinación de tales componentes forma realizaciones específicas de la presente invención.

Composiciones farmacéuticas en formato líquido pueden incluir un vehículo líquido, por ejemplo, agua, petróleo, aceite animal, aceite vegetal, aceite mineral o aceite sintético. El formato líquido también puede incluir solución salina fisiológica, dextrosa u otra disolución de sacárido o glicoles, tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

La composición farmacéutica puede estar en forma de una disolución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógenos con pH adecuado, tonicidad y estabilidad. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para administración después de dilución en vehículos isotónicos, por ejemplo, inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer o inyección de Ringer con lactato.

La dosificación de agentes terapéuticos de anticuerpos está perfectamente dentro del ámbito del experto, véanse, por ejemplo, Lederman y col., 1991 Int. J. Cancer 47:659-664; Bagshawe y col., 1991 Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4:915-922, y variará basándose en varios factores que incluyen, pero no se limitan a, la molécula de anticuerpo utilizada, el paciente que está tratándose, la afección del paciente, el área que está tratándose, la vía de administración y el tratamiento deseado. Un médico o veterinario experto puede determinar

fácilmente y prescribir la cantidad terapéutica eficaz del anticuerpo. Los intervalos de dosificación pueden ser de aproximadamente 0,01 a 100 mg/kg, y más normalmente de 0,05 a 25 mg/kg, del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser 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. Para los fines de ilustración, y no limitación, en realizaciones específicas, una dosis de 5 mg a 2,0 g puede utilizarse para administrar la molécula de anticuerpo sistémicamente. La precisión óptima en conseguir concentraciones de anticuerpo dentro de un intervalo que da eficacia sin toxicidad requiere una pauta basada en la cinética de la disponibilidad del fármaco para el (los) sitio(s) diana. Esto implica una consideración de la distribución, equilibrio y eliminación de la molécula de anticuerpo. Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden usarse solos a dosificaciones apropiadas. Alternativamente, la co-administración o administración secuencial de otros agentes puede ser deseable. Será posible presentar una pauta de dosificación terapéutica para las moléculas de anticuerpo de la presente invención conjuntamente con pautas de tratamiento alternativas. Individuos (sujetos) capaces de tratamiento incluyen primates, humanos y no humanos, e incluyen cualquier mamífero no humano o vertebrado de importancia veterinaria comercial o doméstica.

La molécula de anticuerpo podría administrarse a un individuo por cualquier vía de administración apreciada en la materia, que incluye, pero no se limita a, administración por vía oral, administración mediante inyección (realizaciones específicas de las cuales incluyen inyección intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular), administración por inhalación, administración intranasal o tópica, tanto sola como en combinación con otros agentes diseñados para ayudar en el tratamiento del individuo. La vía de administración debe determinarse basándose en varias consideraciones apreciadas por el experto que incluyen, pero no se limitan a, las características fisicoquímicas deseadas del tratamiento. El tratamiento puede proporcionarse diariamente, semanalmente, bisemanalmente o mensualmente, o cualquier otra pauta que administre la cantidad apropiada de la molécula de anticuerpo al individuo en los momentos prescritos de forma que se efectúe el tratamiento deseado y se mantenga. Las formulaciones pueden administrarse en una dosis única o en más de una dosis en momentos separados.

En realizaciones particulares, la afección tratada está seleccionada del grupo que consiste en asma, alergia, rinitis alérgica, sinusitis crónica, fiebre del heno, dermatitis atópica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis pulmonar, eosinofilia esofágica, psoriasis, artritis psoriásica, fibrosis, esclerodermia, enfermedad inflamatoria del intestino (particularmente, colitis ulcerosa), anafilaxia y cáncer (particularmente, linfoma de Hodgkin, glioma y carcinoma renal), y trastornos/afecciones mediados por Th2 generales.

La presente divulgación proporciona además la administración de las moléculas de anticuerpo anti-hIL-13R α 1 desveladas para los fines de terapia génica. En un procedimiento tal, las células de un sujeto se transformarían con ácido nucleico que codifica las moléculas de anticuerpo de la invención. Sujetos que comprenden los ácidos nucleicos producirán entonces las moléculas de anticuerpo endógenamente. Previamente, Alvarez, y col., Clinical Cancer Research 6:3081-3087, 2000, introdujeron anticuerpos anti-ErbB2 monocatenarios a sujetos usando un enfoque de terapia génica. Los procedimientos desvelados por Alvarez y col. pueden adaptarse fácilmente para la introducción de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo anti-hIL-13R α 1 de la invención a un sujeto.

Los ácidos nucleicos que codifican cualquier polipéptido o molécula de anticuerpo de la invención pueden introducirse a un sujeto. En realizaciones específicas, la molécula de anticuerpo es un anticuerpo monocatenario humano.

Los ácidos nucleicos pueden introducirse a las células de un sujeto mediante cualquier medio conocido en la técnica. En realizaciones específicas, los ácidos nucleicos se introducen como parte de un vector viral. Ejemplos de virus particulares de los que los vectores pueden derivarse incluyen lentivirus, virus del herpes, adenovirus, virus adeno-asociados, virus de la variolovacuna, baculovirus, alfavirus, virus de la gripe, y otros virus recombinantes con tropismo celular deseable.

Diversas empresas producen vectores virales comercialmente, que incluyen, pero ni mucho menos se limitan a, AVIGEN, Inc. (Alameda, CA; vectores AAV), Cell Genesys (Foster City, CA; vectores retrovirales, adenovirales, AAV, y vectores lentivirales), CLONTECH (vectores retrovirales y baculovirales), Genovo, Inc. (Sharon Hill, PA; vectores adenovirales y AAV), GENVEC (vectores adenovirales), IntroGene (Leiden, Los Países Bajos; vectores adenovirales), Molecular Medicine (vectores retrovirales, adenovirales, AAV y virales del herpes), Norgen (vectores adenovirales), Oxford BioMedica (Oxford, Reino Unido; vectores lentivirales) y Transgene (Estrasburgo, Francia; vectores adenovirales, de la variolovacuna, retrovirales y lentivirales).

Se conocen en la técnica procedimientos de construcción y uso de vectores virales (véase, por ejemplo, Miller y col., BioTechniques 7:980-990, 1992). En realizaciones específicas, los vectores virales son defectuosos en la replicación, es decir, son incapaces de replicarse autónomamente, y así no son infecciosos, en la célula diana. El virus defectuoso en la replicación puede ser un virus mínimo, es decir, retiene solo las secuencias de su genoma que son necesarias para encapsidar el genoma para producir partículas virales. También pueden usarse virus defectuosos que carecen completamente o casi completamente de genes virales. El uso de vectores virales defectuosos permite la administración a células en un área localizada específica, sin implicación de que el vector pueda infectar otras células. Así, un tejido específico puede elegirse específicamente como diana.

Ejemplos de vectores que comprenden secuencias de virus de ADN atenuadas o defectuosas incluyen, pero no se limitan a, un vector del virus del herpes defectuoso (Kanno y col., *Cancer Gen. Ther.* 6:147-154, 1999; Kaplitt y col., *J. Neurosci. Meth.* 71:125-132, 1997 y Kaplitt y col., *J. Neuro Onc.* 19:137-147, 1994).

Los adenovirus son virus de ADN eucariotas que pueden modificarse para administrar eficazmente un ácido nucleico de la invención a una variedad de tipos de células. Los vectores de adenovirus atenuados, tales como el vector descrito por Strafford-Perricaudet y col., *J. Clin. Invest.* 90:626-630, 1992, son deseables en algunos casos. Se han descrito diversos vectores de adenovirus defectuosos en la replicación y de adenovirus mínimo (véanse, por ejemplo, los documentos WO94/26914, WO94/28938, WO94/28152, WO94/12649, WO95/02697 y WO96/22378). Los adenovirus recombinantes defectuosos en la replicación según la invención pueden prepararse por cualquier técnica conocida para un experto en la materia (Levrero y col., *Gene* 101:195, 1991; EP 185573; Graham, *EMBO J.* 3:2917, 1984; Graham y col., *J. Gen. Virol.* 36:59, 1977).

Los virus adeno-asociados (AAV) son virus de ADN de tamaño relativamente pequeño que pueden integrarse, en un modo estable y específico de sitio, en el genoma de las células que infectan. Pueden infectar un amplio espectro de células sin inducir ningún efecto sobre el crecimiento celular, morfología o diferenciación, y no parecen participar en las patologías humanas. Se ha descrito el uso de vectores derivados de los AAV para transferir genes *in vitro* e *in vivo* (véanse Daly y col., *Gene Ther.* 8:1343-1346, 2001, Larson y col., *Adv. Exp. Med. Bio.* 489:45-57, 2001; documentos WO 91/18088 y WO 93/09239; patentes de EE.UU. nº 4.797.368 y 5.139.941 y EP 488528B1).

En otra realización, el gen puede introducirse en un vector retroviral, por ejemplo, como se describe en las patentes de EE.UU. nº 5.399.346, 4.650.764, 4.980.289 y 5.124.263; Mann y col., *Cell* 33:153, 1983; Markowitz y col., *J. Virol.* 62:1120, 1988; documentos EP 453242 y EP178220. Los retrovirus son virus integrantes que infectan células en división.

Pueden usarse vectores lentivirales como agentes para la administración directa y expresión sostenida de ácidos nucleicos que codifican una molécula de anticuerpo de la invención en varios tipos de tejido, que incluyen cerebro, retina, músculo, hígado y sangre. Los vectores pueden transducir eficazmente células en división y no en división en estos tejidos, y mantienen la expresión a largo plazo de la molécula de anticuerpo. Para una revisión véase Zufferey y col., *J. Virol.* 72:9873-80, 1998 y Kafri y col., *Curr. Opin. Mol. Ther.* 3:316-326, 2001. Están disponibles líneas celulares de encapsidación lentivirales y se conocen generalmente en la materia. Facilitan la producción de vectores de lentivirus de alto título para terapia génica. Un ejemplo es una línea celular de encapsidación de lentivirus pseudotipada de VSV-G inducible por tetraciclina que puede generar partículas de virus a títulos superiores a 10^6 UI/ml durante al menos 3 a 4 días; véase Kafri y col., *J. Virol.* 73:576-584, 1999. El vector producido por la línea celular inducible puede concentrarse según se necesite para células no en división que se traducen eficazmente *in vitro* e *in vivo*.

El virus de Sindbis es un miembro del género alfavirus y se ha estudiado ampliamente desde su descubrimiento en diversas partes del mundo a partir de 1953. Se ha estudiado bien la transducción génica basada en alfavirus, particularmente virus de Sindbis, *in vitro* (véanse Straus y col., *Microbiol. Rev.* 58:491-562, 1994; Bredenbeek y col., *J. Virol.* 67:6439-6446, 1993; Ijima y col., *Int. J. Cancer* 80:110-118, 1999 y Sawai y col., *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 248:315-323, 1998). Muchas propiedades de los vectores de alfavirus las hacen una alternativa deseable a otros sistemas de vector derivados de virus que se desarrollan, que incluyen la rápida ingeniería de construcciones de expresión, producción de disoluciones madre de altos títulos de partículas infecciosas, infección de células no en división, y altos niveles de expresión (Strauss y col., 1994, arriba). Se ha descrito el uso de virus de Sindbis para terapia génica (Wahlfors y col., *Gene Ther.* 7:472-480, 2000 y Lundstrom, *J. Recep. Sig. Transduct. Res.* 19(1-4):673-686, 1999).

En otra realización, un vector puede introducirse a células por lipofección o con otros agentes que facilitan la transfección (péptidos, polímeros, etc.). Pueden usarse lípidos catiónicos sintéticos para preparar liposomas para la transfección *in vivo* e *in vitro* de un gen que codifica un marcador (Feigner y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417, 1987 y Wang y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7851-7855, 1987). Compuestos de lípidos útiles y composiciones para la transferencia de ácidos nucleicos se describen en los documentos WO 95/18863 y WO 96/17823, y en la patente de EE.UU. nº 5.459.127.

También es posible introducir el vector *in vivo* como plásmido de ADN desnudo. Los vectores de ADN desnudos para terapia génica pueden introducirse en las células huésped deseadas mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, electroporación, microinyección, fusión de células, DEAE-dextrano, precipitación con fosfato de calcio, uso de una pistola de genes, o uso de un transportador de vectores de ADN (véase, por ejemplo, Wilson y col., *J. Biol. Chem.* 267:963-967, 1992; Williams y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2726-2730, 1991). También pueden usarse enfoques de administración de ADN mediada por receptor (Wu y col., *J. Biol. Chem.* 263:14621-14624, 1988). Las patentes de EE.UU. nº 5.580.859 y 5.589.466 desvelan la administración de secuencias de ADN exógenas, libres de agentes que facilitan la transfección, en un mamífero. Recientemente se ha descrito un voltaje relativamente bajo, técnica de transferencia de ADN *in vivo* de alta eficiencia, llamada electrotransferencia (Vilquin y col., *Gene Ther.* 8:1097, 2001; Payen y col., *Exp. Hematol.* 29:295-300, 2001; Mir, *Bioelectrochemistry* 53:1-10,

2001; documentos WO 99/01157, WO 99/01158 y WO 99/01175).

Composiciones farmacéuticas adecuadas para tales enfoques de terapia génica y que comprenden ácidos nucleicos que codifican una molécula de anticuerpo anti-hIL-13R α 1 de la presente invención están incluidos dentro del alcance de la presente divulgación.

En otro aspecto se desvela un procedimiento para identificar, aislar, cuantificar o antagonizar IL-13R α 1 en una muestra de interés usando una molécula de anticuerpo de la presente invención. Las moléculas de anticuerpo pueden utilizarse como herramienta de investigación en ensayos inmunoquímicos, tales como transferencias Western, ELISA, radioinmunoensayo, ensayos inmunohistoquímicos, inmunoprecipitaciones, u otros ensayos inmunoquímicos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Immunological Techniques Laboratory Manual, ed. Goers, J. 1993, Academic Press) o diversos protocolos de purificación. Las moléculas de anticuerpo pueden tener una marca para facilitar la fácil identificación o medición de las actividades asociadas con las mismas. Un experto en la materia está fácilmente familiarizado con los diversos tipos de marcas detectables (por ejemplo, enzimas, colorantes, u otras moléculas adecuadas que son tanto fácilmente detectables como producen alguna actividad/resultado que es fácilmente detectable) útiles en los protocolos anteriores.

Aspectos adicionales de la presente invención son kits que incluyen las moléculas de anticuerpo o composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento e instrucciones para su uso. Normalmente, los kits incluyen, pero no necesitan incluir, una marca que indica el uso previsto del contenido del kit. El término marca incluye cualquier material por escrito, o grabado, suministrado sobre o con el kit, o que de otro modo acompaña al kit.

Relacionado con todavía otro aspecto de la presente invención se identificó un punto de contacto crítico entre los anticuerpos desvelados en el presente documento y el receptor de hIL-13R α 1. Este punto de contacto crítico se identificó introduciendo una mutación específica que afectó a la unión del receptor por el anticuerpo. Más específicamente, se encontró que la sustitución del residuo de fenilalanina en la posición 233 de SEC ID N°: 101 con un residuo de alanina produce una pérdida de la unión entre el anticuerpo y el receptor mutante en comparación con la unión entre el anticuerpo y el receptor natural. Esto es un hallazgo muy útil en la caracterización de 10G5 y sus derivados. Los péptidos que explotan la región que rodea el aminoácido 233 serán útiles en la generación de anticuerpos monoclonales adicionales con especificidad similar. Por consiguiente, en el presente documento se desvelan péptidos aislados que incluyen una secuencia de hIL-13R con una mutación Phe233Ala (es decir, SEC ID N°: 120), tanto sean de longitud completa como fragmentos de la misma (por ejemplo, 5 a 350 fragmentos de residuos de aminoácidos) que incluyen la mutación. Adicionalmente, la presente divulgación también engloba el uso de dichos péptidos en un ensayo para evaluar 10G5 o derivados de 10G5, identificar anticuerpos con especificidad por un epítipo similar o, alternativamente, producir anticuerpos con especificidad similar. Por tanto, en el presente documento se desvela un procedimiento de selección de moléculas de anticuerpo que eligen como diana la misma región sobre hIL-13R α 1 que el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma depositada como el depósito de ATCC n° PTA-6933, que implica (a) analizar la unión de una molécula de anticuerpo de interés a (i) un polipéptido de hIL-13R α 1 aislado de SEC ID N°: 101 o fragmento del mismo que incluye el aminoácido correspondiente al residuo 233 de SEC ID N°: 101; y (ii) un polipéptido aislado o fragmento de un polipéptido de hIL-13R α 1 aislado o fragmento del mismo, en el que el aminoácido correspondiente al residuo 233 de SEC ID N°: 101 es una alanina en vez de una fenilalanina; (b) identificar aquellos anticuerpos que se unen al polipéptido aislado o fragmento de la etapa (a)(i), pero presentan unión significativamente reducida al polipéptido aislado o fragmento de la etapa (a) (ii); y (c) recuperar los anticuerpos identificados en la etapa (b). Una disminución significativa es normalmente superior a una reducción de 10 veces en la unión entre un anticuerpo y el receptor mutante en comparación con la unión entre el anticuerpo y el receptor natural. Polipéptidos que son útiles en el procedimiento son aquellos fragmentos de SEC ID N°: 101 que incluyen el aminoácido correspondiente al residuo 233 de SEC ID N°: 101 que se une al anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma depositada como el depósito de ATCC n° PTA-6933, y los fragmentos correspondientes en los que el aminoácido correspondiente al residuo 233 de SEC ID N°: 101 es una alanina en vez de una fenilalanina. Por ejemplo, la región extracelular de IL-13R α 1 humano (aminoácidos número 1 a 317 de SEC ID N°: 101) puede usarse junto con su mutante de Phe233Ala correspondiente.

Otro aspecto de la invención incluye un anticuerpo aislado que (i) compite con el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma depositada como el depósito de ATCC n° PTA-6933 para unirse a hIL-13R α 1; (ii) inhibe la señalización de IL-13; y (iii) en el que una sustitución en un péptido de hIL-13R α 1 del residuo de fenilalanina que se corresponde con la posición 233 de SEC ID N°: 101 con un residuo de alanina conduce a una pérdida de unión entre dicho anticuerpo y el péptido de hIL-13R α 1 mutante resultante en comparación con la unión entre dicho anticuerpo y el péptido de hIL-13R α 1 sin dicha sustitución.

La invención se describe en mayor detalle por los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1: Producción y purificación de una proteína recombinante basada en la región extracelular de IL-13R α 1 humano

Usando el protocolo descrito en el presente documento, una proteína de fusión marcada con FLAG[®] del extremo N

que incluye la mayoría de la región extracelular de IL-13R α 1 humano (aminoácidos número 3 a 317 de SEC ID N°: 101) se purificó de medios de cultivo acondicionados por un clon de células CHO establemente transfectado (vector pEFBOS-S-FLAG® que codifica IL-13R α 1.ECR). La proteína hIL-13R α 1.ECR purificada (SEC ID N°: 103) se concentró y posteriormente se desaló en solución salina tamponada con fosfato (PBS), 0,02 % en v/v de TWEEN™ 20, seguido de esterilización por filtración. La recuperación típica fueron 0,4 mg de proteína por litro de medio acondicionado. La proteína se almacenó a -80 °C hasta que se requirió.

Procedimientos. Un vector de expresión pEFBOS-S-FLAG® que incorpora un ADNc que codifica la región extracelular (ECR) de IL-13R α 1 humano con una secuencia señal de IL-3 y fusión de marca FLAG® se transfectó en células CHO para la expresión estable usando procedimientos convencionales. Entonces, el medio acondicionado derivado de CHO se concentró 10 veces por ultrafiltración usando una membrana de corte de 10 kDa. El medio concentrado se aplicó a una columna de cromatografía de afinidad M2 (anti-FLAG®) y se eluyó con el péptido FLAG® a una concentración de 100 µg/ml. El eluato se concentró por liofilización y luego el tampón se intercambió a Tris a pH 8,0 usando la resina GF50 de SEPHAROSE™ empaquetada en la columna (2,6 cm x 40 cm). La fracción intercambiada con tampón se sometió entonces a cromatografía de intercambio aniónico usando una columna MONO™ Q 5/5. Se retuvo fuertemente un fragmento proteolizado de IL-13R α 1 y se separó de IL-13R α 1 de longitud completa que eluyó a una menor concentración de sales. Las fracciones reunidas y el producto final esterilizado por filtración se evaluaron por SDS-PAGE y análisis de transferencia Western. Entonces, la muestra se cuantificó usando absorbancia UV, en la que 1 unidad de absorbancia fue aproximadamente 1 mg/ml.

Ejemplo 2: Generación de líneas celulares de hibridoma productoras de anticuerpos monoclonales humanos anti-IL-13R α 1 humano

Inmunización de ratones transgénicos. Ratones transgénicos macho y hembra de las cepas HCo7, HCo12 y HCo7xHCo12 (ratones HUMAB™, Medarex, EE.UU.) se inmunizaron con hIL-13R α 1.ECR del Ejemplo 1. Para la primera inmunización, 20-50 µg de hIL-13R α 1.ECR se emulsionaron en adyuvante completo de Freund (CFA) y se administraron por vía intraperitoneal (i.p.). Para un mínimo de dos y un máximo de tres inmunizaciones i.p. posteriores, 20-50 µg de hIL-13R α 1.ECR se emulsionaron en adyuvante incompleto de Freund (IFA). Tras la segunda o tercera inmunización con hIL-13R α 1.ECR en IFA, el suero se muestreó (plexo retro-orbital) y se ensayó para anticuerpos humanos contra hIL-13R α 1.ECR por ELISA como se describe en el presente documento. Los ratones con alta respuesta al tratamiento (títulos del suero generalmente >1:3200) se seleccionaron para la generación de hibridoma. En algunos casos, los animales no usados para la generación de hibridoma en este momento recibieron adicionalmente inmunizaciones i.p. con 20-50 µg de hIL-13R α 1.ECR en PBS. El suero de estos animales se ensayó de nuevo para anticuerpos humanos contra hIL-13R α 1.ECR por ELISA y se usaron ratones con alta respuesta al tratamiento para la generación de hibridomas. Los ratones seleccionados para la generación de hibridomas se reforzaron intravenosamente con 20-50 µg de hIL-13R α 1.ECR 3-4 días antes de la fusión de células del bazo.

ELISA específico de antígeno. Suero de ratón o líquido de sobrenadante de cultivo de hibridoma (SNF) se evaluó para mAb capaces de unirse a placa unida a hIL-13R α 1.ECR usando un formato de ELISA convencional del siguiente modo. Placas MAXISORP™ de 96 pocillos de fondo plano (NUNC, Invitro Technologies, n° 439454) se recubrieron con 50 µl de una disolución que contiene 2,5 µg/ml de hIL-13R α 1.ECR diluido en PBS y se incubaron durante la noche a 4 °C. Después de lavar dos veces con PBS, las placas se bloquearon con 2 % en peso/volumen de leche desnatada en PBS (tampón de bloqueo, 200 µl/pocillo) durante 1 hora a 37 °C, luego se lavaron otras dos veces con PBS que contenía 0,1 % en v/v de TWEEN™ 20 (tampón de lavado). Se añadieron cincuenta µl de SNF de hibridoma de prueba o suero de ratón por pocillo y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron tres veces. Los mAb humanos unidos se detectaron usando un reactivo secundario conjugado con HRP anti-IgG humana diluido 1:1000 en PBS que contenía 1 % en peso/volumen de leche en polvo desnatada y 0,1 % en v/v de TWEEN™ 20. Se añadieron cincuenta µl/pocillo del reactivo secundario conjugado con HRP anti-IgG humana a las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Entonces, las placas se lavaron tres veces, se revelaron con sustrato TMB y lectura de DO a 450 nm.

Generación de hibridoma. Se sacrificaron ratones con alta respuesta al tratamiento seleccionados y se recogieron el bazo y los ganglios linfáticos relevantes. La fusión de células del bazo y de los ganglios linfáticos con el componente de fusión SP2/O y posterior selección con HAT (hipoxantina/ aminopterina/ timidina) (GIBCO-BRL, n° 21060-017) de hibridomas se realizaron según procedimientos convencionales (Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Brevemente, la centrifuga se ajustó a temperatura ambiente, con un baño de agua a 37 °C y un bloque térmico a 37 °C. Se calentó el polietilenglicol (PEG) a 37 °C. Se preparó medio para cultivar células después de completarse la fusión. El medio incluyó medio sin suero de hibridoma (HSFM) (GIBCO-BRL, n° 12045-084), 5 % de SBF ultra-bajo de IgG (SBF) (GIBCO-BRL, n° 16250-078), Glutamax-1 2 mM (GIBCO-BRL, n° 35050-061), 50 U/50 µg/ml de penicilina/estreptomicina (GIBCO-BRL, n° 15070-063) y 1x HAT. El medio se calentó a 37 °C. Se recogieron células SP2/O y se realizó una cifra de células viable. Las células fueron sanas, activamente en división y en fase logarítmica. La viabilidad fue > 95 %. Se cultivaron SP2/O en HSFM/5 % de SBF ultra-bajo de IgG antes de la fusión, y se fraccionaron 1:2 ó 1:3 el día antes de la fusión. El día de la fusión, los animales se sacrificaron y el bazo (y ganglios linfáticos si se requiere) se extrajeron inmediatamente en medio estéril

(modificación de Dulbecco de medio Eagle (GIBCO-BRL, nº 11995-073) o DME) sobre hielo. Se preparó una suspensión de una sola célula a partir del bazo, y se lavó dos veces (1800 rpm durante 7 minutos) en DME, el segundo lavado caliente. Las células SP2/O se lavaron tres veces (1500 rpm, 7 minutos) con DME caliente para eliminar todas las trazas de suero. Se usaron células SP2/O (10^8) para un bazo de ratón, hecho como dos fusiones separadas. Se reunieron células SP2/O y del bazo juntas en el mismo tubo y se centrifugaron a 2100 rpm (400 g) durante 5 minutos. Se eliminó todo el DME, quedando solo sedimento combinado. El DME se colocó en el bloque térmico a 37 °C. Se añadió un ml de PEG caliente gota a gota al sedimento de células durante 1 minuto mientras que se agitaba el sedimento suavemente con la pipeta. La agitación continuó suavemente durante otro minuto. Se añadió un ml de DME caliente, gota a gota, agitación, durante 1 minuto. Se añadió otro 1 ml de DME durante 1 minuto. Entonces se añadieron 20 ml de DME durante 5 minutos, mientras que se agitaba lentamente. Esto se centrifugó luego durante 5 minutos a 1500 rpm. Se eliminó todo el sobrenadante, y las células se resuspendieron suavemente en medio de cultivo como antes. Se sembró un bazo de ratón en 5 placas de microtitulación a 0,2 ml por pocillo en medio HAT. Las placas se alimentaron eliminando aproximadamente 0,1 ml de cada pocillo y sustituyendo con medio HAT fresco cada 3 ó 4 días. Los pocillos se comprobaron para el crecimiento de hibridomas en el día 7-10 (selección rutinaria 10-14 días después de la fusión). Estando seguros de que el medio no se había cambiado durante al menos 2-3 días de antemano, se sacaron -100 µl de sobrenadante de cada pocillo para ensayo. Los positivos se transfirieron a pocillos de 1 ml o 2 ml, luego se expandieron gradualmente a placas de 6 pocillos. Los hibridomas no fueron clónicos en esta etapa. Después de 14 días en medio HAT, los hibridomas se cultivaron en HT (GIBCO-BLR, nº 11067-030) (HSFM, 5 % de SBF de IgG ultra-baja, 10 ng/ml de rhlL-6 (R&D Systems, nº 206-IL-050) y HT) durante aproximadamente 2 semanas más, luego sin HT.

Cultivo de hibridomas. Se clonaron hibridomas que dan positivo en los cribados de ELISA de confirmación primaria y de seguimiento por dilución limitante. Los pocillos de dilución limitante que contienen colonias individuales se cribaron por ELISA y se seleccionó un pocillo positivo para la expansión. Se llevaron a cabo rondas de clonación de dilución limitante hasta que el 100 % de los pocillos dio positivo.

Para la producción de líquido de sobrenadante (SNF) para la purificación de anticuerpos, los hibridomas se expandieron en tanto matraces T175 cm² (Falcon, nº 3028) como botellas rotatorias (900 cm²) (CORNING, nº 430849). El medio usado para la generación de SNF de hibridoma fue HSFM complementado con 5 % de SBF de IgG ultra-bajo, glutamina 2 mM y 50 U/50 µg/ml de penicilina/estreptomicina. Los hibridomas se dejaron crecer hasta confluencia y el medio se recogió por centrifugación aproximadamente 5-10 días después de cuando >90 % de las células había muerto. Todo el medio acondicionado se filtró usando un aparato de filtro STERICUP™ (MILLIPORE, nº SCGPU11RE) (0,45 µm) antes de la purificación del mAb.

Producción de mAb purificados. Se purificaron anticuerpos monoclonales de SNF usando una estrategia basada en cromatografía de afinidad en proteína A convencional; véase, por ejemplo, el siguiente aparato y reactivos. HPLC: AKTA explorer (AMERSHAM Biosciences, Suecia); columna: proteína A (HITRAP™, 1 ml, Amersham Biosciences, Suecia); tampón A: PBS, 0,02 % de Tween™ 20; tampón B: glicina 0,1 M a pH 2,8; y tampón C: Tris 2 M a pH 8,0.

La columna se preparó lavando con 5 volúmenes de tampón A. Se cargó medio acondicionado sobre columna específica. Se realizó un lavado con 100 volúmenes de tampón A y elución con 20 ml (10 x 2 ml) de tampón B. La recogida fue en tubo que contiene 0,2 ml de tampón C. La columna se lavó con tampón A para guardar a 4 °C. La desalación se realizó usando membrana de diálisis de corte de 10 K en PBS, 0,02 % de Tween™ 20. La pureza del mAb se demostró por SDS-PAGE con tinción con azul COOMASSIE®.

El anticuerpo se cuantificó por análisis espectrofotométrico a 280 nm usando un coeficiente de extinción de inmunoglobulina de 1,0 unidad de absorbancia que es equivalente a 1,34 mg/ml de anticuerpo.

Ejemplo 3: Análisis de la afinidad del anticuerpo monoclonal anti-IL-13Rα1 humano 10G5 por IL-13Rα1 humano

Estudios basados en B-TACORE™. Se inmovilizó IL-13Rα1.ECR humano (40 µg/ml en acetato sódico 20 mM, pH 4,2) del Ejemplo 1 en SensorChip (CM5, Biosensor, Suecia) usando química de NHS/EDC convencional según las instrucciones del fabricante a un valor de inmovilización fijo, por ejemplo, 1000 UR. Se usó etanolamina (1,0 M), pH 8,0, para extinguir los ésteres activos residuales después de la inmovilización de hIL-13Rα1.ECR.

El análisis de unión de 10G5 (intervalo de concentración de 1,4 nM a 150 nM, diluciones dobles) a hIL-13Rα1.ECR inmovilizado se realizó por duplicado. Los sensogramas generados se ajustaron a un modelo de unión a ligando bivalente para derivar simultáneamente las velocidades de asociación (k_a) y disociación (k_d) y se usaron para determinar la afinidad de unión (K_D , software BioEvaluation, BIACORE™, Suecia).

La afinidad de unión (K_D) del mAb humano anti-IL-13Rα1 10G5 fue -254 pM (n=8).

Ejemplo 4: Análisis de la unión del anticuerpo monoclonal anti-IL-13Rα1 humano 10G5 a IL-13Rα1 de macaco cinomolgo y ratón

Un ADNc que codifica el IL-13R α 1 de macaco cinomolgo (cIL-13R α 1) se clonó por PCR usando ARNm extraído de bazo y médula ósea de cinomolgo. La secuencia madura se conservó altamente entre IL-13R α 1 de cinomolgo y humano con una identidad de aminoácidos de aproximadamente el 97 % (véase el n° de acceso de GenBank AAP78901).

Para la producción de proteína IL-13R α 1.ECR de cinomolgo purificada, un ADNc que codifica IL-13R α 1.ECR de cinomolgo (aminoácidos 9 a 325 de n° de acceso de GenBank AAP78901 o aminoácidos 1 a 317 de SEC ID N°: 104) se clonó en el vector pEFBOS-S-FLAG® para la expresión como proteína de fusión marcada con FLAG® del extremo N esencialmente como se ha descrito anteriormente para hIL-13R α 1.ECR.

También se expresó IL-13R α 1.ECR de ratón (aminoácidos 27 a 344 de n° de acceso de GenBank 009030 o aminoácidos 1 a 318 de SEC ID N°: 105) y se purificó como una fusión marcada con FLAG® del extremo N (mIL-13R α 1.ECR) esencialmente como se ha descrito anteriormente.

La posible reactividad cruzada del mAb 10G5 con IL-13R α 1.ECR de ratón y cinomolgo se evaluó usando un enfoque basado en BIACORE α ™. Se inmovilizaron IL-13R α 1.ECR de ratón, humano y cinomolgo purificados individualmente en tres canales de un SensorChip (CM5, BIACORE™, Suecia) usando química de inmovilización convencional. Se evaluaron anticuerpos monoclonales (intervalo de concentración de 312,5 nM hasta 125 pM) para unirse a los receptores simultáneamente a una velocidad de flujo de 15 μ l/minuto. El análisis de la afinidad del mAb se realizó como se describe en el Ejemplo 3 anterior.

Los resultados de este análisis indicaron que mAb 10G5 mostró una afinidad 10 veces inferior (-2,9 nM) para el receptor de cinomolgo en comparación con el receptor humano (-254 pM), y unión despreciable a receptor de ratón.

Ejemplo 5: Análisis de la capacidad de 10G5 para competir con IL-13 para la unión de IL-13R α 1 humano

La capacidad de 10G5 para competir con IL-13 para unirse a IL-13R α 1 se evaluó por un ensayo de competición sobre un instrumento BIACORE™. Se preparó un SensorChip para inmovilizar IL-13 humana usando química de NHS/EDC convencional según las instrucciones del fabricante. Se incubó proteína hIL-13R α 1.ECR (8 μ g/ml) con mAb en exceso (50 μ g/ml) durante 2 horas a temperatura ambiente, luego se inyectó sobre el SensorChip. El nivel de la proteína hIL-13R α 1.ECR unida a IL-13 inmovilizada se registró en un momento de tiempo fijo dentro del sensograma y se dividió entre el nivel correspondiente de la proteína hIL-13R α 1.ECR unida en ausencia de mAb ("unión de IL-13 relativa"). Las relaciones de unión <1 fueron indicativas de competición entre mAb y IL-13 para unirse a IL-13R α 1, mientras que valores ≥ 1 indicaron que el mAb se unió a IL-13R α 1 en un sitio distinto al que se une IL-13.

Se encontró que mAb 10G5 inhibió la unión de la proteína hIL-13R α 1.ECR a IL-13 inmovilizada.

Ejemplo 6: Análisis de la capacidad de anticuerpos monoclonales anti-IL-13R α 1 humana para antagonizar respuestas celulares mediadas por IL-13 y IL-4

Ensayo de eotaxina de fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF). Se ha demostrado que células NHDF producen eotaxina en respuesta a IL-13 y mAb dirigidos contra el IL-13R α 1 pueden inhibir esta respuesta. Además, se demostró que células NHDF no expresan el receptor γ c, permitiendo así un análisis de la capacidad de los mAb para inhibir la actividad de IL-4 mediada por el receptor de IL-4 tipo II, es decir, IL-4R α más IL-13R α 1. Debido a la reactividad cruzada de especies, puede usarse tanto IL-13 de primate humano como no humano (por ejemplo, rhesus) para estimular la producción de eotaxinas.

Se cultivaron células NHDF (Cambrex, n° CC-2509) en medio FGM (Cambrex, n° CC3132) complementado con los aditivos recomendados según las instrucciones del fabricante (medio completo). Las células se sometieron a pases 1:3 ó 1:5 una vez a la semana y se monitorizaron para sensibilidad a IL-13 antes de uso. Para evaluar la actividad del antagonista de mAb específicos de hIL-13R α 1, las células se resuspendieron a 2×10^6 /ml en medio completo que contenía 20 ng/ml de PMA (SIGMA, n° P8139) y 20 μ g/ml de polimixina (SIGMA, n° P4932) y se sembraron en placas de fondo plano de 96 pocillos (COSTAR, n° 3595) a 1×10^5 células/pocillo. Las valoraciones de anticuerpo se añadieron a las células y se incubaron durante 30 minutos, a 37 °C con 5 % de CO₂ en aire humidificado. Entonces se añadió IL-13 recombinante (de primate humano o no humano) a placas a una concentración final de 30 ng/ml y se incubó durante la noche a 37 °C con 5 % de CO₂ en aire humidificado. Entonces se eliminaron los sobrenadantes y se ensayaron para contenido de eotaxina por ELISA. Para ensayos inducidos por IL-4, la IL-4 recombinante (PHARMINGEN) se añadió a placas a una concentración final de 0,5 ng/ml en lugar de IL-13.

Protocolo de ELISA de eotaxina. Se recubrieron placas IMMULON®-4 (DYNATECH, n° 3855) con 4 μ g/ml de anticuerpo de ratón anti-eotaxina humana (R&D Systems, MAB320) en PBS (INVITROGEN, n° 14190-144) durante la noche a 4 °C. Las placas se bloquearon (200 μ l/pocillo, TBS complementado con 1 % de BSA y 0,05 % de

Tween™ 20) durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron tres veces (tampón de lavado, TBS más 0,05 % de Tween™ 20). El SNF de prueba de las células NHDF se añadió a 50 µl/pocillo y las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente, luego se lavaron tres veces. El anticuerpo anti-eotaxina humana biotinilado (R&D Systems, BAF320) se añadió a 200 ng/ml en tampón de bloqueo (60 µl/pocillo) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, luego se lavó tres veces. Se añadió estreptavidina-europio (Wallac, nº 1244-360) a 100 ng/ml en tampón de europio (100 µl/pocillo) y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente, luego se lavó tres veces. Se añadió disolución de potenciación (Wallac, nº 12244-105), 150 µl/pocillo, y se incubó 1 hora a temp. ambiente. La fluorescencia retardada en el tiempo se leyó usando un lector de placas VICTOR (PERKIN-ELMER).

Se usó eotaxina humana recombinante (R&D Systems, nº 320-EO) para establecer una curva patrón. Los resultados de este análisis indicaron que la CE₅₀ de 10G5 contra IL-13 fue 0,25 µg/ml, mientras que la CE₅₀ contra IL-4 fue 2,7 µg/ml.

Ensayo de fosforilación de STAT6 inducida por IL-13/IL-4 de NHDF. La fosforilación de STAT6 (pSTAT6) es un elemento esencial de la transducción de señales de IL-13/IL-4 y se produce en el plazo de minutos desde la dimerización del receptor. Los mAb específicos de IL-13Rα1 pueden bloquear la fosforilación de STAT6 en respuesta a IL-13 y/o IL-4.

Para determinar esto, 2x10⁶ células NHDF en 50 µl de medio RPMI (nº 22400-071, INVITROGEN) se sembraron en placas de PCR de polipropileno de fondo en V de 96 pocillos (USA Scientific, nº 1442-9596). Los mAb anti-IL-13R se añadieron a la concentración requerida en 25 µl y las placas se incubaron durante 30 minutos a 4 °C. Se añadió hIL-13 recombinante (100 ng/ml) o hIL-4 (PHARMINGEN, 0,5 ng/ml) en 25 µl y las placas se calentaron a 37 °C en una máquina de PCR durante 20 minutos. Después de 20 minutos se añadió un volumen igual de 2X tampón de lisis (HEPES 100 mM, NaCl 200 mM, 2 % en v/v de TRITON® X100, NaF 100 mM, DTT 10 mM, inhibidores de proteasa) y pSTAT6 se midió por ELISA.

Protocolo de ELISA de STAT6. Se recubrieron placas IMMULON®-4 (DYNATECH, nº 3855) con anti-fosfo-STAT6 humano (BD Transduction Labs, nº 621995) a 10 µg/ml en PBS (INVITROGEN, nº 14290-144) (50 µl/pocillo) y se incubaron durante la noche a 4 °C. Las placas se bloquearon (200 µl/pocillo, TBS complementado con 1 % de BSA y 0,05 % de Tween™ 20) durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron tres veces (tampón de lavado, TBS más 0,05 % de v/v en TWEEN™ 20). Los lisados de prueba se añadieron a 50 µl/pocillo y las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente, luego se lavaron tres veces. Se añadió biotina-anti-STAT6 (BD Transduction Labs, nº 621141, conjugado con biotina, relación molar 20:1) a 2 µg/ml en tampón de bloqueo (60 µl/pocillo) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, luego se lavó tres veces. Se añadió estreptavidina-europio (Wallac, nº 1244-360) a 100 ng/ml en tampón de europio (100 µl/pocillo) y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente, luego se lavó tres veces. Se añadió disolución de potenciación (Wallac, nº 12244-105) (150 µl/pocillo) y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. La fluorescencia retardada en el tiempo se leyó usando un lector de placas VICTOR (PERKIN-ELMER).

Los resultados de este análisis indicaron que la CE₅₀ de 10G5 fue 1,0 µg/ml contra IL-13, mientras que la CE₅₀ contra IL-4 fue 1,3 µg/ml.

Ejemplo 7: Clonación y secuenciación de las regiones variables del anticuerpo murino 10G5

Se preparó ARN mensajero a partir de células de hibridoma que producen el anticuerpo 10G5 y se transcribieron de forma inversa usando un cebador oligo-dT para producir ADNc. Se realizaron varias reacciones de PCR independientes. Las reacciones de PCR se realizaron a las siguientes condiciones: 94 °C durante 2 minutos; 30 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 30 segundos y 68 °C durante 1 minuto; y 68 °C durante 10 minutos. También se desarrollaron dos condiciones de PCR alternativas en genes de anticuerpos de clonación: 1) 94 °C durante 2 minutos; 30 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 68 °C durante 30 segundos, y 68 °C durante 1 minuto; y 68 °C durante 10 minutos; y 2) 30 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 55 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 1 minuto. Los amplicones de PCR se separaron sobre 1,2 % de geles de agarosa. En términos de la región variable de la cadena pesada, los siguientes conjuntos de cebadores dieron un producto de PCR. Para el extremo de 5' de la región variable de la cadena pesada, los cebadores fueron VH5, 5'-G GGG TCA ACC GCC ATC CTY G-3' (SEC ID Nº: 114) en la que Y fue C o T (Degen 2); y VH6, 5'-GTC TCC TTC CTC ATC TTC CTG CCC-3' (SEC ID Nº: 115) (Degen 1); mientras que el cebador para el extremo 3' de V_H fue HA, 5'-C CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA C-3' (SEC ID Nº: 116). En términos de la región variable de la cadena ligera, cuatro conjuntos de cebadores dieron un producto de PCR. Los productos de PCR se clonaron en el plásmido TOPO® pCK2.1 (INVITROGEN). El análisis de secuencias del clon de la cadena pesada tuvo la mejor correspondencia con la línea germinal, VH5-51. Para la región variable de la cadena ligera, los cebadores para el extremo 5' que dio una secuencia con la mejor correspondencia con la línea germinal, VL VKIII A27, fueron VK3, 5'-YTC TTC CTC CTG CTA CTC TGG CTC-3' (SEC ID Nº: 117) en la que Y fue C/T (Degen 2); y VK4, 5'-ATG GTG TTG CAG ACC CAG GTC TTC-3' (SEC ID Nº: 118) (Degen 1); mientras que el cebador para el extremo 3' de V_L fue KA, 5'-G AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG C-3' (SEC ID Nº: 119).

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos inicialmente identificados que contenían las regiones variables de cadena pesada y ligera de 10G5 incluyeron tanto la secuencia conductora como alguna en la dirección 3' adicional (véanse SEC ID N°: 42 y 44 para la cadena pesada y SEC ID N°: 46 y 48 para la cadena ligera). Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 10G5 se muestran en la Figura 1 y en SEC ID N°: 43 y 45, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 10G5 se muestran en la Figura 2 y en SEC ID N°: 47 y 49, respectivamente.

Ejemplo 8: Análisis de la unión de mAb a los péptidos IL-13R α 1 humanos expresados en fago

La mutación de la fenilalanina en la posición 233 de la secuencia de aminoácidos de la región extracelular de IL-13R α 1 humano a alanina efectuó una disminución significativa en la unión del anticuerpo 10G5 con respecto a la unión del anticuerpo a la región extracelular de IL-13R α 1 humano natural. Por consiguiente, Phe233 se identificó como un residuo importante sobre el receptor para la unión del anticuerpo 10G5. Convenientemente, la región extracelular de IL-13R α 1 humano o el mutante de Phe233Ala correspondiente se fusionaron mediante el extremo C a un fragmento de la proteína del gen 3 (aminoácidos 249-406) generalmente según el procedimiento descrito por Lowman y col., 1991 Biochem. 30:10832-10838. Entonces, estos péptidos derivados de IL-13R α 1 se mostraron sobre el bacteriófago M13 y se ensayaron por ELISA para unirse a 10G5 o 1D9 inmovilizado. Brevemente, los mAb se adsorbieron pasivamente sobre placas MAXISORP™ de 96 pocillos (NUNC) tras la incubación durante la noche de 100 μ l/pocillo de 2,5 μ g/ml de mAb diluido en tampón PBS. Se desecharon las disoluciones de recubrimiento, las placas se bloquearon por incubación con tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente, luego se lavaron una vez con tampón de lavado. Las muestras de fago seriadamente diluidas con 1 % en peso/volumen de leche en polvo desnatada en PBS (tampón diluyente) se transfirieron entonces a placas recubiertas con mAb (100 μ l/pocillo). Tras la incubación a temperatura ambiente durante 2 horas, las placas se lavaron 3 veces, y se unieron a fago marcado con anticuerpo policlonal conjugado con HRP anti-IgG M13, y se detectaron mediante la adición de sustrato TMB. El revelado del color de TMB se inactivó mediante la adición de ácido sulfúrico acuoso 2 M, y se midió la absorbancia a 450 nm.

Ejemplo 9: Identificación de anticuerpos

Procedimientos. Las secuencias pesada variable y ligera variable del anticuerpo 10G5 (SEC ID N°: 43 y 47, respectivamente) se clonaron en un vector de expresión en fago Fab, pFab3d (Figuras 3, 4A y 4B) con un fragmento *XhoI/ApaI* de 1929 pb del sitio *PKS3* del hongo *Glarea lozoyensis* clonado en el sitio *XhoI/ApaI* como relleno en la construcción de la cadena ligera, luego se mutó aleatoriamente en las regiones CDR3 pesadas y ligeras variables (poseyendo cada biblioteca $\geq 10^8$ de diversidad funcional). Entonces, los mutantes resultantes se inmunopurificaron contra IL-13R α 1 humano y de primate (mono rhesus y cinomolgo) biotinilado en disolución usando protocolos convencionales de expresión en fago (véase, por ejemplo, Phage Display: A Laboratory Manual, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Se han desvelado secuencias humanas y de primate en la bibliografía; véase, por ejemplo, n° de acceso de GENBANK U62858, CAA70508 y AAP78901. Reduciendo la concentración de diana en cada ronda posterior de inmunopurificación (por ejemplo, 10 nM, 1 nM, 0,1 nM y 0,01 nM), la rigurosidad de la inmunopurificación aumentó eficazmente, enriqueciéndose así cada vez en fago de mayor afinidad con cada ronda posterior. Se usó ELISA de fago como ensayo primario para determinar la capacidad de los Fab recombinantes unidos a fago para reconocer el IL-13R α 1 biotinilado inmovilizado sobre placas de estreptavidina (véase, por ejemplo, Phage Display: A Laboratory Manual, arriba). Se usaron ensayos de ELISA de captura de Myc y de disociación (protocolos generales descritos en el presente documento) como herramientas de selección secundarias. Se realizaron ensayos de resonancia de plasmones superficiales BIACORE™ y de exclusión cinética KINEXA™ para caracterizar la unión cinética de los anticuerpos identificados. Estos ensayos se realizaron según los protocolos publicados del fabricante. Los anticuerpos específicos se convirtieron en anticuerpos de longitud completa de subclase IgG4 para la expresión, producción y caracterización en células de mamífero (protocolo general descrito más adelante).

Ensayos de captura de myc y de disociación. Se realizan dos ensayos en paralelo. El primero (I) midió la cantidad de anticuerpo capturado de PeriPreps. Esto aseguró que los datos se recogieron solo de pocillos que tuvieron cantidades suficientes y equivalentes de anticuerpo. El segundo (II) midió la disociación del receptor de IL-13 del anticuerpo unido a la placa.

Ensayo (I): Se recubrieron placas IMMULON®-4 (DYNATECH, n° 3855) con anticuerpo kappa antihumano policlonal (Immunology Consultants Lab, n° GKBF-80A-K116) a 5 μ g/ml en PBS (INVITROGEN, n° 14290-144) (50 μ l/pocillo) y se incubaron durante la noche a 4 °C. Se añadió tampón de bloqueo (200 μ l/pocillo) y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado. Se añadió PeriPrep puro, 50 μ l/pocillo, y se dejó durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado. Se añadieron cincuenta μ g/ml de globulina gamma humana (Pierce, n° 31879) en tampón de bloqueo y se dejaron incubar durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado por la mañana y por la tarde, seguido de la adición de 150 μ l/pocillo de tampón de bloqueo, mientras que se incubaba a 37 °C en todo el tiempo. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado. El anticuerpo unido se detectó con biotina-anti-Myc (Upstate, n° 16-212) a 1 μ g/ml en tampón de bloqueo (60 μ l/pocillo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las

placas se lavaron tres veces con tampón de lavado. Se añadió estreptavidina-europio (Wallac, nº 1244-360) a 100 ng/ml en tampón europio (100 µl/pocillo) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se realizó una etapa de lavado final (tres veces) y se añadió disolución de potenciación (Wallac, nº 1244-105) a 150 µl/pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se leyeron por fluorescencia retardada en el tiempo en un lector de placas VICTOR (PERKIN-ELMER).

Ensayo (II): Se recubrieron placas IMMULON®-4 (DYNATECH, nº 3855) con anticuerpo kappa antihumano policlonal (Immunology Consultants Lab, nº GKBF-80A-K116) a 5 µg/ml en PBS (INVITROGEN, nº 14290-144) (50 µl/pocillo) y se incubaron durante la noche a 4 °C. Se añadió tampón de bloqueo (200 µl/pocillo) y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado. Se añadió PeriPrep puro, 50 µl/pocillo, y se dejó durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado. Se añadieron sesenta µl/ml de 400 ng/ml de receptor de IL-13 humana marcada con FLAG® con 50 µg/ml de globulina gamma humana (Pierce, nº 31879) en tampón de bloqueo y se dejó incubar durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado a intervalos de dos, seis horas, seguido de la adición de 150 µl/pocillo de tampón de bloqueo. Las incubaciones se llevaron a cabo a 37 °C. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado. Se detectó receptor de IL-13 residual con biotina-anti-FLAG® (IBI, nº 3081/6H2411) a 1 µg/ml en tampón de bloqueo (60 µl/pocillo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado. Se añadió estreptavidina-europio (Wallac, nº 1244-360) a 100 ng/ml en tampón europio (100 µl/pocillo) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se realizó una etapa de lavado final (tres veces) y se añadió disolución de potenciación (Wallac, nº 1244-105), 150 µl/pocillo, durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se leyeron por fluorescencia retardada en el tiempo en un lector de placas Victor (Perkin-Elmer).

Conversión en IgG de longitud completa. Anticuerpos monoclonales anti-IL13Rα1 se convirtieron en anticuerpo completo de subclase IgG4 para la expresión y producción en células de mamífero. Sus regiones variables se amplificaron por PCR a partir de los vectores de Fab correspondientes y se clonaron en marco en un vector de expresión del anticuerpo pCON de LONZA con secuencias conductoras enfrente de las secuencias de anticuerpos. En el vector, secuencias de ADN genómicas para todas las regiones constantes para las cadenas ligeras y pesadas ya se manipularon en los vectores. La expresión se acciona por un promotor temprano del citomegalovirus (CMV) humano y seguido de una señal de poliadenilación del SV40. Los plásmidos tienen secuencia bacteriana para la replicación de plásmidos y marcador de selección de ampicilina y el plásmido para la cadena ligera, pCONKAPPA, tiene el gen GS para la glutamina sintetasa como marcador de selección en células de mamífero. La fusión en marco de regiones variables permite la adecuada expresión del anticuerpo completo. Por diseño, las secuencias conductoras de cadenas ligeras y pesadas de ratón se incluyeron enfrente de los marcos de lectura abiertos del anticuerpo. También se incluyó una secuencia consenso de Kozak (cursiva solo) que rodea el codón de iniciación ATG para mejorar el nivel de expresión de proteínas. Se diseñaron cebadores directos e inversos para la amplificación por PCR de cuatro regiones variables. Para la región variable de la cadena ligera de 10G5 se emplearon el cebador directo, 5'-ATC GAA GCT TGCCGC CAC CAT GAG TGT GCC CAC TCA GGT CCT GGG GTT GCT GCT GCT GTG GCT TAC AGA TGC CAG ATG TGA AAT TGT GTT GAC GCA GTC T-3' (SEC ID Nº: 88) y el cebador inverso, 5'-CCA CCG TAC GTT TGA TTT CCA C-3' (SEC ID Nº: 89). Para la región variable de la cadena pesada 10G5 se emplearon el cebador directo, 5'-ACT GAA GCT TGC CGC CAC CAT GGA ATG GAG CTG GGT CTT TCT CTT CTT CCT GTC AGT AAC TAC AGG TGT CCA CTC CGA GGT GCA GCT GGT GCA GTC T-3' (SEC ID Nº: 90) y el cebador inverso, 5'-ACC GAT GGG CCC TTG GTG GAG GCT-3' (SEC ID Nº: 91). Las secuencias conductoras están en negrita y subrayadas y los sitios de clonación (*Hind*III en los cebadores directos para tanto cadenas ligeras como pesadas, en los cebadores inversos, *Bsi*WI para la cadena ligera y *Apal* para la cadena pesada) se facilitan subrayados y en cursiva.

Las regiones variables se amplificaron por PCR durante 20 ciclos usando estos pares de cebadores y vectores Fab que llevan secuencias de la región variable de 10G5. Los productos de PCR se digirieron con *Hind*III y *Bsi*WI para cadenas ligeras y *Hind*III y *Apal* para cadenas pesadas. Los fragmentos de PCR digeridos con enzima se clonaron en vectores de Lonza (pCONKAPPA para cadena ligera y pCONGAMMA4 para cadena pesada). El casete de expresión entero de la cadena pesada respectiva de vectores pCONGAMMA4 digeridos con *Not*I y *Sal*I se insertó luego en el vector de la cadena ligera correspondiente digerido con las mismas enzimas. Los marcos de lectura abiertos enteros para tanto la cadena ligera como la cadena pesada se verificaron por análisis de secuencias de ADN.

Expresión, purificación y caracterización de anticuerpos. Tanto ADN de plásmido de la cadena ligera y la cadena pesada combinadas como una mezcla de relación 1:1 de ADN de plásmido de la cadena ligera y pesada correspondiente se transfectaron en líneas celulares derivadas de 293. Para vectores pCON, la línea de células en suspensión 293 FREESTYLE™ de INVITROGEN se usó junto con sus reactivos de transfección. Para 200 ml de células 293 FREESTYLE™, 100 µg de cada uno de ADN de plásmido de la cadena pesada y ligera y 300 µl de reactivos se usaron para la transfección. Las células transfectadas se incubaron a 37 °C/5 % de CO₂ durante 7-8 días antes de la recogida. Se recogió el medio de cultivo, se filtró y se concentró usando centrifugación en MILLIPORE CENTRICON® a baja velocidad (concentrador, MILLIPORE).

Resultados. Se presentan análisis de ELISA en las Figuras 5-8. En las Figuras 5-7, los mutantes distinguidos significativamente por su actividad fueron 10G5H6 (VHCDR3: SEC ID Nº: 5; VLCDR3: SEC ID Nº: 41); 10G5H5

(VHCDR3: SEC ID N°: 4; VLCDR3: SEC ID N°: 41); 10G5H11 (VHCDR3: SEC ID N°: 3; VLCDR3: SEC ID N°: 41); y 10G5H33 (VHCDR3: SEC ID N°: 25 (que implican un cambio de residuo de The=>Ile en el tercer al último residuo de aminoácido en su interior); VLCDR3: SEC ID N°: 41). La Figura 8 ilustra diez mutantes destacados en el funcionamiento más eficazmente que 10G5H6. Los mutantes probados en la Figura 8 tienen valores de CE₅₀ y poseen las regiones CDR3 pesadas y ligeras como se enumeran en la Tabla 4.

TABLA 4

Anticuerpo	VHCDR3	VLCDR3	EC ₅₀ (μM)
SJ2-66	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:28	1.757
10G5H6	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:41	1.636
SJ2-88	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:27	1.536
SJ3-50	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:29	1.341
SJ2-74	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:32	1.308
SJ2-63	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:33	1.248
SJ3-68	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:34	1.24
SJ3-71	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:35	1.186
SJ2-57	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:36	1.14
SJ2-85	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:37	1.123
SJ2-81	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:38	0.9334

Se realizaron análisis de KINEXA® en anticuerpos seleccionados. Los datos para los anticuerpos de longitud completa específicos se ilustran en las Tablas 5 y 6 que contienen los datos de dos experimentos diferentes.

TABLA 5

Anticuerpo	VHCDR3	VLCDR3	K _D
10G5-1	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:38	54.84 pM
10G5-2	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:38	45.44 pM
10G5-4	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:38	66.93 pM

TABLA 6

Anticuerpo	VHCDR3	VLCDR3	K _D
10G5 WT	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:41	861 pM
10G5H6	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:41	99.43 pM
10G5-2	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:38	31.44 pM
10G5-4	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:38	20.35 pM
10G5-6	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO: 38	26.8 pM

Se realizaron análisis de BIACORE™ en diversos anticuerpos en formato Fab. Las Tablas 7 y 8 ilustran los datos de dos experimentos diferentes:

TABLA 7

Anticuerpo	VHCDR3	VLCDR3	K _D
10G5 WT	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:41	4.5 nM
10G5H6	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:41	0.6 nM

TABLA 8

Anticuerpo	VHCDR3	VLCDR3	K _D
10G5 WT	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:41	1.35 nM
10G5H11	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:41	106 pM
10G5R4-10	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:41	196 pM
10G5R4-11	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:41	233 pM
10G5R4-2A	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:41	817 pM
10G5R4-2B	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:41	116 pM
10G5SJ2-81	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:38	43 pM

Los datos proporcionados ilustran que los anticuerpos podrían identificarse, mediante las diversas selecciones y análisis realizados, con afinidad significativamente potenciada por IL-13R α 1. Los anticuerpos descubiertos demostraron bastante frecuentemente un consenso general en su secuencia. Más específicamente, se concluyó de estos estudios que (1) tres residuos en el dominio CDR3 de la región variable de la cadena pesada fueron más aptos para efectuar positivamente la función tras la mutación, concretamente, los residuos 1, 7 y 9 de SEC ID N°: 40, y (2) tres residuos en el dominio CDR3 de la región variable de la cadena ligera fueron más aptos para efectuar positivamente la función tras la mutación, concretamente, los residuos 2, 4 y 5 en SEC ID N°: 41.

También se desarrollaron anticuerpos con una región Fc manipulada. Las manipulaciones en la región Fc permitieron que un anticuerpo presentara unión reducida a receptores Fc γ R o C1q. La unión a FcRn (también conocida como el receptor neonatal o receptor de Brambell) no se modifica sustancialmente ni es la semivida del anticuerpo. El fin de las modificaciones fue generar anticuerpos que no provocaran (o provocaran a un menor grado) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), citotoxicidad mediada por el complemento (CMC), o formaran inmunocomplejos, mientras que se retienen las propiedades farmacocinéticas normales (PK). Como se reconocerá por el experto, la estructura del anticuerpo humano IgG desvelada (que engloba SEC ID N°: 92) puede usarse conjuntamente con cualquier variedad de secuencias de V_H y V_L desveladas en el presente documento, con C κ o C λ apropiadas, en el desarrollo de anticuerpos de longitud completa.

Se realizaron análisis de KINEXA[®] sobre anticuerpos seleccionados con la Fc manipulada. Las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos para 10G5-6 en el formato de IgG manipulado se exponen en SEC ID N°: 94 y 95, respectivamente. La Tabla 9 resume datos obtenidos para seleccionar anticuerpos de longitud completa tras el análisis de K_d de 2 curvas usando KINEXA[®].

TABLA 9

Anticuerpo	VHCDR3	VLCDR3	KD
10G5-6 IgG4	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:38	44.36 pM
10G5-6 IgG2m4	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:38	30.79 pM
10G5 WT IgG2m4	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:41	2.06 nM
10G5H6 IgG2m4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:41	94.64 pM

Se ha encontrado que los anticuerpos manipulados de este modo presentan varias ventajas con respecto a los isotipos de IgG nativa. Lo primero es que no se unen a C1q tan fuertemente como IgG2, haciéndola menos eficaz en activar la cascada del complemento. Los anticuerpos manipulados tampoco se unen, o presentan significativamente unión reducida, a receptores de Fc γ a niveles fisiológicamente relevantes, en particular Fc γ RI, que elimina (o reduce significativamente) cualquier activación no deseada de linfocitos NK o linfocitos T; impide significativamente la capacidad del anticuerpo para mediar en ADCC; y elimina (o reduce significativamente) un posible sumidero alternativo para el anticuerpo *in vivo*. Los anticuerpos resultantes también retienen la semivida y estructura básica de una IgG2, que es altamente deseable. La semivida en sangre de la IgG2m4 10G5-6 se encontró en un estudio separado que estaba en el orden de 306 horas cuando se probó en ratones SCID. Esta semivida es comparable con los números informados para IgG2; véase, por ejemplo, Zuckier y col., 1994 Cancer Suppl. 73:794-799.

Ejemplo 10: Estudios funcionales – Liberación de eotaxina

Ensayo de liberación de eotaxina de NHDF. Se compraron células NHDF de Cambrex (n° CC-2509) y se cultivaron en medio FGM (Cambrex, n° CC-3132) complementado con aditivos proporcionados, denominados más adelante medios completos. Las células se sometieron a pases 1:3 o 1:5 una vez a la semana y se monitorizaron para

sensibilidad a IL-13 antes de uso. Para evaluar la actividad antagonista de anticuerpos para IL-13R α 1, las células se resuspendieron a 2×10^6 /ml en medios completos que contenían 20 ng/ml de PMA (SIGMA, n° P8139) y 20 μ g/ml de polimixina (SIGMA, n° P4932) y se sembraron en placas de fondo plano de 96 pocillos (COSTAR, n° 3595) a 1×10^5 célula/pocillo. Se añadieron valoraciones de anticuerpo a las células y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C en un estufa de incubación con 5 % de CO₂. Entonces se usó IL-13 de rhesus recombinante o IL-4 humana recombinante (BD PHARMINGEN, n° 554605) a la CE₅₀ respectiva para cada citocina y se incubaron durante la noche a 37 °C en una estufa de incubación con 5 % de CO₂. Se eliminaron los sobrenadantes y se ensayaron para contenido de eotaxina por inmunoensayo. Brevemente, se recubrieron placas IMMULON®-4 (DYNATECH, n° 3855) con 2 μ g/ml de anticuerpo anti-eotaxina humana (PHARMINGEN, n° 555035) en PBS (INVITROGEN, n° 14190-144) durante la noche a 4 °C. Las placas se bloquearon con tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con tampón de lavado. Los sobrenadantes de las células NHDF se añadieron a las placas junto con un patrón de eotaxina humana recombinante (R&D Systems, n° 320-EO). Las muestras se capturaron durante 2 horas a temperatura ambiente, se lavaron y se añadió anticuerpo de detección anti-eotaxina humana biotinilado (PHARMINGEN, n° 555060) a 200 ng/ml durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y se añadió estreptavidina-europio (Wallac, n° 1244-360) a una concentración de 100 ng/ml durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se realizó una etapa de lavado final y se añadió disolución de potenciación (Wallac, n° 1244-105) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se leyeron por fluorescencia retardada en el tiempo en un lector de placas VICTOR (PERKIN-ELMER).

Resultados. Se analizó la liberación de eotaxina de células de fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) tras el contacto con anticuerpos específicos de IL-13R α 1. Los ensayos se llevaron a cabo usando bien IL-13 y/o IL-4 como estimulante. Cuando se usó IL-13 como agente inductor, los anticuerpos optimizados fueron al menos 2 veces más potentes en estos tipos de ensayos que la forma parental, 10G5. Un ejemplo de la diferencia en veces en el funcionamiento se ilustra en la Figura 9, en la que se determinó que los valores de CI₅₀ para 10G5, 10G5H6 y 10G5-6 eran 310 ng/ml (~2 nM), 110 ng/ml (~730 pM) y 70 ng/ml (~467 pM), respectivamente, con IL-13 como estimulante. La Figura 10 ilustra la inhibición de anticuerpos de la formación de eotaxina por células NHDF en las que IL-4 se usa como estimulante. Se realizó un experimento con varios anticuerpos de longitud completa de la presente descripción. Los datos referentes a la inhibición de la liberación de eotaxina de células NHDF tras la estimulación por IL-13 se resumen en la Tabla 10.

TABLA 10

Anticuerpo	VHCDR3	VLCDR3	EC ₅₀
10G5 WT	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:41	2.309 μ g/ml
10G5-1	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:38	0.497 μ g/ml
10G5-2	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:38	0.456 μ g/ml
10G5-3	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:39	0.614 μ g/ml
10G5-4	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:38	0.330 μ g/ml
10G5-5	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:41	0.939 μ g/ml
10G5H6	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:41	0.474 μ g/ml

Los datos referentes a la inhibición de la liberación de eotaxina de células NHDF tras la estimulación por IL-4 se resumen en la Tabla 11.

TABLA 11

Anticuerpo	VHCDR3	VLCDR3	EC ₅₀
10G5 WT	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:41	4.533 μ g/ml
10G5-1	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:38	0.907 μ g/ml
10G5-2	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:38	0.730 μ g/ml
10G5-3	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:39	0.983 μ g/ml
10G5-4	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:38	0.660 μ g/ml
10G5-5	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:41	2.267 μ g/ml
10G5H6	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:41	1.438 μ g/ml

Ejemplo 11: Estudios funcionales – Fosforilación de STAT6:

Ensayo de fosforilación de STAT6 de NHDF. Se compraron células NHDF de Cambrex (n° CC-2509) y se cultivaron en medio FGM (Cambrex, n° CC-3132) complementado con aditivos proporcionados. Sembrar células NHDF a 2e6/ml en 50 µl de volumen en placas de PCR de polipropileno de fondo en V de 96 pocillos (USA Scientific, n° 1442-9596) en medio RPMI (INVITROGEN, n° 22400-071). Se añadieron anticuerpos anti-IL-13R en 25 µl de volumen y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C. Se añadió IL-13 de rhesus recombinante o IL-4 humana recombinante (PHARMINGEN) en 25 µl de volumen. Las placas se calentaron a 37 °C en la máquina de PCR durante 20 minutos e inmediatamente se añadió un volumen igual de 2X tampón de lisis (100 µl). Se midió pSTAT6 por inmunoensayo. Se recubrieron placas IMMULON®-4 (DYNATECH, n° 3855) con anti-fosfo-STAT6 humano (BD Transduction Labs, 621995) a 10 µg/ml en PBS (INVITROGEN, n° 14290-144) (50 µl/pocillo) durante la noche a 4 °C. Se añadió tampón de bloqueo (200 µl/pocillo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado. Se añadieron cincuenta µl/pocillo de lisado y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado. La detección se permitió con biotina-anti-STAT6 (BD Transduction Labs, relación molar 20:1 conjugada) a 2 µg/ml en tampón de bloqueo (60 µl/pocillo) añadido durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado. Se añadió estreptavidina-europio (Wallac, n° 1244-360) a 100 ng/ml en tampón europio (100 µl/pocillo) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado. Se añadió disolución de potenciación (Wallac, n° 12244-105) (150 µl/pocillo) durante 1 hora a temperatura ambiente, y las placas se leyeron por fluorescencia retardada en el tiempo en un lector VICTOR (PERKIN-ELMER).

Resultados. Se estudió la inhibición por anticuerpos de la fosforilación de STAT6 inducida por IL-13 y IL-4 en células NHDF. Cuando se usó IL-13 como agente inductor, los anticuerpos optimizados fueron al menos 3 veces más potentes en estos tipos de ensayos que la forma parental, 10G5. Un ejemplo de la diferencia de veces en el funcionamiento se ilustra en la Figura 11, en la que se determinó que las CE₅₀ para 10G5 y 10G5H6 eran 2,9 µg/ml y 0,8 µg/ml, respectivamente, con IL-13 como estimulante. La Figura 12 ilustra la inhibición de anticuerpos de la fosforilación de STAT6 en células NHDF, en la que IL-4 se usa como estimulante. Los resultados de este análisis indicaron CE₅₀ de 5,0 µg/ml y 1,8 µg/ml para 10G5 y 10G5H6, respectivamente.

Ejemplo 12: Estudios funcional – Liberación de TARC

Ensayo de liberación de quimiocinas reguladas por el timo y por activación (TARC) (perro, rhesus o humano). Se recogió sangre en tubos VACUTAINER® heparinizados (VWR, VT6480). Se aislaron CMSP sobre medio de separación de linfocitos (ICN, 50494X). Se sembraron CMSP o sangre completa en placas de fondo plano de 96 pocillos (COSTAR, n° 2595). Se añadieron anticuerpos y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadió IL-13 de rhesus recombinante a 10 ng/ml de concentración final y se incubó durante 24-72 horas a 37 °C con CO₂ en una cámara humidificada. Se recogió sobrenadante o plasma (TARC puede detectarse tan pronto como a las 24 horas, pero los niveles continúan aumentando). Se midió TARC por inmunoensayo. Se recubrieron placas IMMULON®-4 (DYNATECH, 3855) con anti-TARC humana (R&D, n° AF364) a 2 µg/ml en PBS (INVITROGEN, n° 14290-144), 50 µl/pocillo. Las placas se incubaron durante la noche a 4 °C. Se añadió tampón de bloqueo (200 µl/pocillo) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado. Se añadió plasma o sobrenadante, 50 µl/pocillo, y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente (plasma diluido 1:2). Se incluyó una curva patrón empezando a 20 ng/ml de TARC humana recombinante diluida 2 veces. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado. La detección se llevó a cabo con biotina-anti-TARC humana (RDI, n° RDI-TarcabrPI, conjugado con relación molar de biotina 20:1) a 250 ng/ml en tampón de bloqueo (60 µl/pocillo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado. Se añadió estreptavidina-europio (Wallac, n° 1244-360) a 100 µl/pocillo a 100 ng/ml en tampón europio durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado. Se añadió disolución de potenciación (Wallac, n° 12244-105), 150 µl/pocillo, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La fluorescencia retardada en el tiempo se leyó en un lector VICTOR (PERKIN-ELMER).

Resultados. Se examinó el efecto de los presentes anticuerpos sobre la liberación de TARC tras la estimulación con 10 ng/ml de IL-13. La Figura 13 ilustra, por ejemplo, la capacidad de 10G5-6 para bloquear la liberación estimulada por IL-13 de TARC (CCL17) en sangre humana completa. El anticuerpo dio una CI₅₀ de ~112 ng/ml, 746 pM. La Figura 14 ilustra el funcionamiento de otro anticuerpo, 10G5H6, frente a 10G5 WT (natural) en un ensayo de liberación de TARC estimulado con IL-13 de sangre humana completa. La Figura 15 ilustra el efecto de 10G5-6 junto a 10G5H6 en bloquear la liberación de TARC después de la estimulación de sangre de rhesus completa con IL-13 de rhesus.

Ejemplo 13: Estudios funcionales – Inhibición de la proliferación celular de enfermedad de Hodgkin:

Procedimientos. Se ensayaron 10G5, 10G5H6 y 10G5-6 para determinar si los anticuerpos fueron o no eficaces en inhibir la proliferación celular de la línea celular de la enfermedad Hodgkin L1236. Se han estudiado previamente células de Hodgkin y de Reed-Sternberg con respecto a la citocina IL-13; véase, por ejemplo, Kapp y col., 1999 J. Exp. Med. 189:1939-1945; Pielnider y col., 2001 Blood 97:250-255; Pielnider y col., 2002 Blood 99:618-626; y en la patente de EE.UU. n° 6.468.528, y los procedimientos de análisis de los mismos se tratan en su interior.

Resultados. En este ensayo, 10G5 dio una CI_{50} de aproximadamente 300 ng/ml (2 nM), mientras que tanto 10G5H6 como 10G5-6 dieron CI_{50} de aproximadamente 50 ng/ml (-330 pM), que para ambos representaron una mejora de aproximadamente 6 veces con respecto a la de la IgG 10G5 parental. Véase la Figura 17.

Aspectos adicionales de la divulgación se exponen a continuación:

1. Un anticuerpo aislado que se une con el receptor alfa 1 de interleucina 13 humana, en donde

(a) la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2, y CDR3 como se expone en las SEC ID N°:82, SEC ID N°:83, y SEC ID N°:121, respectivamente; y

(b) la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2, y CDR3 como se expone en las SEC ID N°:84, SEC ID N°:85, y SEC ID N°:122, respectivamente.

2. El anticuerpo aislado de la realización 1, que comprende además una región constante de la cadena pesada como se expone en la SEC ID N°: 92.

3. Una composición que comprende el anticuerpo de la realización 2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

4. Un anticuerpo aislado que se une con el receptor alfa 1 de interleucina humana que comprende

(a) una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID N°:45, SEC ID N°:51, SEC ID N°: 55, SEC ID N°:59, SEC ID N°:63 y SEC ID N°:67;

(b) una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID N°:49, SEC ID N°:71, SEC ID N°: 75, y SEC ID N°:79; o

(c) una combinación de (a) y (b).

5. El anticuerpo aislado de la realización 4, en donde dicho anticuerpo se produce por la línea celular de hibridoma depositada como el Depósito de ATCC N° PTA-6933.

6. El anticuerpo aislado de la realización 4, que comprende además una región constante de la cadena pesada como se expone en la SEC ID N°:92.

7. El anticuerpo aislado de la realización 6, en donde la región variable de la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N°:63 y la región variable de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N°: 71.

8. Una composición que comprende el anticuerpo de la realización 6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

9. Un anticuerpo aislado que muestra una constante de disociación de equilibrio (K_D) de menos de 200 pM con el receptor alfa 1 de interleucina 13 humana y antagoniza con la actividad mediada por el receptor alfa 1 de interleucina 13 humana, en donde

(a) la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N°:63 o una secuencia por lo menos un 90% homóloga a la secuencia expuesta en la SEC ID N°: 63; y

(b) una región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N°: 71 o una secuencia por lo menos un 90% homóloga a la secuencia expuesta en la SEC ID N°: 71.

10. El anticuerpo aislado de la realización 9, en donde el anticuerpo se caracteriza además por mostrar unión significativamente reducida con un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID NO: 120 en relación a su unión con un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N°: 101.

11. El anticuerpo aislado de la realización 9, que comprende además una región constante de la cadena pesada como se expone en la SEC ID N°:92.

12. Una composición que comprende el anticuerpo de la realización 11 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

13. Un procedimiento para mejorar una afección provocada o exacerbada por la actividad mediada por el receptor alfa 1 de la interleucina 13 que comprende administrar a un sujeto con necesidad de tratamiento una cantidad efectiva de la composición de la realización 2 mejorando de este modo la afección provocada o exacerbada por la actividad mediada por el receptor alfa 1 de la interleucina 13.

14. El procedimiento de la realización 13, en donde la afección es asma, alergia, rinitis alérgica, sinusitis crónica, fiebre del heno, dermatitis atópica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis pulmonar, eosinofilia esofágica, esclerodermia, psoriasis, artritis psoriásica, fibrosis, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, anafilaxia o cáncer.

15. El procedimiento de la realización 14, en donde el cáncer es linfoma de Hodgkin, glioma o carcinoma renal.

16. Un ácido nucleico aislado que codifica una región variable de un anticuerpo que se une con el receptor alfa 1 de la interleucina 13 humana, en donde la región variable comprende

a) una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID N°: 45, SEC ID N°: 51, SEC ID N°: 55, SEC ID N°: 59, SEC ID N°: 63 y SEC ID N°: 67; o

b) una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID N°: 49, SEC ID N°: 71, SEC ID N°: 75 y SEC ID N°: 79.

17. Un vector que comprende el ácido nucleico de la realización 16.

18. Una célula huésped que comprende el vector de la realización 17.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CSL Limited

<120> ANTAGONISTAS DE ANTICUERPOS DE ALTA AFINIDAD DEL RECEPTOR ALFA 1 DE INTERLEUCINA 13

<130> P063795EP

<150> US 60/8522884

<151> 2006-10-19

<160> 123

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Variante optimizada de la cadena sintetica pesada de CDR3

<400> 1

Phe Pro Asn Trp Gly Ala Leu Asp Gln
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Variante optimizada de la cadena sintetica pesada de CDR3

<400> 2

ES 2 658 239 T3

		Val	Pro	Asn	Trp	Gly	Ser	Leu	Asp	Thr
		1				5				
5	<210> 3									
	<211> 9									
	<212> PRT									
	<213> Secuencia artificial									
10	<220>									
	<223> Variante optimizada de la cadena sintetica pesada de CDR3									
	<400> 3									
15		Phe	Pro	Asn	Trp	Gly	Ser	Met	Asp	Ala
		1				5				
	<210> 4									
	<211> 9									
20	<212> PRT									
	<213> Secuencia artificial									
	<220>									
25	<223> Variante optimizada de la cadena sintetica pesada de CDR3									
	<400> 4									
30		Phe	Pro	Asn	Trp	Gly	Ser	Leu	Asp	His
		1				5				
	<210> 5									
35	<211> 9									
	<212> PRT									
	<213> Secuencia artificial									
	<220>									
40	<223> Variante optimizada de la cadena sintetica pesada de CDR3									
	<400> 5									
45		Met	Pro	Asn	Trp	Gly	Ser	Phe	Asp	Tyr
		1				5				
	<210> 6									
50	<211> 9									
	<212> PRT									
	<213> Secuencia artificial									
55	<220>									
	<223> Variante optimizada de la cadena sintetica pesada de CDR3									
	<400> 6									
60		Met	Pro	Asn	Trp	Gly	Ser	Phe	Asp	Thr
		1				5				
	<210> 7									

ES 2 658 239 T3

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Variante optimizada de la cadena sintetica pesada de CDR3

<400> 7

10

Met Pro Asn Trp Gly Ser Leu Asp His
 1 5

15 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Variante optimizada de la cadena sintetica pesada de CDR3

<400> 8

25

Met Pro Asn Trp Gly Ser Phe Asp Ser
 1 5

30 <210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Variante optimizada de la cadena sintetica pesada de CDR3

<400> 9

40

Met Pro Asn Trp Gly Ser Leu Asp Thr
 1 5

45 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> Variante optimizada de la cadena sintetica pesada de CDR3

<400> 10

55

Met Pro Asn Trp Gly Ser Leu Asp Ala
 1 5

60 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> Variante optimizada de la cadena sintetica pesada de CDR3

<400> 11

5 Met Pro Asn Trp Gly Ser Leu Asp Asn
1 5

<210> 12

10 $\langle 211 \rangle$ 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

15 <223> Variante optimizada de la cadena sintetica pesada de CDR3

<400> 12

20 Met Pro Asn Trp Gly Ala Leu Asp Ser
1 5

<210> 13

25 $\langle 211 \rangle$ 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Variante optimizada de la cadena sintetica pesada de CDR3

<400> 13

35 Met Pro Asn Trp Gly Ser Phe Asp Asn
1 5

<210> 14

40 $\langle 211 \rangle$ 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Variante optimizada de la cadena sintetica pesada de CDR3

<400> 14

50 Met Pro Asn Trp Gly Ser Leu Asp Tyr
1 5

<210> 15

55 $\langle 211 \rangle$ 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

60 <223> Variante optimizada de la cadena sintetica pesada de CDR3

<400> 15

65 Met Pro Asn Trp Gly Ser Phe Asp His
1 5

<210> 16
<211> 9
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante optimizada de la cadena sintetica pesada de CDR3

10 <400> 16

Met Pro Asn Trp Gly Ser Leu Asp Ser
1 5

<210> 17

<211> 9
20 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante optimizada de la cadena sintetica pesada de CDR3

25 <400> 17

Met Pro Asn Trp Gly Ser Leu Asp Gly
1 5

<210> 18

<211> 9
35 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
40 <223> Variante optimizada de la cadena sintetica pesada de CDR3

<400> 18

Val Pro Asn Trp Gly Ser Leu Asp Asn
1 5

<210> 19

<211> 28
50 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
55 <223> Secuencia de la variante sintetica con CDR3 optimizado

<400> 19

Cys Ala Arg Phe Pro Asn Trp Gly Ser Leu Asp His Trp Gly Gln Gly
1 5 10 15

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Ile Lys Gly
20 25

<210> 20
 <211> 28
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de la variante sintetica con CDR3 optimizado
 10 <400> 20
 Cys Ala Arg Met Pro Asn Trp Gly Ser Leu Asp His Trp Gly Gln Gly
 1 5 10 15
 15
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 20 25
 <210> 21
 20 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Secuencia de la variante sintetica con CDR3 optimizado
 <400> 21
 30
 Cys Ala Arg Met Pro Asn Trp Gly Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 1 5 10 15
 35
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Ile Lys Gly
 20 25
 40 <210> 22
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Secuencia de la variante sintetica con CDR3 optimizado
 <400> 22
 50
 Val Arg Met Pro Asn Trp Gly Ser Leu Asp His Trp
 1 5 10
 55 <210> 23
 <211> 27
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de la variante sintetica con CDR3 optimizado
 65 <400> 23

Val Arg Met Pro Asn Trp Gly Ser Leu Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Ile Lys Gly
20 25

<210> 24
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de la variante sintetica con CDR3 optimizado

<400> 24

Ala Arg Met Pro Asn Trp Gly Ser Leu Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Ile Lys Gly
20 25

<210> 25
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de la variante sintetica con CDR3 optimizado

<400> 25

Phe Pro Asn Trp Gly Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
1 5 10 15

Thr Val Ser Ser Ala Ser Ile Lys Gly
20 25

<210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Variante optimizada de la cadena sintetica pesada de CDR3

<400> 26

Val Pro Asn Trp Gly Ser Leu Asp Ala
1 5

<210> 27
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cadina ligera sintetica de CDR3 variante optimizada
 <400> 27
 5
 Gln Arg Tyr Ser Thr
 1 5
 10
 <210> 28
 <211> 5
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadina ligera sintetica de CDR3 variante optimizada
 20 <400> 28
 Gln Arg Tyr Ala Thr
 1 5
 25
 <210> 29
 <211> 5
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadina ligera sintetica de CDR3 variante optimizada
 35 <400> 29
 Gln Met Tyr Ser Thr
 1 5
 40
 <210> 30
 <211> 5
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadina ligera sintetica de CDR3 variante optimizada
 50 <400> 30
 Gln Gln Val Gly Thr
 1 5
 55
 <210> 31
 <211> 5
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadina ligera sintetica de CDR3 variante optimizada
 65 <400> 31

		Gln Val Tyr Ser Thr
		1 5
5	<210> 32 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cadina ligera sintetica de CDR3 variante optimizada <400> 32	
15		Gln Gln Tyr Ser Thr
		1 5
20	<210> 33 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cadina ligera sintetica de CDR3 variante optimizada <400> 33	
30		Gln Ser Tyr Ser Thr
		1 5
35	<210> 34 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Cadina ligera sintetica de CDR3 variante optimizada <400> 34	
45		Gln Gln Tyr Ala Thr
		1 5
50	<210> 35 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cadina ligera sintetica de CDR3 variante optimizada <400> 35	
60		Gln Gln Tyr Ser Ser
		1 5
65	<210> 36 <211> 5 <212> PRT	

ES 2 658 239 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena ligera sintetica de CDR3 variante optimizada
 5 <400> 36

 Gln Thr Tyr Ser Thr
 1 5
 10
 <210> 37
 <211> 5
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena ligera sintetica de CDR3 variante optimizada
 20 <400> 37

 Gln Gln Tyr Gly Ser
 1 5
 25
 <210> 38
 <211> 5
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena ligera sintetica de CDR3 variante optimizada
 35 <400> 38

 Gln Gln Tyr Ala Ser
 1 5
 40
 <210> 39
 <211> 5
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena ligera sintetica de CDR3 variante optimizada
 50 <400> 39

 Gln Gln Tyr Glu Ala
 1 5
 55
 <210> 40
 <211> 9
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> 10G5 sintético de la cadena pesada CDR3
 65 <400> 40

Phe Pro Asn Trp Gly Ser Phe Asp Tyr
1 5

5
 <210> 41
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> 10G5 sintético de la cadena ligera CDR3
 <400> 41

15
Gln Gln Tyr Glu Thr
1 5

20
 <210> 42
 <211> 414
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25
 <220>
 <223> Secuencia 10G5 VH sintético con líder y región adicional constante
 <400> 42

30 **tttgcctcg tccctggctt gttcctccaa ggagtctgtg ccgaggtgca gctggtgcag 60**
 tctggagcag aggtgaaaaa gcccggggag tctctgaaga tctcctgtaa gggttctgga 120
 35 **tacagcttta ccagctactg gatcggctgg gtgcgccaga tgcccgggaa aggcctggag 180**
 tggatggggg tcatctatcc tgggtgactct tataccagat acagcccgtc cttccaaggc 240
 40 **caggtcacca tctcagccga caagtccatc agcaccgcct acctgcagtg gagcagcctg 300**
 aaggcctcgg acaccgccat gtattactgt gcgagattcc ccaactgggg ctcatattgac 360
 tactgggggcc aggggaaccct ggtcaccgtc tctcagcct ccaccaaggg ccca 414

45
 <210> 43
 <211> 354
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

55
 <220>
 <223> Solo secuencia de 10G5 VH sintético
 <400> 43

60

65

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tgggctgggt gcgccagatg 120
 5 cccgggaaag gcctggagtg gatggggggtc atctatcctg gtgactctta taccagatac 180
 agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 10 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagattcccc 300
 aactggggct catttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

15 <210> 44
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia 10G5 VH sintético con líder y región adicional constante
 <400> 44

25 Phe Ala Leu Val Pro Gly Leu Phe Leu Gln Gly Val Cys Ala Glu Val
 1 5 10 15

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

35 Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile
 35 40 45

40 Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Val
 50 55 60

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

50 Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln
 85 90 95

55 Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg
 100 105 110

60 Phe Pro Asn Trp Gly Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 115 120 125

65 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 130 135

ES 2 658 239 T3

<210> 45
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Solo secuencia de 10G5 VH sintético

<400> 45

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 46
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia 10G5 VL sintético con lider y región adicional constante

<400> 46

ES 2 658 239 T3

	ttcttcctcc tgctactctg gctcccagat accaccggag aaattgtgtt gacgcagtct	60
	ccaggcacc tgtctttgtc tccaggggaa agagccacc tctcctgcag ggccagtcag	120
5	agtattagca gcagctactt agcctggtag cagcagaaac ctggccaggc tcccaggctc	180
	ctcatctatg gtgcatccag cagggccact ggcacccag acaggttcag tggcagtggg	240
10	tctgggacag acttcactct caccatcagc agactggagc ctgaagattt tgcagtgtat	300
	tactgtcagc agtatgagac gttcggccaa gggaccaagg tggaaatcaa acgaactgtg	360
	gctgcacca	369
15	<210> 47 <211> 312 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Solo secuencia de 10G5 VL sintético	
	<400> 47	
25	gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
	ctctcctgca gggccagtc gagtattagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa	120
30	cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca	180
	gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag	240
35	cctgaagatt ttgcagtgtt ttactgtcag cagtatgaga cgttcggcca agggaccaag	300
	gtggaaatca aa	312
40	<210> 48 <211> 123 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Secuencia 10G5 VL sintético con líder y región adicional constante	
	<400> 48	
50		
55		
60		
65		

ES 2 658 239 T3

	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Pro	Asp	Thr	Thr	Gly	Glu	Ile	Val	
	1				5					10					15		
5	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	
				20					25					30			
10	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ala	
			35					40					45				
15	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	
	50						55					60					
20	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	
	65					70					75					80	
25	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	
					85					90					95		
30	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Glu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	
				100					105					110			
35	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro						
			115					120									
40	<210> 49																
	<211> 104																
	<212> PRT																
	<213> Secuencia artificial																
45	<220>																
	<223> Solo secuencia 10G5 VL sistetico																
50	<400> 49																
55																	
60																	
65																	

	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
	1				5				10						15	
5	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser
				20					25					30		
10	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
			35					40					45			
15	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
		50					55					60				
20	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
	65					70					75					80
25	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Glu	Thr	Phe	Gly
					85					90					95	
30	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys								
				100												
	<210> 50															
	<211> 445															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia artificial															
35	<220>															
	<223> Cadena pesada de 10G5-1.3 sintético															
40	<400> 50															
45																
50																
55																
60																
65																

ES 2 658 239 T3

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

	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	
	210						215					220					
5	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	
	225					230					235					240	
10	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	
					245					250					255		
15	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	
				260					265					270			
20	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	
			275					280					285				
25	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	
		290					295					300					
30	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	
	305					310					315					320	
35	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	
					325					330					335		
40	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	
				340					345					350			
45	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	
			355					360					365				
50	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	
		370					375					380					
55	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	
	385					390					395					400	
60	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	
					405					410					415		
65	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	
				420					425					430			
70	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys				
			435					440					445				

<210> 51
<211> 118

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> 10G5-1,3 VH Sintético

<400> 51

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

<210> 52
<211> 1338
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Cadena pesada de 10G5-1,3 sintético

<400> 52

55

60

65

ES 2 658 239 T3

	gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc	60
	tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg	120
5	cccgggaaag gcctggagtg gatgggggtc atctatcctg gtgactctta taccagatac	180
	agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac	240
10	ctccagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagaatgcct	300
	aattggggct catttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc	360
	accaagggcc catccgtctt ccccctggcg ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca	420
15	gccgccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac	480
	tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tcctacagtc ctcaggactc	540
20	tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc	600
	tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agagagttga gtccaaatat	660
	ggtcccccct gccccaccatg cccagcacct gagttcctgg ggggaccatc agtcttcctg	720
25	ttccccccaa aacccaagga cactctcatg atctcccgga cccctgaggt cacgtgctg	780
	gtggtggacg tgagccagga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg	840
30	gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg	900
	gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggtggaacg gcaaggagta caagtgcaag	960
	gtctccaaca aaggcctccc gtcctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag	1020
35	ccccgagagc cacaggtgta caccctgccc ccatcccagg aggagatgac caagaaccag	1080
	gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccocagcg acatcgccgt ggagtgggag	1140
40	agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc	1200
	tccttcttcc tctacagcag gctaaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc	1260
	ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc	1320
45	ctgtctctgg gtaaatga	1338

<210> 53

<211> 354

50 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 10G5-1,3 VH sintético

55

<400> 53

60

65

ES 2 658 239 T3

	gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc	60
	tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg	120
5	cccggaag gcctggagt gatgggggtc atctatcctg gtgactctta taccagatac	180
	agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac	240
10	ctccagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagaatgcct	300
	aattggggct catttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca	354

15	<210> 54
	<211> 445
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
20	<220>
	<223> Cadena pesada de 10G5-2 sintético
	<400> 54

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 658 239 T3

	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	
	1				5					10					15		
5	Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr	
				20					25					30			
10	Trp	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35					40					45				
15	Gly	Val	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ser	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe	
	50						55					60					
20	Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	
25	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90					95		
30	Val	Arg	Met	Pro	Asn	Trp	Gly	Ser	Leu	Asp	His	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
				100					105					110			
35	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	
			115					120					125				
40	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	
		130					135					140					
45	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	
	145					150					155					160	
50	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	
					165				170						175		
55	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	
				180					185					190			
60	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	
			195					200					205				
65	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	
		210					215					220					
70	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	
	225					230					235					240	

	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	
					245					250					255		
5	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	
				260					265					270			
10	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	
			275					280					285				
15	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	
		290					295					300					
20	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	
	305					310					315					320	
25	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	
					325					330					335		
30	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	
				340					345					350			
35	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	
			355					360					365				
40	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	
		370					375					380					
45	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	
		385				390					395					400	
50	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	
					405					410					415		
55	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	
				420					425					430			
60	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys				
			435					440					445				

<210> 55

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 10G5-2 VH Sintético

<400> 55

ES 2 658 239 T3

	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
	1				5					10					15	
5	Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr
				20					25					30		
10	Trp	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
			35					40					45			
15	Gly	Val	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ser	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe
		50					55					60				
20	Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
	65					70					75					80
25	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
30	Val	Arg	Met	Pro	Asn	Trp	Gly	Ser	Leu	Asp	His	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
				100					105					110		
35	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
				115												
40	<210> 56 <211> 1338 <212> ADN <213> Secuencia artificial															
45	<220> <223> Cadena pesada de 10G5-2 sintético <400> 56															
50																
55																
60																
65																

	gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc	60
	tctgtgaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg	120
5	cccggaag gcctggagtg gatgggggtc atctatcctg gtgactctta taccagatac	180
	agcccgctct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac	240
10	ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgt gagaatgccc	300
	aactggggct cactggacca ttggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctgagcctcc	360
	accaagggcc catccgtctt cccctcggcg ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca	420
15	gccgccctgg gctgcctggg caaggactac ttccccgaac cgggtgacggg gtcgtggaac	480
	tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tcctacagtc ctgaggactc	540
	tactccctca gcagcgtggg gaccgtgccc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc	600
20	tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gtccaaatat	660
	ggccccccat gccccaccatg cccagcacct gagttcctgg ggggaccatc agtcttctctg	720
25	ttccccccaa aaccgaagga cactctcatg atctcccgga cccctgaggt cacgtgcgtg	780
	gtggtggagc tgagccagga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg	840
	gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg	900
30	gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgcaag	960
	gtctccaaca aaggcctccc gtcctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag	1020
35	ccccgagagc cacaggtgta caccctgccc ccatcccagg aggagatgac caagaaccag	1080
	gtcagcctga cctgcctggg caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag	1140
	agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc	1200
40	tccttcttcc tctacagcag gctaaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc	1260
	ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc	1320
	ctgtctctgg gtaaatga	1338

45

<210> 57

<211> 354

<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> 10G5-2 VH Sintético

55 <400> 57

60

65

ES 2 658 239 T3

```

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccgggggagtc tctgaagatc      60
tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg      120
5  cccgggaaag gcctggagtg gatgggggtc atctatcctg gtgactctta taccagatac      180
agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac      240
10 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgt gagaatgccc      300
aactggggct cactggacca ttggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca      354

```

```

15 <210> 58
    <211> 445
    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial
20 <220>
    <223> Cadena pesada de 10G5-4,5 sintético
25 <400> 58

```

```

    Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
    1          5          10          15
30 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
    20          25          30

```

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 658 239 T3

	Trp	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35					40					45				
5	Gly	Val	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ser	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe	
	50						55					60					
10	Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	
15	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90					95		
20	Val	Arg	Met	Pro	Asn	Trp	Gly	Ser	Leu	Asp	His	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
				100					105					110			
25	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Ile	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	
			115					120					125				
30	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	
	130						135					140					
35	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	
	145					150					155					160	
40	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	
					165					170					175		
45	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	
				180					185					190			
50	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	
		195						200					205				
55	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	
	210						215					220					
60	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	
	225					230					235					240	
65	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	
					245					250					255		
	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	
				260					265					270			
	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	
			275					280					285				

ES 2 658 239 T3

	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	
	290						295					300					
5	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	
	305					310					315					320	
10	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	
					325					330					335		
15	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	
				340					345					350			
20	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	
			355					360					365				
25	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	
	370						375					380					
30	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	
	385					390					395					400	
35	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	
					405					410					415		
40	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	
				420					425					430			
45	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys				
			435				440						445				
50	<210> 59																
	<211> 118																
	<212> PRT																
	<213> Secuencia artificial																
55	<220>																
	<223> 10G5-4,5 VH Sintético																
60	<400> 59																
65	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	
	1				5					10				15			
70	Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr	
				20					25					30			
75	Trp	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35					40					45				

ES 2 658 239 T3

	Gly	Val	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ser	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe
	50						55					60				
5	Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
	65					70					75					80
10	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
15	Val	Arg	Met	Pro	Asn	Trp	Gly	Ser	Leu	Asp	His	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
				100					105					110		
20	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
				115												
25	<210> 60															
	<211> 1338															
	<212> ADN															
	<213> Secuencia artificial															
30	<220>															
	<223> Cadena pesada de 10G5-4 sintético															
35	<400> 60															
40																
45																
50																
55																
60																
65																

ES 2 658 239 T3

	gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc	60
	tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg	120
5	cccggaag gcctggagtg gatgggggtc atctatcctg gtgactctta taccagatac	180
	agcccgctcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac	240
	ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgt gagaatgccc	300
10	aactggggct cactggacca ttggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc	360
	atcaagggcc catccgtctt cccctggcg ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca	420
	gccgccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac	480
15	tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tcctacagtc ctcaggactc	540
	tactccctca gcagcgtggt gaccgtgcc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc	600
20	tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggaggaca agagagttga gtccaaatat	660
	ggtcccccat gccaccatg cccagcacct gagttcctgg ggggaccatc agtcttcctg	720
25	ttcccccaa aacccaagga cactctcatg atctcccgga cccctgaggt cacgtgcgtg	780
	gtggtggacg tgagccagga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg	840
	gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg	900
30	gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgcaag	960
	gtctccaaca aaggcctccc gtctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag	1020
	ccccgagagc cacaggtgta caccctgcc ccatccagg aggagatgac caagaaccag	1080
35	gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag	1140
	agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc	1200
40	tccttcttcc tctacagcag gctaaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc	1260
	ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc	1320
	ctgtctctgg gtaaatga	1338

45

<210> 61
<211> 354
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50

<220>
<223> 10G5-4,5 VH Sintético

55

<400> 61

60

65

ES 2 658 239 T3

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccgggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
 5 cccgggaaag gcctggagtg gatgggggtc atctatcctg gtgactctta taccagatac 180
 agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgt gagaatgccc 300
 10 aactggggct cactggacca ttggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 62
 <211> 445
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena pesada de 10G5-6,8 sintético
 20
 <400> 62

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 25
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 30
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 35
 Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 40
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 45
 50
 55
 60
 65

ES 2 658 239 T3

	65		70		75		80									
5	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
				85						90					95	
10	Ala	Arg	Met	Pro	Asn	Trp	Gly	Ser	Leu	Asp	His	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
				100					105					110		
15	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro
			115					120					125			
20	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
		130					135					140				
25	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
	145					150					155					160
30	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
				165					170						175	
35	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
				180				185						190		
40	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser
			195					200					205			
45	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys
	210						215					220				
50	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
	225					230					235					240
55	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
				245						250					255	
60	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln
				260					265					270		
65	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
			275					280					285			
70	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu
		290					295					300				
75	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys
	305					310					315					320

ES 2 658 239 T3

	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys
					325					330					335	
5	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser
				340					345					350		
10	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
			355					360					365			
15	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
		370					375					380				
20	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
	385					390					395					400
25	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln
				405						410					415	
30	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn
			420						425					430		
35	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys			
		435					440						445			
40	<210> 63 <211> 118 <212> PRT <213> Secuencia artificial															
45	<220> <223> 10G5-6,8 VH sintético <400> 63															
50																
55																
60																
65																

ES 2 658 239 T3

	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	
	1				5					10					15		
5	Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr	
				20					25					30			
10	Trp	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35					40					45				
15	Gly	Val	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ser	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe	
		50					55					60					
20	Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	
25	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90					95		
30	Ala	Arg	Met	Pro	Asn	Trp	Gly	Ser	Leu	Asp	His	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
				100					105					110			
35	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
				115													
40	<210> 64																
	<211> 1338																
	<212> ADN																
	<213> Secuencia artificial																
45	<220>																
	<223> Cadena pesada de 10G5-6,8 VH sintético																
50	<400> 64																
55																	
60																	
65																	

ES 2 658 239 T3

	gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccgggggagtc tctgaagatc	60
	tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg	120
5	cccggaag gcctggagtg gatgggggtc atctatcctg gtgactctta taccagatac	180
	agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac	240
10	ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagaatgccc	300
	aactggggct cacttgacca ttggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc	360
	accaagggcc catccgtctt cccctggcg ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca	420
15	gccgccctgg gctgcctggg caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac	480
	tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tcctacagtc ctcaggactc	540
20	tactccctca gcagcgtggg gaccgtgccc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc	600
	tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gtccaaatat	660
	ggtcccccct gccaccatg cccagcacct gagttcctgg ggggaccatc agtcttctctg	720
25	ttccccccaa aacccaagga cactctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg	780
	gtggtggacg tgagccagga agaccccag gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg	840
30	gaggtgcata atgccaaagc aaagccgagg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg	900
	gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag	960
	gtctccaaca aaggcctccc gtcctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag	1020
35	ccccgagagc cacaggtgta caccctgccc ccatcccagg aggagatgac caagaaccag	1080
	gtcagcctga cctgcctggg caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag	1140
40	agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc	1200
	tccttcttcc tctacagcag gctaaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc	1260
	ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc	1320
45	ctgtctctgg gtaaatga	1338

<210> 65

<211> 354

<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> 10G5-6,8 VH sintético

55 <400> 65

60

65

ES 2 658 239 T3

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
 5 cccgggaaag gcctggagtg gatgggggtc atctatcctg gtgactctta taccagatac 180
 agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagaatgccc 300
 10 aactgggggt cacttgacca ttggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 66
 15 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Cadena pesada 10G5-7 sintético
 <400> 66

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

ES 2 658 239 T3

	Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Ile Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro	115	120	125
5	Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly	130	135	140
10	Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn	145	150	155
15	Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln	165	170	175
20	Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser	180	185	190
25	Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser	195	200	205
30	Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys	210	215	220
35	Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu	225	230	235
40	Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu	245	250	255
45	Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln	260	265	270
50	Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys	275	280	285
55	Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu	290	295	300
60	Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys	305	310	315
65	Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys	325	330	335
	Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser	340	345	350
	Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys	355	360	365

ES 2 658 239 T3

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

5 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

10 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

15 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

20 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

25 <210> 67
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> 10G5-7 VH sintético

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

40 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

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

55 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

65 Ala Arg Met Pro Asn Trp Gly Ser Leu Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

70 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

ES 2 658 239 T3

<210> 68
 <211> 1338
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena pesada de 10G5-7 sintético

<400> 68

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

```

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc      60
tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg      120
cccgggaaag gcctggagtg gatgggggtc atctatcctg gtgactctta taccagatac      180
agcccgctcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac      240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagaatgccc      300
aactggggct cacttgacca ttggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc      360
atcaagggcc catccgtctt cccctggcg ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca      420
gccgccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac      480
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tcctacagtc ctcaggactc      540
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc      600
tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gtccaaatat      660
gggtcccccat gccaccatg cccagcacct gagttcctgg ggggaccatc agtcttcctg      720
ttccccccaa aacccaagga cactctcatg atctcccgga cccctgaggt cacgtgcgtg      780
gtggtggacg tgagccagga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg      840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg      900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggtgaaacg gcaaggagta caagtgcaag      960
gtctccaaca aaggcctccc gtcctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag      1020
ccccgagagc cacaggtgta caccctgccc ccatcccagg aggagatgac caagaaccag      1080
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccocagcg acatcgccgt ggagtgggag      1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc      1200
tccttcttcc tctacagcag gctaaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc      1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc      1320
ctgtctctgg gtaaatga                                     1338
  
```

<210> 69
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 658 239 T3

<220>

<223> 10G5-7 VH Sintético

<400> 69

5	gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc	60
	tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg	120
10	cccggaag gcctggagt gatgggggtc atctatcctg gtgactctta taccagatac	180
	agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac	240
15	ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagaatgccc	300
	aactggggct cacttgacca ttggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca	354

<210> 70

20 <211> 211

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Cadena ligera de 10G5-1,2,4,6,7 sintético

<400> 70

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 658 239 T3

	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
	1	5 10 15
5	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Ser	
		20 25 30
10	Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu	
		35 40 45
15	Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser	
		50 55 60
20	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu	
		65 70 75 80
25	Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Ser Phe Gly	
		85 90 95
30	Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val	
		100 105 110
35	Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser	
		115 120 125
40	Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln	
		130 135 140
45	Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val	
		145 150 155 160
50	Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu	
		165 170 175
55	Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu	
		180 185 190
60	Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg	
		195 200 205
	Gly Glu Cys	
		210
	<210> 71	
	<211> 104	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	

<220>

<223> 10G5-1,2,4,6,7 VL Sintético

<400> 71

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

<210> 72

<211> 636

<212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de 10G5-1,2,4,6,7 sintético

45 <400> 72

50

55

60

65

ES 2 658 239 T3

5 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtattagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 10 cctgaagatt ttgcagtgtt ttactgtcag cagtatgctt cgttcggcca agggaccaag 300
 gtggaaatca aacgtacggg ggctgcacca tctgtcttca tcttcccggc atctgatgag 360
 cagttgaaat ctggaactgc ctctgttgtg tgcctgctga ataacttcta tcccagagag 420
 15 gccaaagtac agtggagagg ggataacgcc ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc 480
 acagagcagg acagcaagga cagcacctac agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa 540
 20 gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg 600
 cccgtcacaa agagcttcaa caggggagag tgtag 636

25 <210> 73
 <211> 312
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> 10G5-1,2,4,6,7 VL sintético

<400> 73

35 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtattagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 40 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtt ttactgtcag cagtatgctt cgttcggcca agggaccaag 300
 45 gtggaaatca aa 312

50 <210> 74
 <211> 211
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena ligera 10G5-3 sintético

<400> 74

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

65 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Ser

ES 2 658 239 T3

	20	25	30
5	Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu 35 40 45		
10	Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser 50 55 60		
15	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu 65 70 75 80		
20	Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Ala Phe Gly 85 90 95		
25	Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val 100 105 110		
30	Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser 115 120 125		
35	Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln 130 135 140		
40	Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val 145 150 155 160		
45	Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu 165 170 175		
50	Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu 180 185 190		
55	Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg 195 200 205		
60	Gly Glu Cys 210		
65	<210> 75 <211> 104 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> 10G5-3 VL sintético <400> 75		

ES 2 658 239 T3

	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	
	1				5					10					15		
5	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser	
				20					25					30			
10	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	
			35					40					45				
15	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	
		50					55					60					
20	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu	
	65					70					75					80	
25	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Glu	Ala	Phe	Gly	
					85					90					95		
30	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys									
				100													
30	<210> 76																
	<211> 636																
	<212> ADN																
	<213> Secuencia artificial																
35	<220>																
	<223> Cadena ligera 10G5-3 sintético																
	<400> 76																
40	gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60																
	ctctcctgca gggccagtca gagtattagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120																
45	cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180																
	gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240																
	cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatgagg cgttcggcca agggaccaag 300																
50	gtggaaatca aacgtacggt ggctgcacca tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag 360																
	cagttgaaat ctggaactgc ctctgtttgtg tgctgtctga ataacttcta tcccagagag 420																
55	gccaaagtac agtggaaggt ggataacgcc ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc 480																
	acagagcagg acagcaagga cagcacctac agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa 540																
	gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg 600																
60	cccgtcacaa agagcttcaa caggggagag tgttag 636																

<210> 77

65

ES 2 658 239 T3

<211> 312
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> 10G5-3 VL sintético
 <400> 77

10	gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
	ctctcctgca gggccagtca gagtattagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa	120
15	cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca	180
	gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag	240
	cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatgagg cgttcggcca agggaccaag	300
20	gtggaaatca aa	312

<210> 78
 <211> 211
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Cadena ligera de 10G5-5,8 sintético
 30 <400> 78

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 658 239 T3

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

<210> 79

<211> 104

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 10G5-5,8 VL sintético

<400> 79

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

<210> 80

<211> 636

40 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de 10G5-5,8 sintético

45

<400> 80

50

55

60

65

ES 2 658 239 T3

	gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
	ctctcctgca gggccagtca gagtattagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa	120
5	cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca	180
	gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag	240
	cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatgaga cgttcggcca agggaccaag	300
10	gtggaaatca aacgtacggg ggctgcacca tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag	360
	cagttgaaat ctggaactgc ctctgttgtg tgcctgctga ataacttcta tcccagagag	420
15	gccaaagtac agtggaaggt ggataacgcc ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc	480
	acagagcagg acagcaagga cagcacctac agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa	540
	gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg	600
20	cccgtcacaa agagcttcaa caggggagag tgttag	636

<210> 81
 <211> 312
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> 10G5-5,8 VL sintético
 <400> 81

35	gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
	ctctcctgca gggccagtca gagtattagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa	120
	cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca	180
40	gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag	240
	cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatgaga cgttcggcca agggaccaag	300
45	gtggaaatca aa	312

<210> 82
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> 10G5 VH CDR1 sintético
 <400> 82

60	Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Gly
	1 5 10

<210> 83
 <211> 10
 <400> 82

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <223> 10G5 VH CDR2 sintético

<400> 83

Val Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Arg
1 5 10

<210> 84
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> 10G5 VL CDR1 sintético
<400> 84

25 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

30 <210> 85
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> 10G5 VL CDR2 sintético
<400> 85

40 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

45 <210> 86
 <211> 487
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> pFAB3D-10G5H constructo sintético
<400> 86

55 Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15

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

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly
65 35 40 45

ES 2 658 239 T3

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met
 50 55 60
 5
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asp Ser
 65 70 75 80
 10
 Tyr Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala
 85 90 95
 15
 Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala
 100 105 110
 20
 Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Pro Asn Trp Gly Ser
 115 120 125
 25
 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 130 135 140
 30
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 145 150 155 160
 35
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 165 170 175
 40
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 180 185 190
 45
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 195 200 205
 50
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 210 215 220
 55
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
 225 230 235 240
 60
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Thr
 245 250 255
 65
 Ser Gly His His His His His His Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser
 260 265 270
 Glu Glu Asp Leu Gly Gly Pro Phe Val Cys Glu Tyr Gln Gly Gln Ser
 275 280 285
 Ser Asp Leu Pro Gln Pro Pro Val Asn Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 290 295 300

ES 2 658 239 T3

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser
 305 310 315 320
 5
 Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser
 325 330 335
 10
 Gly Asp Phe Asp Tyr Glu Lys Met Ala Asn Ala Asn Lys Gly Ala Met
 340 345 350
 15
 Thr Glu Asn Ala Asp Glu Asn Ala Leu Gln Ser Asp Ala Lys Gly Lys
 355 360 365
 20
 Leu Asp Ser Val Ala Thr Asp Tyr Gly Ala Ala Ile Asp Gly Phe Ile
 370 375 380
 25
 Gly Asp Val Ser Gly Leu Ala Asn Gly Asn Gly Ala Thr Gly Asp Phe
 385 390 395 400
 30
 Ala Gly Ser Asn Ser Gln Met Ala Gln Val Gly Asp Gly Asp Asn Ser
 405 410 415
 35
 Pro Leu Met Asn Asn Phe Arg Gln Tyr Leu Pro Ser Leu Pro Gln Ser
 420 425 430
 40
 Val Glu Cys Arg Pro Tyr Val Phe Gly Ala Gly Lys Pro Tyr Glu Phe
 435 440 445
 45
 Ser Ile Asp Cys Asp Lys Ile Asn Leu Phe Arg Gly Val Phe Ala Phe
 450 455 460
 50
 Leu Leu Tyr Val Ala Thr Phe Met Tyr Val Phe Ser Thr Phe Ala Asn
 465 470 475 480
 Ile Leu Arg Asn Lys Glu Ser
 485
 <210> 87
 <211> 235
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> pFAB3D-10G5L constructo sintético
 60 <400> 87
 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 65

Ala Gln Pro Ala Met Ala Ser Arg Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro
20 25 30

5 Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg
35 40 45

10 Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60

15 Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala
65 70 75 80

20 Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

25 Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr
100 105 110

30 Cys Gln Gln Tyr Glu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115 120 125

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

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

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

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

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

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

60 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 88
<211> 100
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de PCR sintético

<400> 88

5 **atcgaagctt gccgccacca tgagtgtgcc cactcaggtc ctgggggttgc tgctgctgtg 60**
 gcttacagat gccagatgtg aaattgtgtt gacgcagtct 100

10 <210> 89
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador de PCR sintético

 <400> 89
 20 ccaccgtacg ttgatttc ac 22

 <210> 90
 <211> 97
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR sintético
 30 <400> 90

actgaagctt gccgccacca tggaatggag ctgggtcttt ctcttcttcc tgtcagtaac 60
 35 **tacaggtgtc cactccgagg tgcagctggt gcagtct 97**

40 <210> 91
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador de PCR sintético

 <400> 91
 50 accgatgggc ccttggtgga ggct 24

 <210> 92
 <211> 326
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Dominio Fc sintético de IgG2m4

60 <400> 92

65

ES 2 658 239 T3

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

5

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

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 658 239 T3

	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	
			35					40					45				
5																	
	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	
		50					55					60					
10																	
	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Thr	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	
	65					70					75					80	
15																	
	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	
					85					90					95		
20																	
	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	
				100					105					110			
25																	
	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	
			115					120					125				
30																	
	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	
		130					135					140					
35																	
	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	
	145				150						155					160	
40																	
	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	
					165					170					175		
45																	
	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	
				180					185					190			
50																	
	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	
			195					200					205				
55																	
	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	
		210					215					220					
60																	
	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	
	225					230					235					240	
65																	
	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	
					245					250					255		
70																	
	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	
				260					265					270			
75																	
	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	
			275					280					285				

ES 2 658 239 T3

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

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

10 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 93

<211> 978

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constante sintético de IGG2M4

20

<400> 93

	gcctccacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag	60
25	agcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg	120
	tggaaactcag gcgccctgac cagcggcggtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca	180
30	ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgacctcca gcaactttgg caccgagacc	240
	tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgg	300
	aaatgctgcy tggagtgtccc accatgtccc gcacctccag tggccgggacc atcagtcttc	360
35	ctgttcccc caaaacccaa ggacactctc atgatctccc ggacctctga ggtcacgtgc	420
	gtgggtggtgg acgtgagcca ggaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggatggc	480
40	gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt	540
	gtgggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc	600
	aaggtctcca acaaaggcct cccgtcctcc atcgagaaaa ccactctcaa aaccaaaggg	660
45	cagccccgag agccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac	720
	caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcg cgtggagtgg	780
50	gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccatgct ggactccgac	840
	ggctccttct tcctctacag caagctaacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaat	900
	gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc	960
55	tccctgtctc ctggtaaa	978

<210> 94

<211> 444

60 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 10G5-6 sintético de cadena pesada IGG2M4

65

<400> 94

ES 2 658 239 T3

	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	
	1				5					10					15		
5																	
	Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr	
				20					25					30			
10																	
	Trp	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35					40					45				
15																	
	Gly	Val	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ser	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe	
		50					55					60					
20																	
	Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	
25																	
	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90					95		
30																	
	Ala	Arg	Met	Pro	Asn	Trp	Gly	Ser	Leu	Asp	His	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
				100					105					110			
35																	
	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	
			115					120					125				
40																	
	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	
		130					135					140					
45																	
	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	
	145					150					155					160	
50																	
	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	
					165					170					175		
55																	
	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Thr	Ser	Ser	
				180					185					190			
60																	
	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	
			195					200					205				
65																	
	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	
		210					215					220					
70																	
	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	
	225					230					235					240	

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

5 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

10 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

15 Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

20 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

25 Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
325 330 335

30 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

35 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

40 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

45 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

50 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

55 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 95

<211> 1332

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 10G5-6 sintético de cadena pesada IGG2M4

<400> 95

ES 2 658 239 T3

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
 5 cccgggaaag gcctggagtg gatgggggtc atctatcctg gtgactctta taccagatac 180
 agcccgctcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 10 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagaatgccc 300
 aactggggct cacttgacca ttggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc 360
 accaagggcc catccgtctt cccctggcg ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca 420
 15 gccgccctgg gctgcctggg caaggactac ttccccgaac cggtgacggg gtcgtggaac 480
 tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tcctacagtc ctcaggactc 540
 20 tactccctca gcagcgtggg gaccgtgacc tccagcaact ttggcagca gacctacacc 600
 tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agacagttga gcggaatgc 660
 tgcgtaggag gcccaccatg cccagcacct ccagtggcg gaccatcagt cttcctgttc 720
 25 ccccaaaaac ccaaggacac tctcatgatc tcccgagccc ctgaggtcac gtgcgtggg 780
 gtggacgtga gccaggaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag 840
 gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagttca acagcacgtt ccgtgtggtc 900
 30 agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc 960
 tccaacaaag gcctcccgtc ctccatcgag aaaaccatct ccaaaaccaa agggcagccc 1020
 35 cgagagccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc 1080
 agcctgacct gcctgggtcaa aggtttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1140
 aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctccca tgctggactc cgacggctcc 1200
 40 ttcttcctct acagcaagct aaccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaatgtcttc 1260
 tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cacagaagag cctctccctg 1320
 45 tctcctggta aa 1332

<210> 96

<211> 444

50 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 10G5-6 sintético de cadena pesada IGG2M4

55

<400> 96

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 60

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 65

ES 2 658 239 T3

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

ES 2 658 239 T3

	275	280	285	
5	Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr 290 295 300			
10	Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val 305 310 315 320			
15	Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr 325 330 335			
20	Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg 340 345 350			
25	Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly 355 360 365			
30	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro 370 375 380			
35	Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser 385 390 395 400			
40	Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln 405 410 415			
45	Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His 420 425 430			
50	Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 435 440			
55	<210> 97 <211> 336 <212> PRT <213> Secuencia artificial			
60	<220> <223> Construcción sintética que contiene el dominio Fc de IgG1			
65	<400> 97			

ES 2 658 239 T3

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

5

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
20 25 30

10

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
35 40 45

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 658 239 T3

	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	
	50					55					60						
5																	
	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	
	65					70				75						80	
10																	
	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	
					85					90						95	
15																	
	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	
				100					105					110			
20																	
	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	
			115					120					125				
25																	
	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	
	130					135						140					
30																	
	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	
	145				150					155						160	
35																	
	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	
					165					170						175	
40																	
	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	
				180					185					190			
45																	
	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	
			195					200					205				
50																	
	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	
		210					215					220					
55																	
	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	
	225				230					235						240	
60																	
	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	
					245				250					255			
65																	
	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	
				260					265				270				
70																	
	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	
		275						280				285					
75																	
	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	

ES 2 658 239 T3

	290	295	300	
5	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala			
	305	310	315	320
10	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
		325	330	335
15	<210> 98			
	<211> 332			
	<212> PRT			
	<213> Secuencia artificial			
20	<220>			
	<223> Construcción sintética que contiene el dominio Fc de IgG2			
	<400> 98			
25				
30				
35				
40				
45				
50				
55				
60				
65				

[illegible]

ES 2 658 239 T3

	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	
				180					185					190			
5	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	
			195					200					205				
10	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	
		210					215					220					
15	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	
	225					230					235					240	
20	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	
					245					250					255		
25	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	
				260					265					270			
30	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	
			275					280					285				
35	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	
		290					295					300					
40	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	
	305					310					315					320	
45	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys					
					325					330							
50	<210>	99															
	<211>	333															
	<212>	PRT															
	<213>	Secuencia artificial															
55	<220>																
	<223>	Construcción sintética que contiene el dominio Fc de IgG4															
	<400>	99															
60	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	
	1				5					10					15		
65	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	
				20					25					30			
70	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	
				35				40					45				

ES 2 658 239 T3

	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	
	50					55					60						
5																	
	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	
	65					70					75					80	
10																	
	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	
					85					90					95		
15																	
	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	
				100					105					110			
20																	
	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	
			115					120					125				
25																	
	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	
	130					135					140						
30																	
	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	
	145				150					155					160		
35																	
	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	
					165					170					175		
40																	
	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	
				180					185					190			
45																	
	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	
			195			200						205					
50																	
	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	
	210				215					220							
55																	
	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	
	225				230					235					240		
60																	
	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	
				245					250					255			
65																	
	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	
				260				265					270				
70																	
	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	
				275				280					285				
75																	
	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	
	290				295				300								

ES 2 658 239 T3

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

5 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325 330

<210> 100
 <211> 332
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética que contiene el dominio Fc de IgG2m4

<400> 100

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

25 Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 20 25 30

30 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 35 40 45

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

40 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Thr Ser Ser
 65 70 75 80

45 Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 85 90 95

50 Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys
 100 105 110

55 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 115 120 125

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

65 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 145 150 155 160

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

ES 2 658 239 T3

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 180 185 190
 5
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 195 200 205
 10
 Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
 210 215 220
 15
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 225 230 235 240
 20
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 245 250 255
 25
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 260 265 270
 30
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 275 280 285
 35
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 290 295 300
 40
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 305 310 315 320
 45
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 50
 <210> 101
 <211> 401
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 55
 Ala Pro Thr Glu Thr Gln Pro Pro Val Thr Asn Leu Ser Val Ser Val
 1 5 10 15
 60
 Glu Asn Leu Cys Thr Val Ile Trp Thr Trp Asn Pro Pro Glu Gly Ala
 20 25 30
 65
 Ser Ser Asn Cys Ser Leu Trp Tyr Phe Ser His Phe Gly Asp Lys Gln
 35 40 45
 70
 Asp Lys Lys Ile Ala Pro Glu Thr Arg Arg Ser Ile Glu Val Pro Leu
 50 55 60

ES 2 658 239 T3

	Asn	Glu	Arg	Ile	Cys	Leu	Gln	Val	Gly	Ser	Gln	Cys	Ser	Thr	Asn	Glu	65	70	75	80
5	Ser	Glu	Lys	Pro	Ser	Ile	Leu	Val	Glu	Lys	Cys	Ile	Ser	Pro	Pro	Glu		85	90	95
10	Gly	Asp	Pro	Glu	Ser	Ala	Val	Thr	Glu	Leu	Gln	Cys	Ile	Trp	His	Asn		100	105	110
15	Leu	Ser	Tyr	Met	Lys	Cys	Ser	Trp	Leu	Pro	Gly	Arg	Asn	Thr	Ser	Pro		115	120	125
20	Asp	Thr	Asn	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Tyr	Trp	His	Arg	Ser	Leu	Glu	Lys	Ile		130	135	140
25	His	Gln	Cys	Glu	Asn	Ile	Phe	Arg	Glu	Gly	Gln	Tyr	Phe	Gly	Cys	Ser		145	150	155
	Phe	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	Lys	Asp	Ser	Ser	Phe	Glu	Gln	His	Ser	Val		165	170	175
30	Gln	Ile	Met	Val	Lys	Asp	Asn	Ala	Gly	Lys	Ile	Lys	Pro	Ser	Phe	Asn		180	185	190
35	Ile	Val	Pro	Leu	Thr	Ser	Arg	Val	Lys	Pro	Asp	Pro	Pro	His	Ile	Lys		195	200	205
40	Asn	Leu	Ser	Phe	His	Asn	Asp	Asp	Leu	Tyr	Val	Gln	Trp	Glu	Asn	Pro		210	215	220
45	Gln	Asn	Phe	Ile	Ser	Arg	Cys	Leu	Phe	Tyr	Glu	Val	Glu	Val	Asn	Asn		225	230	235
	Ser	Gln	Thr	Glu	Thr	His	Asn	Val	Phe	Tyr	Val	Gln	Glu	Ala	Lys	Cys		245	250	255
50	Glu	Asn	Pro	Glu	Phe	Glu	Arg	Asn	Val	Glu	Asn	Thr	Ser	Cys	Phe	Met		260	265	270
55	Val	Pro	Gly	Val	Leu	Pro	Asp	Thr	Leu	Asn	Thr	Val	Arg	Ile	Arg	Val		275	280	285
60	Lys	Thr	Asn	Lys	Leu	Cys	Tyr	Glu	Asp	Asp	Lys	Leu	Trp	Ser	Asn	Trp		290	295	300
65	Ser	Gln	Glu	Met	Ser	Ile	Gly	Lys	Lys	Arg	Asn	Ser	Thr	Leu	Tyr	Ile		305	310	315
																				320

ES 2 658 239 T3

Thr Met Leu Leu Ile Val Pro Val Ile Val Ala Gly Ala Ile Ile Val
 325 330 335
 5
 Leu Leu Leu Tyr Leu Lys Arg Leu Lys Ile Ile Ile Phe Pro Pro Ile
 340 345 350
 10
 Pro Asp Pro Gly Lys Ile Phe Lys Glu Met Phe Gly Asp Gln Asn Asp
 355 360 365
 15
 Asp Thr Leu His Trp Lys Lys Tyr Asp Ile Tyr Glu Lys Gln Thr Lys
 370 375 380
 20
 Glu Glu Thr Asp Ser Val Val Leu Ile Glu Asn Leu Lys Lys Ala Ser
 385 390 395 400
 Gln
 25 <210> 102
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> 10G5 VH Sintético de CDR2
 <400> 102
 35
 Val Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
 1 5 10 15
 40 Gly
 45 <210> 103
 <211> 324
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 103
 50
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Glu Ser Arg Thr Glu Thr Gln Pro Pro Val
 1 5 10 15
 55
 Thr Asn Leu Ser Val Ser Val Glu Asn Leu Cys Thr Val Ile Trp Thr
 20 25 30
 60
 Trp Asn Pro Pro Glu Gly Ala Ser Ser Asn Cys Ser Leu Trp Tyr Phe
 35 40 45
 65

ES 2 658 239 T3

	Ser	His	Phe	Gly	Asp	Lys	Gln	Asp	Lys	Lys	Ile	Ala	Pro	Glu	Thr	Arg	
	50						55					60					
5	Arg	Ser	Ile	Glu	Val	Pro	Leu	Asn	Glu	Arg	Ile	Cys	Leu	Gln	Val	Gly	
	65					70					75					80	
10	Ser	Gln	Cys	Ser	Thr	Asn	Glu	Ser	Glu	Lys	Pro	Ser	Ile	Leu	Val	Glu	
					85					90					95		
15	Lys	Cys	Ile	Ser	Pro	Pro	Glu	Gly	Asp	Pro	Glu	Ser	Ala	Val	Thr	Glu	
				100					105					110			
20	Leu	Gln	Cys	Ile	Trp	His	Asn	Leu	Ser	Tyr	Met	Lys	Cys	Ser	Trp	Leu	
			115					120					125				
25	Pro	Gly	Arg	Asn	Thr	Ser	Pro	Asp	Thr	Asn	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Tyr	Trp	
	130						135					140					
30	His	Arg	Ser	Leu	Glu	Lys	Ile	His	Gln	Cys	Glu	Asn	Ile	Phe	Arg	Glu	
	145					150					155					160	
35	Gly	Gln	Tyr	Phe	Gly	Cys	Ser	Phe	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	Lys	Asp	Ser	
					165					170					175		
40	Ser	Phe	Glu	Gln	His	Ser	Val	Gln	Ile	Met	Val	Lys	Asp	Asn	Ala	Gly	
				180					185					190			
45	Lys	Ile	Lys	Pro	Ser	Phe	Asn	Ile	Val	Pro	Leu	Thr	Ser	Arg	Val	Lys	
			195					200					205				
50	Pro	Asp	Pro	Pro	His	Ile	Lys	Asn	Leu	Ser	Phe	His	Asn	Asp	Asp	Leu	
	210						215					220					
55	Tyr	Val	Gln	Trp	Glu	Asn	Pro	Gln	Asn	Phe	Ile	Ser	Arg	Cys	Leu	Phe	
	225					230					235					240	
60	Tyr	Glu	Val	Glu	Val	Asn	Asn	Ser	Gln	Thr	Glu	Thr	His	Asn	Val	Phe	
					245					250				255			
65	Tyr	Val	Gln	Glu	Ala	Lys	Cys	Glu	Asn	Pro	Glu	Phe	Glu	Arg	Asn	Val	
				260					265					270			
70	Glu	Asn	Thr	Ser	Cys	Phe	Met	Val	Pro	Gly	Val	Leu	Pro	Asp	Thr	Leu	
			275					280					285				
75	Asn	Thr	Val	Arg	Ile	Arg	Val	Lys	Thr	Asn	Lys	Leu	Cys	Tyr	Glu	Asp	
	290						295					300					

Asp Lys Leu Trp Ser Asn Trp Ser Gln Glu Met Ser Ile Gly Lys Lys
305 310 315 320

5

Arg Asn Ser Thr

<210> 104

<211> 401

10 <212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<400> 104

15

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

20

Glu Asn Leu Cys Thr Val Ile Trp Thr Trp Asn Pro Pro Glu Gly Ala
20 25 30

25

Ser Pro Asn Cys Ser Leu Trp Tyr Phe Ser His Phe Gly Asp Lys Gln
35 40 45

30

Asp Lys Lys Leu Ala Pro Glu Thr Arg Arg Ser Lys Glu Val Pro Leu
50 55 60

35

Asn Glu Lys Ile Cys Leu Gln Val Gly Ser Gln Cys Ser Thr Asn Glu
65 70 75 80

40

Ser Glu Lys Pro Ser Ile Leu Val Glu Lys Cys Ile Ser Pro Pro Glu
85 90 95

45

Gly Asp Pro Glu Ser Ala Val Thr Glu Leu Gln Cys Ile Trp His Asn
100 105 110

50

Leu Ser Tyr Met Gln Cys Ser Trp Leu Pro Gly Arg Asn Thr Ser Pro
115 120 125

55

Asp Thr Asn Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp His Arg Ser Leu Glu Lys Ile
130 135 140

60

Arg Gln Cys Glu Glu Ile Tyr Lys Glu Gly Gln Tyr Phe Gly Cys Ser
145 150 155 160

65

Phe Asp Leu Thr Lys Val Lys Asp Ser Ser Phe Glu Gln His Ser Val
165 170 175

Gln Ile Met Val Lys Asp Tyr Ala Gly Lys Ile Lys Pro Ser Phe Asn
180 185 190

ES 2 658 239 T3

	Ile	Val	Pro	Leu	Thr	Ser	Arg	Val	Lys	Pro	Asp	Pro	Pro	His	Ile	Lys	
			195					200					205				
5	Asn	Leu	Ser	Phe	His	Asn	Gly	Asp	Leu	His	Val	Gln	Trp	Glu	Asn	Pro	
		210					215					220					
10	Gln	Asn	Phe	Ile	Ser	Arg	Cys	Leu	Phe	Tyr	Glu	Val	Glu	Val	Asn	Asn	
	225					230					235					240	
15	Ser	Gln	Thr	Glu	Thr	His	Asn	Val	Phe	Ser	Val	Gln	Glu	Ala	Lys	Cys	
					245					250					255		
20	Gln	Asn	Pro	Glu	Phe	Glu	Arg	Asn	Val	Glu	Asn	Thr	Ser	Cys	Phe	Met	
				260					265					270			
25	Val	Pro	Gly	Val	Leu	Pro	Asp	Thr	Leu	Asn	Thr	Val	Arg	Ile	Arg	Val	
			275					280					285				
30	Lys	Thr	Asn	Lys	Leu	Cys	Tyr	Glu	Asp	Asp	Lys	Leu	Trp	Ser	Asn	Trp	
		290					295					300					
35	Ser	Gln	Glu	Met	Ser	Ile	Gly	Lys	Lys	Arg	Asn	Ser	Thr	Leu	Tyr	Ile	
	305					310					315					320	
40	Thr	Met	Leu	Leu	Ile	Val	Pro	Val	Ile	Val	Ala	Gly	Ala	Ile	Ile	Val	
					325					330					335		
45	Leu	Leu	Leu	Tyr	Leu	Lys	Arg	Leu	Lys	Ile	Ile	Ile	Phe	Pro	Pro	Ile	
				340					345					350			
50	Pro	Asp	Pro	Gly	Lys	Ile	Phe	Lys	Glu	Met	Phe	Gly	Asp	Gln	Asn	Asp	
			355					360					365				
55	Asp	Thr	Leu	His	Trp	Lys	Lys	Tyr	Asp	Ile	Tyr	Glu	Lys	Gln	Thr	Lys	
		370					375					380					
60	Glu	Glu	Thr	Asp	Ser	Val	Val	Leu	Ile	Glu	Asn	Leu	Lys	Lys	Ala	Ser	
	385					390					395					400	
65	Gln																
	<210>	105															
	<211>	398															
	<212>	PRT															
	<213>	Mus musculus															
	<400>	105															

ES 2 658 239 T3

	Thr	Glu	Val	Gln	Pro	Pro	Val	Thr	Asn	Leu	Ser	Val	Ser	Val	Glu	Asn	
	1				5					10					15		
5	Leu	Cys	Thr	Ile	Ile	Trp	Thr	Trp	Ser	Pro	Pro	Glu	Gly	Ala	Ser	Pro	
				20					25					30			
10	Asn	Cys	Thr	Leu	Arg	Tyr	Phe	Ser	His	Phe	Asp	Asp	Gln	Gln	Asp	Lys	
			35					40					45				
15	Lys	Ile	Ala	Pro	Glu	Thr	His	Arg	Lys	Glu	Glu	Leu	Pro	Leu	Asp	Glu	
		50					55					60					
20	Lys	Ile	Cys	Leu	Gln	Val	Gly	Ser	Gln	Cys	Ser	Ala	Asn	Glu	Ser	Glu	
	65					70					75					80	
25	Lys	Pro	Ser	Pro	Leu	Val	Lys	Lys	Cys	Ile	Ser	Pro	Pro	Glu	Gly	Asp	
					85					90					95		
30	Pro	Glu	Ser	Ala	Val	Thr	Glu	Leu	Lys	Cys	Ile	Trp	His	Asn	Leu	Ser	
				100					105					110			
35	Tyr	Met	Lys	Cys	Ser	Trp	Leu	Pro	Gly	Arg	Asn	Thr	Ser	Pro	Asp	Thr	
			115					120					125				
40	His	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Tyr	Trp	Tyr	Ser	Ser	Leu	Glu	Lys	Ser	Arg	Gln	
		130					135					140					
45	Cys	Glu	Asn	Ile	Tyr	Arg	Glu	Gly	Gln	His	Ile	Ala	Cys	Ser	Phe	Lys	
	145					150					155					160	
50	Leu	Thr	Lys	Val	Glu	Pro	Ser	Phe	Glu	His	Gln	Asn	Val	Gln	Ile	Met	
					165					170					175		
55	Val	Lys	Asp	Asn	Ala	Gly	Lys	Ile	Arg	Pro	Ser	Cys	Lys	Ile	Val	Ser	
				180					185					190			
60	Leu	Thr	Ser	Tyr	Val	Lys	Pro	Asp	Pro	Pro	His	Ile	Lys	His	Leu	Leu	
			195					200					205				
65	Leu	Lys	Asn	Gly	Ala	Leu	Leu	Val	Gln	Trp	Lys	Asn	Pro	Gln	Asn	Phe	
		210					215					220					
70	Arg	Ser	Arg	Cys	Leu	Thr	Tyr	Glu	Val	Glu	Val	Asn	Asn	Thr	Gln	Thr	
	225					230					235					240	
75	Asp	Arg	His	Asn	Ile	Leu	Glu	Val	Glu	Glu	Asp	Lys	Cys	Gln	Asn	Ser	
				245						250					255		

	Glu	Ser	Asp	Arg	Asn	Met	Glu	Gly	Thr	Ser	Cys	Phe	Gln	Leu	Pro	Gly	
				260					265					270			
5	Val	Leu	Ala	Asp	Ala	Val	Tyr	Thr	Val	Arg	Val	Arg	Val	Lys	Thr	Asn	
			275					280					285				
10	Lys	Leu	Cys	Phe	Asp	Asp	Asn	Lys	Leu	Trp	Ser	Asp	Trp	Ser	Glu	Ala	
		290					295					300					
15	Gln	Ser	Ile	Gly	Lys	Glu	Gln	Asn	Ser	Thr	Phe	Tyr	Thr	Thr	Met	Leu	
	305					310					315					320	
20	Leu	Thr	Ile	Pro	Val	Phe	Val	Ala	Val	Ala	Val	Ile	Ile	Leu	Leu	Phe	
					325					330					335		
25	Tyr	Leu	Lys	Arg	Leu	Lys	Ile	Ile	Ile	Phe	Pro	Pro	Ile	Pro	Asp	Pro	
				340					345					350			
30	Gly	Lys	Ile	Phe	Lys	Glu	Met	Phe	Gly	Asp	Gln	Asn	Asp	Asp	Thr	Leu	
			355					360					365				
35	His	Trp	Lys	Lys	Tyr	Asp	Ile	Tyr	Glu	Lys	Gln	Ser	Lys	Glu	Glu	Thr	
		370					375					380					
40	Asp	Ser	Val	Val	Leu	Ile	Glu	Asn	Leu	Lys	Lys	Ala	Ala	Pro			
	385					390					395						
40	<210> 106																
	<211> 30																
	<212> ADN																
	<213> Secuencia artificial																
45	<220>																
	<223> VH sintético de CDR1																
	<400> 106																
50	ggatacagct ttaccagcta ctggatcggc 30																
	<210> 107																
	<211> 30																
	<212> ADN																
55	<213> Secuencia artificial																
	<220>																
	<223> VH sintético de CDR2																
60	<400> 107																
	gtcatctatc ctggtgactc ttataccaga 30																
65	<210> 108																
	<211> 27																
	<212> ADN																

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> VH sintético de CDR3
 5 <400> 108
 ttccccaact ggggctcatt tgactac 27
 <210> 109
 10 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> VL sintético de CDR1
 <400> 109
 agggccagtc agagattagc agcagctact tagcc 35
 20 <210> 110
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> VL sintético de CDR2
 <400> 110
 30 ggtgcatcca gcagggccac t 21
 <210> 111
 <211> 15
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> VL sintético de CDR3
 40 <400> 111
 cagcagtatg agacg 15
 45 <210> 112
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> 10G5-6 VH sintético de CDR3
 <400> 112
 55 atgcccaact ggggctcact tgaccat 27
 <210> 113
 <211> 15
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> VL sintético de CDR3
 65 <400> 113

cagcagtatg cttcg 15

<210> 114
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR sintético

10 <220>
 <221> CARACTERISTICA_MISC
 <222> (19)..(19)
 <223> Y denota C or T

15 <400> 114

ggggtcaacc gccatcctyg 20

20 <210> 115
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Cebador de PCR sintético

<400> 115

30 gtctccttcc tcatcttct gcc 24

<210> 116
 <211> 23
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR sintético

40 <400> 116

cccatcggtc ttcccctgg cac 23

45 <210> 117
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 50 <223> Cebador de PCR sintético

<220>
 <221> CARACTERISTICA_MISC
 <222> (1)..(1)
 55 <223> Y denota C or T

<400> 117

ytcttctcc tgctactctg gctc 24

60 <210> 118
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65

<220>
 <223> Cebador de PCR sintético

<400> 118

5 atggtgttc agaccaggt ctc 24

<210> 119
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR sintético

15 <400> 119

gaaatctgga actgcctctg ttgtgcct gc 32

20 <210> 120
 <211> 401
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Receptor de la IL-1 sintético 13alfa polipéptido

<400> 120

30

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

35

Glu	Asn	Leu	Cys	Thr	Val	Ile	Trp	Thr	Trp	Asn	Pro	Pro	Glu	Gly	Ala
			20					25					30		

40

Ser	Ser	Asn	Cys	Ser	Leu	Trp	Tyr	Phe	Ser	His	Phe	Gly	Asp	Lys	Gln
		35					40					45			

45

Asp	Lys	Lys	Ile	Ala	Pro	Glu	Thr	Arg	Arg	Ser	Ile	Glu	Val	Pro	Leu
	50					55					60				

50

Asn	Glu	Arg	Ile	Cys	Leu	Gln	Val	Gly	Ser	Gln	Cys	Ser	Thr	Asn	Glu
65					70					75					80

55

Ser	Glu	Lys	Pro	Ser	Ile	Leu	Val	Glu	Lys	Cys	Ile	Ser	Pro	Pro	Glu
				85					90					95	

60

65

ES 2 658 239 T3

	Gly Asp Pro Glu Ser Ala Val Thr Glu Leu Gln Cys Ile Trp His Asn	
	100	105 110
5	Leu Ser Tyr Met Lys Cys Ser Trp Leu Pro Gly Arg Asn Thr Ser Pro	
	115	120 125
10	Asp Thr Asn Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp His Arg Ser Leu Glu Lys Ile	
	130	135 140
15	His Gln Cys Glu Asn Ile Phe Arg Glu Gly Gln Tyr Phe Gly Cys Ser	
	145	150 155 160
20	Phe Asp Leu Thr Lys Val Lys Asp Ser Ser Phe Glu Gln His Ser Val	
	165	170 175
25	Gln Ile Met Val Lys Asp Asn Ala Gly Lys Ile Lys Pro Ser Phe Asn	
	180	185 190
30	Ile Val Pro Leu Thr Ser Arg Val Lys Pro Asp Pro Pro His Ile Lys	
	195	200 205
35	Asn Leu Ser Phe His Asn Asp Asp Leu Tyr Val Gln Trp Glu Asn Pro	
	210	215 220
40	Gln Asn Phe Ile Ser Arg Cys Leu Ala Tyr Glu Val Glu Val Asn Asn	
	225	230 235 240
45	Ser Gln Thr Glu Thr His Asn Val Phe Tyr Val Gln Glu Ala Lys Cys	
	245	250 255
50	Glu Asn Pro Glu Phe Glu Arg Asn Val Glu Asn Thr Ser Cys Phe Met	
	260	265 270
55	Val Pro Gly Val Leu Pro Asp Thr Leu Asn Thr Val Arg Ile Arg Val	
	275	280 285
60	Lys Thr Asn Lys Leu Cys Tyr Glu Asp Asp Lys Leu Trp Ser Asn Trp	
	290	295 300
65	Ser Gln Glu Met Ser Ile Gly Lys Lys Arg Asn Ser Thr Leu Tyr Ile	
	305	310 315 320
70	Thr Met Leu Leu Ile Val Pro Val Ile Val Ala Gly Ala Ile Ile Val	
	325	330 335
75	Leu Leu Leu Tyr Leu Lys Arg Leu Lys Ile Ile Ile Phe Pro Pro Ile	
	340	345 350

[illegible]

<223> Xaa denota Gln, Arg, Met, Ser, Thr o Val.

<220>
 <221> CARACTERISTICA_MISC
 5 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa denota Tyr o Val.

<220>
 <221> CARACTERISTICA_MISC
 10 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa denota Glu, Ala, Gly o Ser.

<220>
 <221> CARACTERISTICA_MISC
 15 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa denota Thr, Ala o Ser.

<400> 122

20

	Gln	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
	1				5

<210> 123
 25 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <223> VL sintético de CDR1

<400> 123

35 agggccagtc agagtattag cagcagctac ttagcc 36

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

1. Un anticuerpo aislado que (i) compite con el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma depositada como el Depósito de ATCC N° PTA-6933 para unirse con hIL-13R α 1; (ii) inhibe la señalización de IL-13; y (iii) en donde una sustitución en un péptido de hIL-13R α 1 del residuo de fenilalanina que corresponde a la posición 233 de la SEC ID N°:101 con un residuo de alanina lleva a la pérdida de la unión entre dicho anticuerpo y el péptido de hIL-13R α 1 mutante resultante en comparación con la unión entre dicho anticuerpo y el péptido de hIL-13R α 1 sin dicha sustitución.

2. El anticuerpo aislado de cualquier reivindicación anterior que muestra por lo menos una de las siguientes:

- (i) inhibición de la liberación de eotaxina inducida por IL-13 en células NHDF;
- (ii) inhibición de la liberación de eotaxina inducida por IL-4 en células NHDF;
- (iii) inhibición de la fosforilación de STAT6 inducida por IL-13 en células NHDF;
- (iv) inhibición de la fosforilación de STAT6 inducida por IL-4 en células NHDF; y
- (v) inhibición de liberación estimulada por IL-13 de TARC en sangre o PBMCs.

3. El anticuerpo aislado de cualquier reivindicación anterior que se une con IL-13R α 1 humana con un K_D de 5×10^{-9} o menos como se determina por tecnologías de resonancia de plasmones superficiales.

4. El anticuerpo aislado de cualquier reivindicación anterior que es humano, humanizado, desimmunizado, quimérico o primatizado.

5. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

6. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 5.

7. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 6.

8. Una composición que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

9. Un anticuerpo aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una composición de acuerdo con la reivindicación 8, para el uso en terapia.

10. Un anticuerpo aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una composición de acuerdo con la reivindicación 8, para su uso en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección mediada por IL-13R α 1, en donde dicha enfermedad, trastorno o afección es asma, alergia, rinitis alérgica, sinusitis crónica, fiebre del heno, dermatitis atópica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis pulmonar, eosinofilia esofágica, esclerodermia, psoriasis, artritis psoriásica, fibrosis, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, anafilaxia o cáncer.

11. El anticuerpo aislado para el uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el cáncer es linfoma de Hodgkin, glioma o carcinoma renal.

12. Un procedimiento para cribar para moléculas de anticuerpos que apuntan a la misma región en hIL-13R α 1 que el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma depositada como Depósito de ATCC N° PTA-6933, que implica (a) analizar la unión de una molécula de anticuerpo de interés con (i) un polipéptido de hIL-13R α 1 aislado de la SEC ID NO: 101 ó un fragmento de 5 a 350 aminoácidos del mismo que incluye el aminoácido correspondiente al residuo 233 de la SEC ID NO: 101; y (ii) un polipéptido de hIL-13R α 1 aislado o un fragmento de 5 a 350 aminoácidos del mismo en donde el aminoácido correspondiente al residuo 233 de la SEC ID NO: 101 es una alanina en lugar de una fenilalanina; (b) identificar aquellos anticuerpos que enlazan con el polipéptido aislado o fragmento del paso (a)(i) pero muestran unión significativamente reducida con el polipéptido aislado o fragmento del paso (a)(ii); y (c) recuperar los anticuerpos identificados en el paso (b).

13. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, el anticuerpo para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, o el procedimiento de la reivindicación 12 en donde la reducción en la unión es más de 10 veces entre el anticuerpo y el polipéptido humano en comparación con la unión entre el anticuerpo y el polipéptido de tipo salvaje.

14. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, el anticuerpo para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 ó 13, o el procedimiento de la reivindicación 12 ó 13 en donde el péptido de hIL-13R α 1 sin dicha sustitución es la región extracelular de hIL-13R α 1 humana (números de aminoácidos 1-317 de la SEC ID N°: 1001).

15. El procedimiento de la reivindicación 12 en donde el fragmento del polipéptido de hIL-13R α 1 aislado de la SEC ID N°:101 que incluye el aminoácido correspondiente con el residuo 233 de la SEC ID N°:101 es la región extracelular de hIL-13R α 1, y el fragmento de un polipéptido de hIL-13R α 1 aislado en donde el aminoácido correspondiente al residuo 233 de la SEC ID N°:101 es una alanina es el mutante Phe233Ala correspondiente de la región extracelular de hIL-13R α 1.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGT
 E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C

AAGGTTCTGGATACAGCTTTACCAGCTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAGGC
 K G S G Y S F T S Y W I G W V R Q M P G K G

CDR1

CTGGAGTGGATGGGGTCATCTATCCTGGTGACTCTTATACAGATACAGCCCGTCTCTCCAAGGC
 L E W M G V I Y P G D S Y T R Y S P S F Q G

CDR2

CAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCC
 Q V T I S A D K S I S T A Y L Q W S S L K A

TCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGATTCCCCAACTGGGGCTCATTGACTACTGGGGCCAG
 S D T A M Y Y C A R F P N W G S F D Y W G Q

CDR3

GGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:43)
 G T L V T V S S (SEQ ID NO:45)

FIG. 1

GAAATTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCTCC
 E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S

 TGCAGGGCCAGTCAGAGTATTAGCAGCAGCTACTTAGCCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCT
C R A S Q S I S S S Y L A W Y Q Q K P G Q A
 CDR1
 CCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGT
 P R L L I Y G A S S R A T G I P D R F S G S
 CDR2
 GGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTCAGTGTATTAC
 G S G T D F T L T I S R L E P E D F A V Y Y

 TGTACAGCAGTATGAGACGTTTCGGCCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAA (SEQ ID NO:47)
C Q Q Y E T F G G Q G T K V E I K (SEQ ID NO:49)
 CDR3

FIG. 2

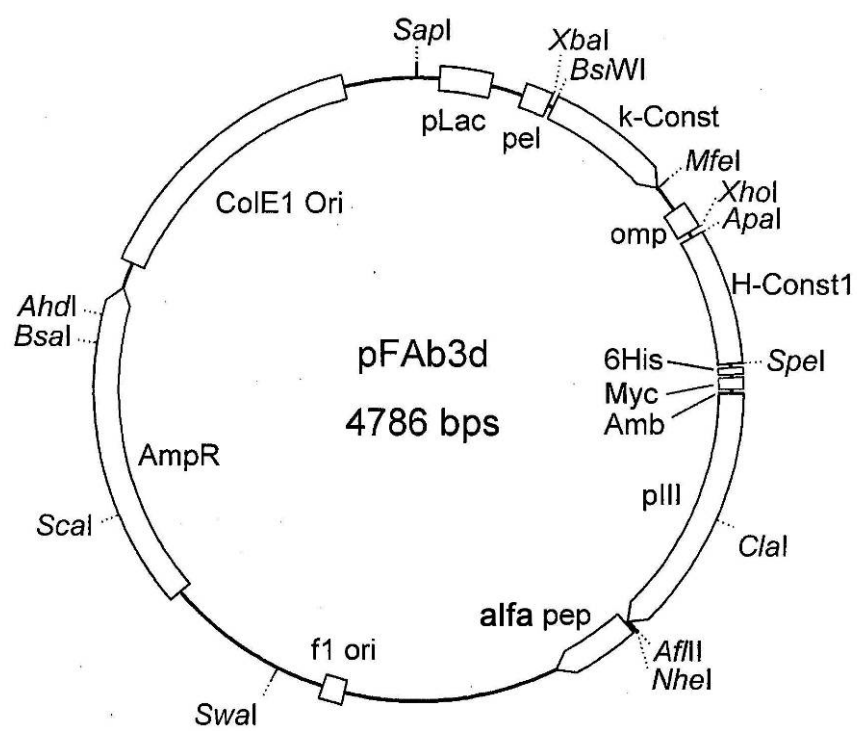


FIG. 3

>pFab3d-10G5H
MKKTAIAIAVALAGFATVAQAALEEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKG
 señal de secreción ompA
SGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGVIYPGDSYTRYSPSFQQVTTISA
 CDR1 CDR2
DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARFPNWGSFDYWGQGTLLTVSSAS
 CDR3
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVTSWNSGALTSGV
 hCH1
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV
 hCH1
EPKSCDKTHTCPPCPTSGHHHHHHGGEQKLISEEDLGG* PFVCEYQG
 His-tag Myc-tag ♦Amb
QSSDLPQPPVNAGGGSGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS
 pIII stump (aa198-406)
 GSGDFDYEKMANANKGAMTENADENALQSDAKGKLDSVATDYGAAIDGF
 IGDVSGLANGNGATGDFAGSNSQMAQVGDGDN SPLMNNFRQYLPSLPQS
 VECRPYVFGAGKPYEFSIDCDKINLFRGVFAFLLYVATFMYVFSTFANI
 LRNKES (SEQ ID NO: 86)

FIG. 4A

>pFab3d-10G5L
MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMASREIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCR
 señal de secreción Pel
ASQSISSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF
 CDR1 CDR2
TLTISRLEPEDFAVYYCQQYETFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
 CDR3
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
 Hck
TYSLSSITLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
 (SEQ ID NO: 87)

FIG. 4B

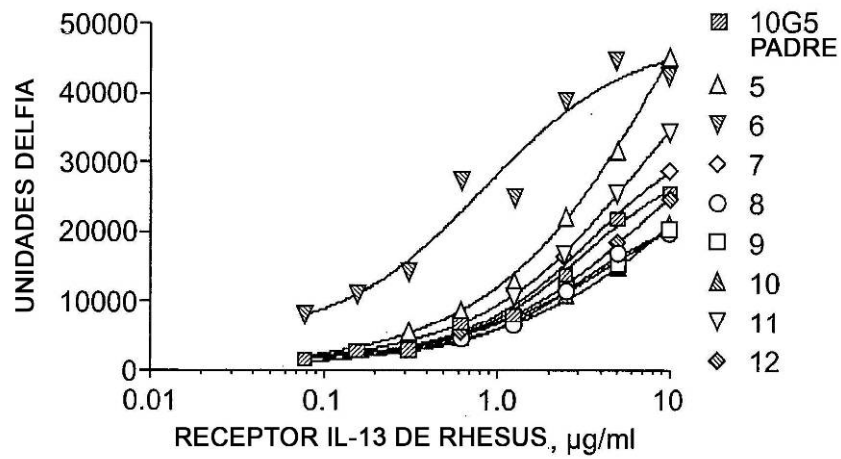


FIG. 5

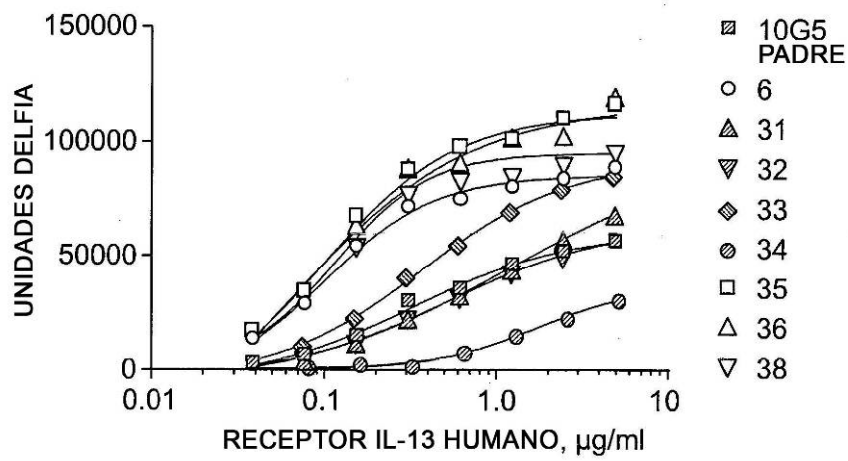


FIG. 6

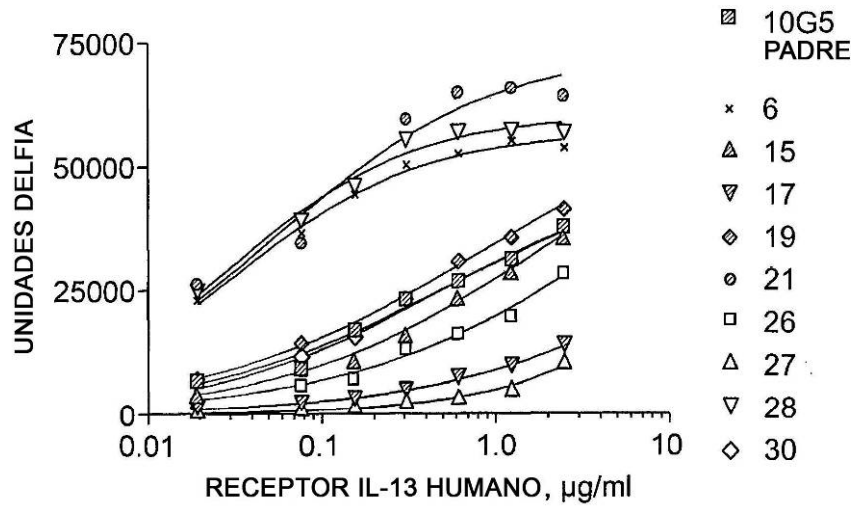


FIG. 7

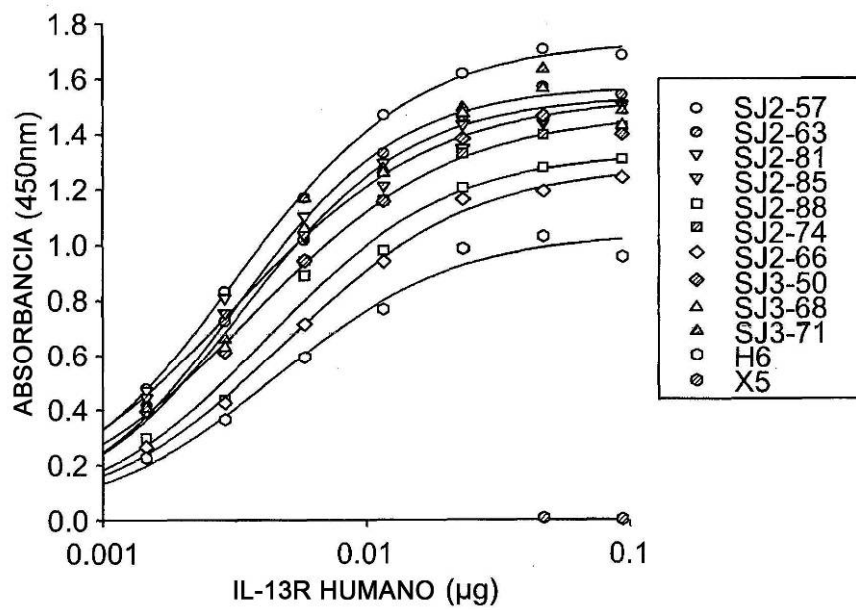


FIG. 8

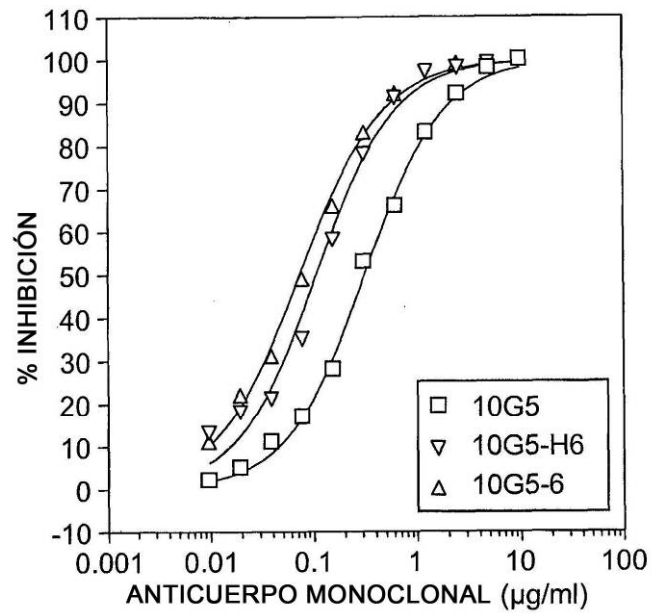


FIG. 9

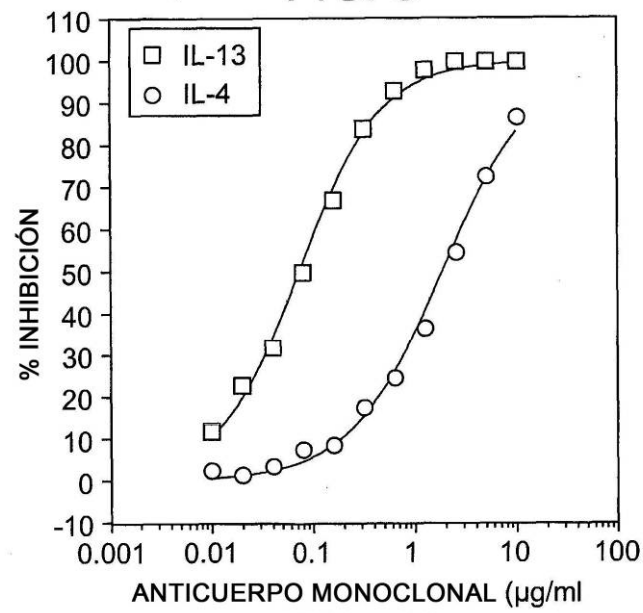


FIG. 10

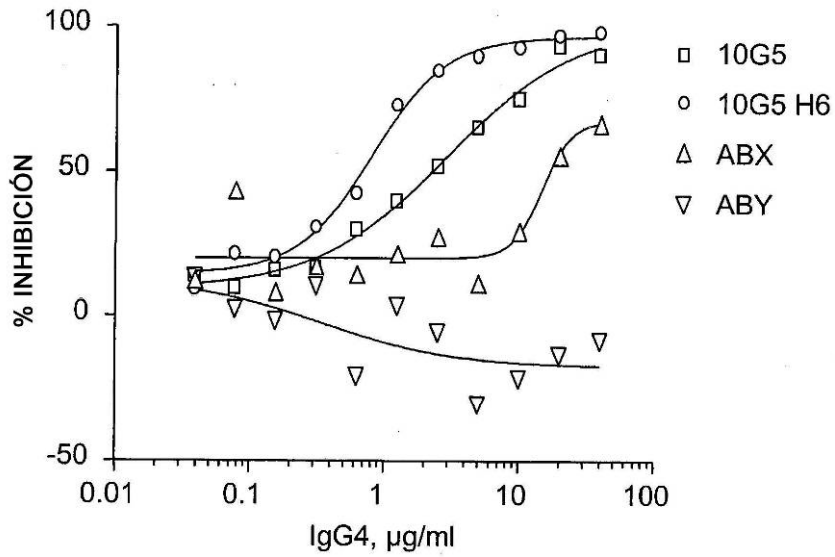


FIG. 11

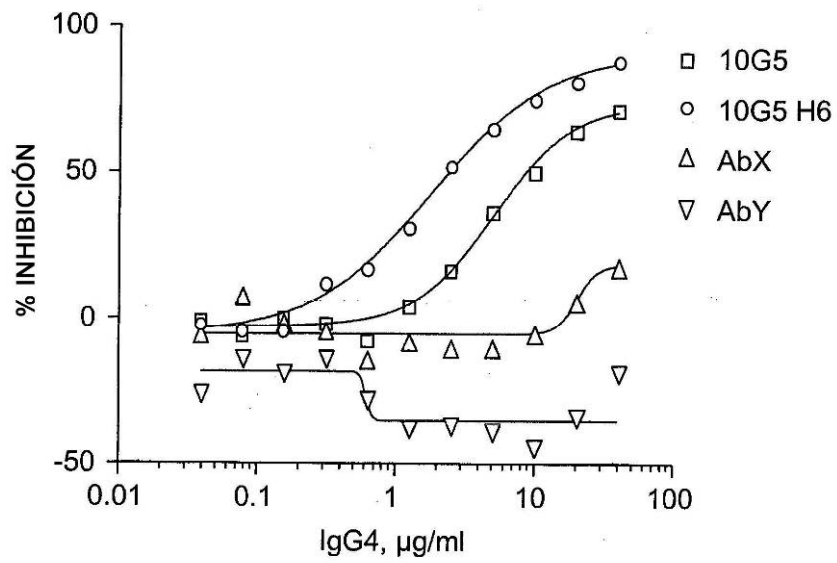


FIG. 12

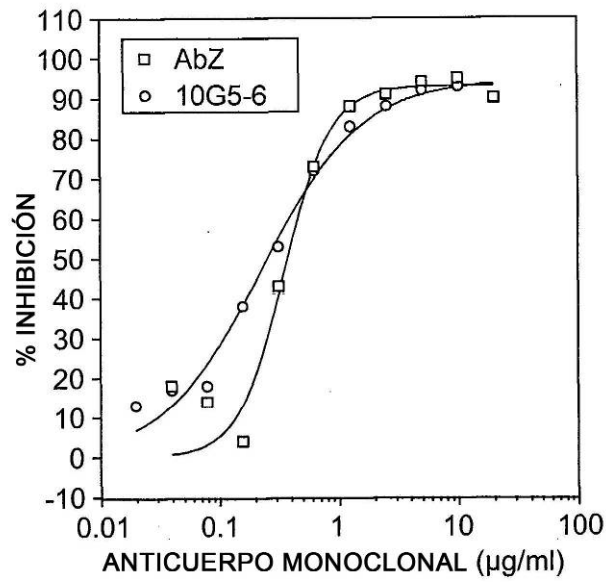


FIG. 13

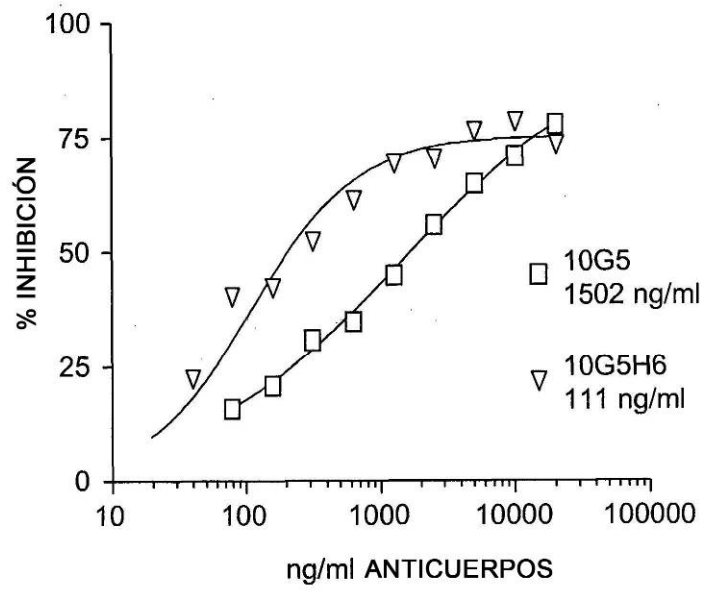


FIG. 14

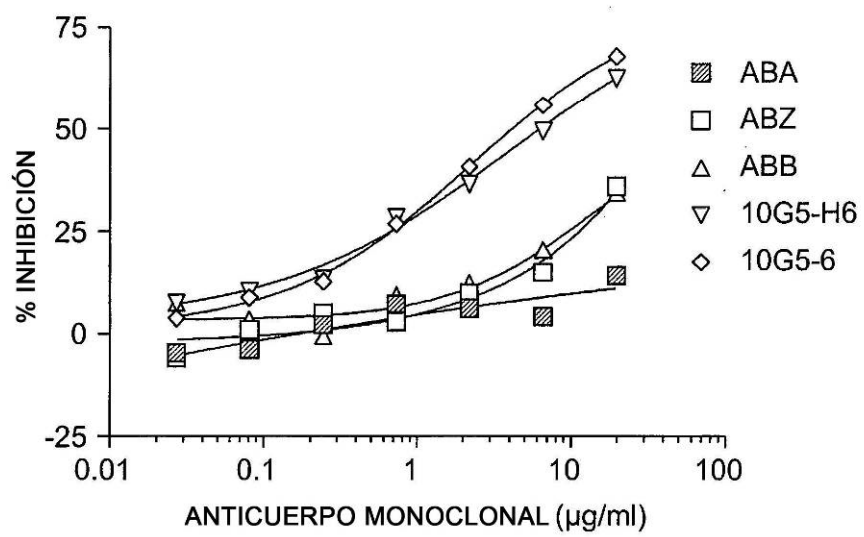


FIG. 15

```

|--- CH1 STARTS HERE
IgG1  LVTVSSASTK GPSVFPLAPS SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG
IgG2  LVTVSSASTK GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG
IgG4  LVTVSSASTK GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG
IgG2M4 LVTVSSASTK GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG
      (VH-C1 LINKER)

C200
IgG1  ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS SLGTQTYICN VNHKPSNTKV
IgG2  ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVTSS NFGTQTYTCN VDHKPSNTKV
IgG4  ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS SLGTQTYTCN VDHKPSNTKV
IgG2M4 ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVTSS NFGTQTYTCN VDHKPSNTKV

-HINGE REGION--|---CH2-> P238 M252 C261
IgG1  DKKAEPKSCD KTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC
IgG2  DKTVERKCC- --VECPPCPA PP-VAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC
IgG4  DKRVESKYGP ---PCPSCPA PEFLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC
IgG2M4 DKTVERKCC- --VECPPCPA PP-VAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC
      (LOWER HINGE) FcRn-BIND

D265 D270 N297* T307
IgG1  VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ
IgG2  VVVDVSHEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ
IgG4  VVVDVSEQEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTYR VVSVLTVLHQ
IgG2M4 VVVDVSEQEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTFR VVSVLTVLHQ
      B/C LOOP C'E LOOP FcRn-BIND

C321 P329 |---CH3->
IgG1  DWLNGKEYKC KVSNGALPAPI EKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN
IgG2  DWLNGKEYKC KVSNGGLPAPI EKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN
IgG4  DWLNGKEYKC KVSNGGLPSSI EKTISKAKG QPREPQVYTL PPSQEEMTKN
IgG2M4 DWLNGKEYKC KVSNGGLPSSI EKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN
      F/G LOOP

IgG1  QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDSG GSFFLYSKLT
IgG2  QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPMLDSG GSFFLYSKLT
IgG4  QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDSG GSFFLYSRLT
IgG2M4 QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPMLDSG GSFFLYSKLT

H433
IgG1  VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK* (SEQ ID NO:97)
IgG2  VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK* (SEQ ID NO:98)
IgG4  VDKSRWQEGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSLGK* (SEQ ID NO:99)
IgG2M4 VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK* (SEQ ID NO:100)
      FcRn-BIND

```

FIG. 16

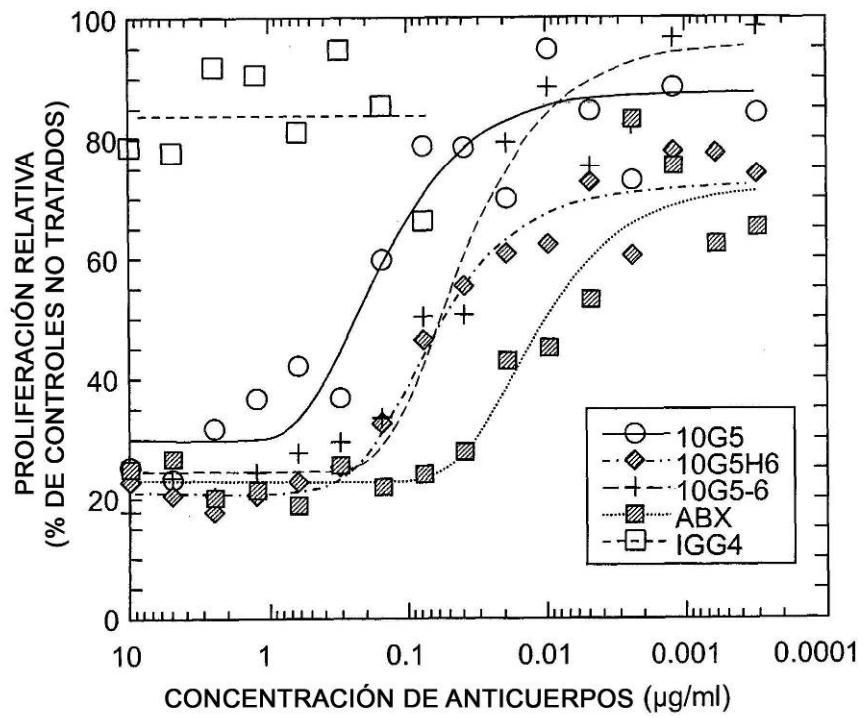


FIG. 17