(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 660 152**

(51) Int. CI.:

C07K 16/46 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2008 E 12006789 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017 EP 2574629**

(54) Título: **Anticuerpos que unen IL-4 y/o IL-13 y sus usos**

(30) Prioridad:

15.10.2007 EP 07291259
17.03.2008 US 37128 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.03.2018

(73) Titular/es:

SANOFI (100.0%)
54, rue La Boétie
75008 Paris, FR

(72) Inventor/es:

RAO, ERCOLE;
MIKOL, VINCENT;
LI, DANXI;
KRUIP, JOCHEN y
DAVISON, MATTHEW

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos que unen IL-4 y/o IL-13 y sus usos.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos anti-IL-13 y a su uso en la mejora, el tratamiento o prevención de enfermedades o trastornos en mamíferos, incluyendo el ser humano, resultantes de una actividad o metabolismo impropio de IL-13. Un anticuerpo de interés puede bloquear el acoplamiento y/o señalización de un ligando, tal como IL-13, con un receptor o complejo de receptor tal como IL-13Rα1 e IL-13Rα2. Se describen composiciones profilácticas, inmunoterapéuticas y de diagnóstico que comprenden los anticuerpos de interés y su uso en métodos para prevenir o tratar enfermedades en mamíferos, incluyendo seres humanos, producidas por un metabolismo y/o actividad inapropiada de células linfoides y no linfoides, incluyendo monocitos, fibroblastos y células endoteliales. Estas enfermedades incluyen deficiencias autoinmunes y enfermedades producidas o caracterizadas por inflamación, tales como asma alérgica y dermatitis.

Antecedentes de la invención

La interleuquina-4 (IL-4) es una citoquina pleiotrópica que tiene un amplio espectro de efectos biológicos sobre las células linfoides B y T, y muchas células no linfoides incluyendo los monocitos, células endoteliales y fibroblastos. Por ejemplo, la IL-4 estimula la proliferación de varias líneas celulares dependientes de IL-2 e IL-3, induce la expresión de moléculas del complejo de histocompatibilidad principal de clase II sobre células B en reposo, y aumenta la secreción de IgG4 e IgE por células B humanas. La IL-4 está asociada con una respuesta inmunológica de tipo Th2, y es producida por las células Th2 y estimula su diferenciación. La IL-4 se ha implicado en varios trastornos, tales como alergia y asma.

La IL-13 es una citoquina identificada recientemente (Minty, A. et al., Nature, 1993, 362, 248-250, y McKenzie, A. N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 1993, 90, 3735-3739) de 112 aminoácidos secretada por los linfocitos T activados, los linfocitos B y los mastocitos después de la activación.

Gracias a sus numerosas propiedades biológicas compartidas por la IL-4, la IL-13 se ha descrito como una citoquina similar a IL-4. De hecho, sus actividades son similares a las de la IL-4 sobre las células B (Defrance, T. et al., J. Exp. Med., 1994, 179, 135-143; Punnonen, J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 1993, 90, 3730-3734; Fior, R. et al., Eur. Cytokine Network, 1994, 5, 593-600), los monocitos (Muzio, M.R.F. et al., Blood, 1994, 83, 1738-1743; De Waal Malefyt, R. et al., J. Immunol, 1993, 151, 6370-6381; Doyle, A. et al., Eur. J. Immunol., 1994, 24, 1441-1445; Montaner, L.J. et al., J. Exp. Med., 1993, 178, 743-747; Sozzani, P. et al., J. Biol. Chem., 1995, 270, 5084-5088) y otras células no hematopoyéticas (Herbert, J.M. et al., Febs Lett., 1993, 328, 268-270; y Derocq, J.M. et al., Febs Lett., 1994, 343, 32-36). Por otra parte, a diferencia de la IL-4, no ejerce un efecto específico sobre las células T en reposo o activadas (Zurawuki, G. et al., Immunol. Today, 1994, 15, 19-26).

Se han descrito con detalle varias actividades biológicas de la IL-13 sobre los monocitos/macrófagos, los linfocitos B y ciertos precursores hematopoyéticos por A. J. Minty así como en artículos de revisión sobre IL-13. Varios datos indican que, además, esta citoquina tiene un efecto pleiotrópico sobre otros tipos celulares. Estas células no hematopoyéticas que son afectadas directamente por IL-13 son células endoteliales y células de microglía, queratinocitos y carcinomas renales y de colon.

Una de las etapas en el análisis de las señales transmitidas por una molécula biológica dentro de una célula consiste en identificar su receptor de membrana. Los estudios de investigación realizados para este fin sobre el receptor de IL-13 han demostrado que la IL-13 y la IL-4 tienen un receptor común, o como mínimo algunos de los componentes de un complejo de receptor común, así como elementos de transducción de señales comunes (Zurawski S.M. et al., Embo Journal, 1993, 12, 2663-2670; Aversa, G. et al., J. Exp. Med., 1993, 178, 2213-2218; Vita, N. et al., Biol. Chem., 1995, 270, 3512-3517; Lefort, S. et al., Febs Lett., 1995, 366, 122-126). Este receptor está presente en la superficie de diversos tipos celulares, en un número variable según el tipo celular considerado. La distribución comparativa de los receptores de IL-13 y IL-4 ha sido indicada por A. J. Minty (Interleukin-13 for Cytokines in Health and Disease. eds. D.G. Remick y J.S. Frie, Marcel Decker, N.Y., 1996).

Los receptores y complejos de receptores de la superficie celular se unen a IL-4 y/o IL-13 con diferentes afinidades. Los principales componentes de receptores y complejos de receptores que se unen a IL-4 y/o IL-13 son IL-4Rα, IL-13Rαl e IL-13Rα2. Estas cadenas se expresan sobre la superficie de células en forma de monómeros o heterodímeros IL- 4Rα/IL-13Rαl (IL-4R de tipo II) o IL-4Rα/c (IL-4R de tipo I). El monómero IL-4Rα y el heterodímero IL-4Rα/γc se unen a la IL-4, pero no a la IL-13. Los monómeros IL-13Rα1 e IL-13Rα2 se unen a la IL-13, pero no se unen a la IL-4. El heterodímero IL-4Rα/IL-13Rα1 se une tanto a la IL-4 como a la IL-13 (Murata et al., Int. J. Hematol., 1999, 69, 13-20).

Las respuestas inmunes de tipo Th2 promueven la producción de anticuerpos y la inmunidad humoral, y se crean para combatir los patógenos extracelulares. Las células Th2 son mediadores de la producción de Ig (inmunidad humoral) y producen IL-4, IL-5, IL-6, IL- 9, IL-10 e IL-13 (Tanaka, et, al., Cytokine Regulation of Humoral Immunity, 251- 272, Snapper, ed., John Wiley and Sons, Nueva York (1996)). Las respuestas inmunológicas de tipo Th2 se

caracterizan por la generación de ciertas citoquinas (por ejemplo, IL-4, IL-13) y tipos específicos de anticuerpos (IgE, IgG4) y son típicas de reacciones alérgicas, que pueden producir ojos acuosos y síntomas asmáticos, tales como la inflamación de las vías respiratorias y la contracción de las células musculares de las vías respiratorias en los pulmones.

Tanto la IL-4 como la IL-13 son citoquinas terapéuticamente importantes debido a sus funciones biológicas y juegan papeles críticos en muchas enfermedades, incluyendo el asma (Curr Opin Allergy Clin Immunol 2005, Vo. 5, 161-166). Se ha demostrado que la IL-4 puede inhibir enfermedades autoinmunológicas y se ha demostrado que tanto la IL-4 como la IL-13 pueden potenciar respuestas inmunológicas antitumorales. Como las dos citoquinas están implicadas en la patogénesis de enfermedades alérgicas, los inhibidores de estas citoquinas podrían proporcionar efectos terapéuticos beneficiosos.

Por consiguiente, existe la necesidad de agentes mejorados que inhiban la IL-13. El documento WO 2007/080174 A2 describe anticuerpos humanizados anti-IL-13.

Sumario de la invención

El alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones anejas. La presente invención da a conocer nuevos anticuerpos humanizados monoclonales y biespecíficos y sus fragmentos, que se unen específicamente a la IL-13, como se define en las reivindicaciones 1 a 6. Algunos de los anticuerpos anti-IL-13 mono o biespecíficos y fragmentos de los mismos se pueden alterar para evitar la formación de enlaces disulfuro entre las cadenas dando como resultado una molécula que es estable durante la fabricación y uso in vivo. Los anticuerpos de la presente invención neutralizan la actividad de IL-13 en los ensayos biológicos descritos en la presente memoria.

La invención incluye las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera variables de los anticuerpos y sus correspondientes secuencias de ácido nucleico.

Otra realización de la presente invención incluye las líneas celulares y vectores que albergan las secuencias de anticuerpos de la presente invención.

Otra realización de la presente invención es el uso de los anticuerpos para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con la función y metabolismo de IL-13. En particular, la presente invención se refiere al tratamiento del cáncer, deficiencias y enfermedades autoinmunes provocadas o caracterizadas por inflamación, tal y como asma alérgica y dermatitis.

En la presente memoria descriptiva se describen otras características y ventajas, y serán evidentes a partir de la siguiente Descripción Detallada y las figuras.

Breve descripción de los dibujos

La FIG 1 es un dibujo esquemático de una molécula de anticuerpo biespecífico contra la IL-4/IL-13 que contiene cuatro cadenas polipeptídicas. Dos cadenas más ligeras consisten en N-VLhB-B13-enlazador-VLh8D4-8-CL-C (CL, región constante de cadena ligera), y dos cadenas más pesadas consisten en N-VHhB-B13-enlazador-VHh8D4-8-CH1-CH2-CH3-C. La secuencia enlazadora (G4S)2 es GGGGSGGGGS (SEC ID Nº: 6).

La FIG 2 ilustra las secuencias de aminoácidos de dominios variables humanizados del anticuerpo anti-IL-13 B-B13 (SEC ID Nº: 1 y 2) y de dominios variables humanizados del anticuerpo anti-IL-4 8D4-8 (SEC ID Nº: 3, 4 y 5). El subrayado indica los cambios de aminoácidos realizados. Las negritas indican la CDR.

Descripción detallada de la invención

El alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones anejas. A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos y cualquier acrónimo usado en la presente memoria tienen los mismos significados entendidos normalmente por un especialista en la técnica en el campo de la invención.

Todas las patentes y publicaciones mencionadas en este documento tienen el propósito de describir las proteínas, enzimas, vectores, células hospedantes y metodologías allí expuestas que podrían utilizarse con y en la presente invención. No obstante, nada en el presente documento debe interpretarse como una admisión de que la invención no está autorizada a anticiparse a dicha descripción en virtud de una invención anterior.

Antes de enseñar la realización y uso de los métodos relacionados con la IL-13 y los productos de interés, se proporcionan las siguientes definiciones no limitantes de algunos términos y frases para orientar al especialista en la técnica.

“Interleuquina-4” (IL-4) se refiere a las proteínas IL-4 de mamífero endógenas o naturales, y a proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos que es igual que la de una correspondiente proteína IL-4 de mamífero endógena o natural {por ejemplo, proteínas recombinantes o proteínas sintéticas (es decir, producidas usando métodos de química orgánica de síntesis)}. Por consiguiente, tal como se define en la presente memoria, el término incluye la proteína IL-4 madura, variantes polimórficas o alélicas y otras isoformas de una IL-4 y formas modificadas o no

modificadas de la anterior (por ejemplo, lipidada, glicosilada). La IL-4 natural o endógena incluye proteínas de tipo salvaje, tales como la IL-4 madura, variantes alélicas o polimórficas y otras isoformas y formas mutantes que se producen de manera natural en mamíferos (por ejemplo, seres humanos o primates no humanos). Estas proteínas pueden recuperarse o aislarse, por ejemplo, a partir de una fuente que produce de manera natural IL-4. Se hace referencia a estas proteínas y a las proteínas que tienen la misma secuencia de aminoácidos que la correspondiente IL-4 natural o endógena por el nombre del correspondiente mamífero. Por ejemplo, cuando el correspondiente mamífero es un ser humano, la proteína se denomina IL-4 humana. En la técnica se conocen varias proteínas IL-4 mutantes, tales como las descritas en el documento WO 03/038041.

"Interleuquina-13" (IL-13) se refiere a las proteínas IL-13 endógenas de mamífero o naturales y a proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos que es igual que la de una proteína IL13 endógena de mamífero correspondiente o natural (por ejemplo, proteínas recombinantes o proteínas sintéticas (es decir, producidas usando los métodos de química orgánica de síntesis)). Por consiguiente, tal como se define en este documento, el término incluye la proteína IL-13 madura, variantes polimórficas o alélicas, y otras isoformas de IL-13 (por ejemplo, producidas por corte y empalme alternativo u otros procesos celulares), y formas modificadas o no modificadas de las anteriores (por ejemplo, lipidadas o glicosiladas). La IL-13 natural o endógena incluye proteínas de tipo salvaje, tales como la IL-13 madura, variantes alélicas o polimórficas y otras isoformas y formas mutantes que se producen de manera natural en mamíferos (por ejemplo, seres humanos o primates no humanos). Por ejemplo, como se usa en la presente memoria, la IL-13 incluye la variante de IL-13 humana en la que la Arg en la posición 110 de la IL-13 humana madura se ha reemplazado por Gln (la posición 110 de la IL-13 madura corresponde a la posición 130 de la proteína precursora) que está asociada con el asma (asma atópica y no atópica) y otras variantes de IL-13. (Heinzmann et al., Hum. Mol. Genet., 9:549-559 (2000)). Estas proteínas pueden recuperarse o aislarse, por ejemplo, a partir de una fuente que produce de manera natural IL-13. Se hace referencia a estas proteínas y a las proteínas que tienen la misma secuencia de aminoácidos que la correspondiente IL-13 natural o endógena por el nombre del correspondiente mamífero. Por ejemplo, cuando el correspondiente mamífero es un ser humano, la proteína se denomina IL-13 humana. En la técnica se conocen varias proteínas IL-13 mutantes, tales como las descritas en el documento WO 03/035847.

La expresión "sustancialmente idéntico" con respecto a una secuencia polipeptídica de una cadena de anticuerpo puede interpretarse como una cadena de anticuerpo que presenta una coincidencia de secuencia de al menos 70%, 80%, 90%, 95% o mayor con la secuencia polipeptídica de referencia. La expresión con respecto a una secuencia de ácido nucleico puede interpretarse como una secuencia de nucleótidos que presenta una coincidencia de al menos aproximadamente 85%, 90%, 95% o 97% o mayor con la secuencia de ácido nucleico de referencia.

Las expresiones "coincidencia" u "homología" pueden significar el porcentaje de bases nucleotídicas o restos aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos al resto de una secuencia correspondiente con la que se compara, después de alinear las secuencias y de introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de coincidencia para la secuencia entera, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la coincidencia de secuencia. No debe interpretarse que ninguna inserción ni extensión N-terminal o C-terminal reduzca la coincidencia o la homología. Se dispone de métodos y programas informáticos para el alineamiento y son bien conocidos en la técnica. La coincidencia de secuencias puede medirse usando un programa informático de análisis de secuencias.

Las expresiones y términos "fragmento funcional, variante, derivado o análogo" y similares, así como formas de las mismas, de un anticuerpo o antígeno se refieren a un compuesto o molécula que tiene una actividad biológica cualitativa en común con un anticuerpo o antígeno de longitud completa de interés. Por ejemplo, un fragmento funcional o análogo de un anticuerpo anti-IL-4 es aquel que puede unirse a una molécula de IL-4 o aquel que puede impedir o reducir sustancialmente la capacidad de un ligando, o un anticuerpo agonista o antagonista, para unirse a la IL-4.

Son variantes de "sustitución" aquellos en los que al menos un resto aminoácido de una secuencia nativa se ha retirado y se ha reemplazado por un aminoácido diferente insertado en su sitio en la misma posición. Las sustituciones pueden ser individuales, cuando sólo se sustituye un aminoácido de la molécula, o pueden ser múltiples, cuando se sustituyen dos o más aminoácidos en la misma molécula. Las sustituciones plurales pueden estar en sitios consecutivos. Además, un aminoácido puede reemplazarse por múltiples restos, en cuyo caso dicho variante comprende tanto una sustitución como una inserción. Son variantes de "inserción" aquellos en los que se han insertado uno o más aminoácidos inmediatamente adyacentes a un aminoácido en una posición particular de una secuencia nativa. Inmediatamente adyacente a un aminoácido significa conectado a un grupo funcional α-carboxilo o α-amino del aminoácido. Son variantes de "deleción" aquellos en los que se han eliminado uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos nativa. Normalmente, los variantes de deleción tendrán uno o dos aminoácidos delecionados en una región particular de la molécula.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y específicamente incluye anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), fragmentos de anticuerpo o polipéptidos sintéticos que portan una o más CDR o secuencias derivadas de CDR siempre que los polipéptidos presenten la actividad biológica deseada. Los anticuerpos (Ab) y las inmunoglobulinas (Ig) son glicoproteínas que tienen las mismas características estructurales.

En general, los anticuerpos se consideran Ig con una especificidad definida o reconocida. De esta manera, aunque los anticuerpos presentan especificidad de unión a una diana específica, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas parecidas a anticuerpos que carecen de especificidad por una diana. Los anticuerpos de la invención pueden ser de cualquier clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, etc.), o subclase (por ejemplo IgG1, IgG2, IgG2a, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, etc.) ("tipo" y "clase", y "subtipo" y "subclase", se usan indistintamente en la presente memoria). Los anticuerpos y las inmunoglobulinas nativas o de tipo silvestre, es decir, obtenidas a partir de un miembro de una población no manipulado artificialmente, de modo habitual son proteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en el otro extremo. "No manipulado artificialmente" significa no tratado para que contenga o exprese una molécula de unión a antígenos extraña. Tipo salvaje se refiere a la especie o alelo más prevalente encontrado en una población o al anticuerpo obtenido a partir de un animal no manipulado, en comparación con un alelo o polimorfismo, o un variante o derivado obtenido mediante un tipo de manipulación, tal como mutagénesis, el uso de métodos recombinantes, etc., para cambiar un aminoácido de la molécula de unión al antígeno.

Tal como se usa en este documento, "anticuerpo anti-IL-4" significa un anticuerpo o polipéptido derivado del mismo (un derivado) que se une específicamente a la IL-4 tal como se define en la presente memoria, incluyendo, pero sin limitación, moléculas que inhiben o reducen sustancialmente la unión de IL-4 a su receptor o inhiben la actividad de la IL-4.

Tal como se usa en este documento, "anticuerpo anti-IL-13" significa un anticuerpo o polipéptido derivado del mismo (un derivado) que se une específicamente a la IL-13 tal como se define en la presente memoria, incluyendo, pero sin limitación, moléculas que inhiben o reducen sustancialmente la unión de IL-13 a su receptor o inhiben la actividad de la IL-13.

El término "variable" en el contexto de un dominio variable de anticuerpos se refiere a ciertas partes de la molécula pertinente que difieren extensivamente en secuencia entre los anticuerpos y se usan en el reconocimiento y la unión específica de un anticuerpo particular a su diana particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye de manera uniforme a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. La variabilidad se concentra en tres segmentos denominados regiones determinantes de complementariedad (CDR; es decir, CDR1, CDR2 y CDR3) también conocidas como regiones hipervariables, tanto en los dominios variables de cadena ligera como en los dominios variables de cadena pesada. Las partes más conservadas de los dominios variables se denominan secuencias o regiones marco (FR). Los dominios variables de cada cadena pesada y ligera nativa comprenden cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β, conectada por tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte, de la estructura de lámina β. Las CDR de cada cadena son mantenidas juntas, a menudo en proximidad, por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a la diana (epitopo o determinante) de anticuerpos (véase Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institute of Health, Bethesda, MD (1987)). Tal como se usa en la presente memoria, la numeración de los restos aminoácidos de una inmunoglobulina se realiza según el sistema de numeración de restos aminoácidos de inmunoglobulinas de Kabat et al., a menos que se indique lo contrario. Una CDR puede tener la capacidad de unirse específicamente al epitopo cognado.

El término "bisagra" o "región bisagra", tal como se emplea en este documento, se refiere al polipéptido flexible que comprende los aminoácidos entre el primero y el segundo dominio constante de un anticuerpo.

La expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a una parte de una cadena intacta o de longitud completa o a un anticuerpo, en general a la región de unión a la diana o la región variable. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, fragmentos Fab, Fab', F(ab')2 y Fv. Un "fragmento funcional" o "análogo de un anticuerpo anti-IL-4 y/o IL-13" es aquel que puede prevenir o reducir sustancialmente la capacidad del receptor de unirse a un ligando o de iniciar la señalización. Tal como se usa en la presente memoria, un fragmento funcional en general es sinónimo de "fragmento de anticuerpo" y, con respecto a los anticuerpos, puede hacer referencia a fragmentos tales como Fv, Fab, F(ab')2, etc., en los que puede impedir o reducir sustancialmente la capacidad del receptor de unirse a un ligando o de iniciar la señalización. Un fragmento "Fv" consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y otro de cadena ligera en una asociación no covalente (dímero VH-VL). En esa configuración, las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a la diana en la superficie del dímero VH-VL, como en un anticuerpo intacto. Colectivamente, las seis CDR confieren especificidad de unión a la diana al anticuerpo intacto. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres CDR específicas para una diana) puede tener la capacidad de reconocer y de unirse a la diana.

Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenario" "sFv" o "scAb" comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. En general, el polipéptido de Fv además comprende un conector polipeptídico, a menudo una molécula flexible, entre los dominios VH y VL, que permite al sFv formar la estructura deseada para la unión a la diana.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión al antígeno, pudiendo comprender dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de

cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica. Por medio del uso de un conector que sea demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios variables de la misma cadena, los dominios del diacuerpo se ven forzados a aparearse con los dominios de unión de otra cadena para crear dos sitios de unión al antígeno.

El fragmento Fab contiene los dominios variables y constantes de la cadena ligera y el dominio variable y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos restos en el extremo carboxilo del dominio CH1 para incluir una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Los fragmentos Fab' pueden producirse por ruptura del enlace disulfuro en las cisteínas bisagra del producto de digestión con pepsina de F(ab')2. Otros tratamientos enzimáticos y químicos de anticuerpos pueden producir otros fragmentos funcionales de interés.

La expresión “Fab lineal” se refiere a un anticuerpo tetravalente según describe Miller et al. (2003), J. Immunol., 170: 4854-4861. El "Fab lineal" está compuesto por un tándem del mismo dominio CH1-VH, apareado con la cadena ligera idéntica en cada posición CH1-VH. Estas moléculas se han desarrollado con el fin de aumentar la valencia de un anticuerpo para potenciar su afinidad funcional a través del efecto de avidez, pero son monoespecíficas.

La expresión “anticuerpos biespecíficos (BsAb)” se refiere a moléculas que combinan los sitios de unión al antígeno de dos anticuerpos dentro de una sola molécula. De esta manera, un anticuerpo biespecífico puede unirse a dos antígenos diferentes simultáneamente. Además de las aplicaciones con fines de diagnóstico, los BsAb preparan el terreno para nuevas aplicaciones terapéuticas redirigiendo potentes sistemas efectores a áreas de enfermedad o aumentando las actividades neutralizadoras o estimuladoras de anticuerpos.

Los intentos iniciales de acoplar las especificidades de unión de dos anticuerpos completos contra diferentes antígenos diana con fines terapéuticos utilizaron moléculas de heteroconjugados fusionadas químicamente (Staerz et al. (1985), Nature, 314: 628-631).

Se han producido anticuerpos biespecíficos a partir de hibridomas híbridos mediante técnicas de heterohibridoma, y se han demostrado propiedades *in vitro* similares a aquellas observadas en los heteroconjugados (Milstein & Cuello (1983) Nature 305:537-540).

A pesar de los resultados alentadores obtenidos con el uso de heteroconjugados o anticuerpos biespecíficos producidos a partir de fusiones celulares, tal como se mencionó anteriormente, varios factores hicieron que no fueran prácticos en aplicaciones terapéuticas a gran escala. Dichos factores incluyen: el rápido aclaramiento de grandes heteroconjugados *in vivo*, las trabajosas técnicas intensivas necesarias para generar cualquier tipo de molécula, la necesidad de una extensa purificación de los heteroconjugados fuera de los homoconjugados o anticuerpos monoespecíficos y, en general, bajo rendimiento.

Se utiliza cada vez más la ingeniería genética para diseñar, modificar y producir anticuerpos o derivados de anticuerpos con un conjunto deseado de propiedades de unión y de funciones efectoras.

Se ha desarrollado una diversidad de métodos recombinantes para la producción eficaz de BsAb, tanto como fragmentos de anticuerpos (Carter et al. (1995), J. Hematotherapy, 4: 463-470; Pluckthun et al. (1997) Immunotechology 3: 83-105; Todorovska et al. (2001) J. Immunol. Methods 248: 47-66), como de formatos IgG de longitud completa (Carter (2001), J. Immunol. Methods, 248: 7-15).

La combinación de dos scFv diferentes tiene como resultado formatos de BsAb con una masa molecular mínima, denominados sc-BsAb o Ta-scFv (Mack et al. (1995), Proc. Acad. Sci. USA. 92: 7021-7025; Mallender et al. (1994) J. Biol. Chem. 269: 199-206). Los BsAb se han construido por medio de la fusión genética de dos scFv a través de una funcionalidad de dimerización tal como una cremallera de leucina (Kostelny et al. (1992) J. Immunol. 148: 1547-53; de Kruif et al. (1996) J. Biol. Chem. 271: 7630-4).

Como se ha mencionado anteriormente, los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo pequeños bivalentes y biespecíficos. Los fragmentos comprenden un VH conectado a un VL en la misma cadena de polipéptidos, usando un enlazador que es demasiado corto (menos de 12 aminoácidos) para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Los dominios son forzados a aparearse intermolecularmente con los dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios de unión a antígenos. Estos fragmentos de anticuerpo diméricos, o "diacuerpos" son bivalentes y biespecíficos. (Holliger et al. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 6444-6448). Los diacuerpos son similares en tamaño a un fragmento Fab. Las cadenas de polipéptidos de los dominios VH y VL unidas con un enlazador entre 3 y 12 aminoácidos forman predominantemente dímeros (diacuerpos), mientras que con un enlazador entre 0 y 2 residuos aminoácidos, forman trímeros (triacuerpos) y tetrámeros (tetracuerpos). Además de la longitud del enlazador, la característica exacta de la oligomerización parece depender de la composición, como también de la orientación de los dominios V (Hudson et al. (1999), J Immunol Methods 231: 177-189). La previsibilidad de la estructura final de las moléculas de diacuerpo es muy pobre.

Si bien los constructos basados en diacuerpos y sc-BsAbs exhiben un interesante potencial clínico, se ha demostrado que dichas moléculas no covalentemente asociadas no son lo suficientemente estables bajo condiciones fisiológicas. La estabilidad general de un fragmento scFv depende de la estabilidad intrínseca de los dominios VL y VH, como también de la estabilidad de la interface del dominio. Una estabilidad insuficiente de la

interface VH-VL de los fragmentos scFv por lo general sugiere un curso principal de inactivación de scFv irreversible, ya que la abertura transitoria de la interface, que sería permitida por el enlazador peptídico, expone parches hidrófobos que favorecen la agregación y, en consecuencia, inestabilidad y un mal rendimiento de la producción (Wörn y Plückthun (2001), J. Mol. Biol. 305: 989-1010).

Un método alternativo para fabricar proteínas de unión a antígenos bivalentes biespecíficas a partir de los dominios VH y VL se describe en el documento US 5.989.830. Estos fragmentos de anticuerpo de doble cabeza se obtienen expresando un vector dicistrónico que codifica dos cadenas polipeptídicas, teniendo una cadena polipeptídica dos veces una VH en serie por un enlazador peptídico (VH1-enlazador-VH2) y consistiendo la otra cadena polipeptídica en dominios VL complementarios conectados en serie por un enlazador peptídico (VL1-enlazador-VL2). En el documento US 5.989.830 se describió que cada enlazador debería comprender al menos 10 restos aminoacídicos.

En el documento US 2005/0003403 A1 se describen complejos de proteína polivalentes (PPC) con una mayor valencia. Los PPC comprenden dos cadenas polipeptídicas dispuestas en general de manera lateral entre sí. Cada cadena de polipéptidos típicamente comprende 3 ó 4 "regiones v", que comprenden secuencias de aminoácidos capaces de formar un sitio de unión a antígenos cuando se emparejan con una región v correspondiente en la cadena de polipéptidos opuesta. Se pueden usar hasta aproximadamente 6 "regiones v" en cada cadena de polipéptidos. Las regiones v de cada cadena de polipéptidos están conectadas linealmente unas a otras y pueden conectarse mediante regiones enlazadoras intercaladas. Cuando están dispuestas en la forma del PPC, las regiones v en cada cadena de polipéptidos forman sitios de unión a antígenos individuales. El complejo puede contener una o varias especificidades de unión.

No obstante, el uso de dichas moléculas mostró agregación, inestabilidad y rendimiento de expresión deficiente (Wu et al. (2001) Prot. Eng. 14: 1025-1033). Éstos son problemas de estabilidad típicos que pueden ocurrir en la expresión de anticuerpos basados en una sola cadena. (Wörn y Plückthun (2001), J. Mol. Biol. 305: 989-1010).

Por lo tanto, es un objeto de la presente descripción proveer un anticuerpo polivalente biespecífico mediante el cual se pueda evitar la formación de agregados. Además, deberá tener una estabilidad que lo haga utilizable para usos terapéuticos.

La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en este documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que constituyen la población son idénticos con la excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades minoritarias.

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos” en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular (tipo o subtipo), siendo el resto de la cadena o cadenas idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de estos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada de unión a IL-4 y/o IL-13, o de afectar a la actividad o metabolismo de IL-4 y/o IL-13 (patente de EEUU nº 4.816.567; y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)). De esta manera, las CDR de una clase de anticuerpos pueden injertarse en la FR de un anticuerpo de una clase o subclase diferente.

Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, dirigiéndose contra un solo sitio diana, epitopo o determinante. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales que generalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epitopos) de un antígeno, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante en la diana. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son sintetizados de modo ventajoso por una célula hospedante, no contaminada por otras inmunoglobulinas, lo cual permite la clonación del gen pertinente y el ARNm que codifica el anticuerpo o sus cadenas. El adjetivo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden aislarse a partir de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando técnicas bien conocidas o pueden purificarse a partir de una preparación policlonal. Los anticuerpos monoclonales parentales pueden obtenerse por el método de hibridoma descrito por Kohler et al., Nature 256:495 (1975), o pueden obtenerse por métodos recombinantes bien conocidos en la técnica.

La expresión "anticuerpo polivalente", tal como se usa en este documento, se refiere a un anticuerpo que comprende dos o más sitios de unión al antígeno, pudiendo de esta manera unirse a dos o más antígenos que pueden tener la misma estructura o estructuras diferentes, simultáneamente. El término “bivalente” significa que el anticuerpo comprende dos sitios de unión al antígeno. El término “tetravalente” significa que el anticuerpo comprende cuatro sitios de unión al antígeno.

La expresión “sitio de unión al antígeno”, tal como se emplea en este documento, se refiere a la parte del anticuerpo que comprende el área que se une específicamente y es complementaria a todo o parte de un antígeno. Si un antígeno es grande, un anticuerpo puede unirse solamente a una parte particular del antígeno, cuya parte se

denomina epitopo. Un dominio de unión al antígeno puede estar provisto de uno o más dominios variables de anticuerpos. Preferiblemente, un dominio de unión al antígeno está formado por la asociación de un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo (VL) y un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo (VH).

El término "antígeno", tal como se utiliza en este documento, se refiere a una molécula o una porción de una molécula capaz de ser unida por los anticuerpos de la presente invención. Un antígeno puede tener uno o más epitopos. Los ejemplos de antígenos reconocidos por los anticuerpos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, proteínas séricas, por ejemplo, citoquinas tales como IL-4, IL5, IL9 e IL-13, péptidos bioactivos, moléculas de la superficie celular, por ejemplo, receptores, transportadores, canales iónicos, proteínas virales y bacterianas.

El término “monoespecífico”, tal como se emplea en este documento, significa que el anticuerpo polivalente descrito en este documento reconoce solamente un antígeno, siendo todos los sitios de unión al antígeno idénticos.

El término “biespecífico”, tal como se emplea en este documento, significa que el anticuerpo polivalente descrito en este documento reconoce dos epitopos diferentes en el mismo antígeno o en dos antígenos diferentes.

El término “multiespecífico”, tal como se emplea en este documento, significa que el anticuerpo polivalente descrito en este documento reconoce múltiples epitopos diferentes en el mismo antígeno o en múltiples antígenos diferentes.

El término “conector”, tal como se usa en este documento, se refiere a un péptido adaptado para conectar los dominios variables de las construcciones de anticuerpo descritos en este documento. El conector peptídico puede contener cualquier aminoácido, prefiriéndose los aminoácidos glicina (G) y serina (S). Los conectores pueden ser iguales o diferir unos de otros entre y dentro del polipéptido de cadena pesada y el polipéptido de cadena ligera. Además, el conector puede tener una longitud de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 aminoácidos. Una unidad conectora peptídica preferida para los dominios de cadena pesada así como para los dominios de cadena ligera es GGGGS. El número de unidades conectoras de la cadena pesada y de la cadena ligera puede ser igual (orden simétrico) o diferir entre sí (orden asimétrico).

Un conector peptídico es preferiblemente lo suficientemente largo para proporcionar un grado adecuado de flexibilidad a fin de prevenir que los restos de anticuerpo interfieran con la actividad de otros restos de anticuerpo, por ejemplo, por impedimento estérico, para permitir el correcto plegamiento de la proteína y, si es necesario, permitir que las moléculas de anticuerpo interactúen con dos o más receptores en la misma célula, posiblemente muy distanciados; preferiblemente será lo suficiente corto como para permitir que los restos de anticuerpo permanezcan estables en la célula.

En consecuencia, la longitud, composición y/o conformación de los enlaces peptídicos pueden ser seleccionados con facilidad por los expertos en la técnica con el fin de optimizar las propiedades deseadas del anticuerpo polivalente.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')2 u otras subsecuencias de unión a la diana de anticuerpos) que contienen secuencias derivadas de inmunoglobulina no humana, en comparación con un anticuerpo humano. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente uno, y generalmente dos dominios variables, en los que todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia molde de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), generalmente la del molde de inmunoglobulina humana elegido. En general, el objetivo es disponer de una molécula de anticuerpo que sea mínimamente inmunogénica en un ser humano. De esta manera, es posible cambiar uno o más aminoácidos de una o más CDR por otro u otros que sean menos inmunogénicos para un hospedante humano, sin minimizar sustancialmente la función de unión específica de dichas una o más CDR a IL-4 y/o IL-13. Como alternativa, la FR puede ser no humana, pero los aminoácidos más inmunogénicos se reemplazan por otros menos inmunogénicos. Sin embargo, el injerto de CDR, tal como se ha descrito anteriormente, no es la única manera de obtener un anticuerpo humanizado. Por ejemplo, es posible que no sea suficiente la modificación únicamente de las regiones CDR ya que es bastante común que los restos del marco tengan un papel en la determinación de la estructura tridimensional de los bucles de CDR y la afinidad global del anticuerpo por su ligando. Por lo tanto, puede ponerse en práctica cualquier medio de manera que la molécula de anticuerpo parental no humano se modifique para que sea menos inmunogénica para un ser humano, y no siempre es necesaria la coincidencia global de la secuencia con un anticuerpo humano. De esta manera, la humanización también puede conseguirse, por ejemplo, mediante la mera sustitución de unos pocos restos, en particular los que están expuestos en la molécula de anticuerpo y no ocultos dentro de la molécula y por lo tanto, no fácilmente accesibles para el sistema inmunológico del hospedante. Dicho método se indica en la presente memoria con respecto a la sustitución de restos "móviles" o "flexibles" en la molécula de anticuerpo, siendo el objetivo reducir o mitigar la inmunogenicidad de la molécula resultante sin comprometer la especificidad del anticuerpo por su epitopo o determinante. Véase, por ejemplo, Studnicka et al., Prot Eng 7(6)805-814, 1994; Mol Imm 44:1986-1988, 2007; Sims et al., J Immunol 151:2296 (1993); Chothia et al., J Mol Biol 196:901 (1987); Carter et al., Proc Natl Acad Sci USA 89:4285 (1992); Presta et al., J Immunol 151:2623 (1993), el documento WO 2006/042333 y la patente de EE.UU. No. 5.869.619.

Un método de humanización de interés se basa en el impacto de la flexibilidad molecular del anticuerpo durante y en el reconocimiento inmune. La flexibilidad de una proteína está relacionada con el movimiento molecular de la molécula de proteína. La flexibilidad de una proteína es la capacidad de una proteína entera, una parte de una proteína o un solo resto aminoacídico de adoptar un conjunto de conformaciones que difieren significativamente entre sí. La información sobre la flexibilidad de la proteína puede obtenerse realizando experimentos de cristalografía de rayos X (véase, por ejemplo, Kundu et al. 2002, Biophys J 83:723-732.), experimentos de resonancia magnética nuclear (véase, por ejemplo, Freedberg et al., J Am Chem Soc 1998, 120(31):7916-7923) o realizando simulaciones de dinámica molecular (MD). Una simulación MD de una proteína se realiza en un ordenador y permite determinar el movimiento de todos los átomos de la proteína durante un periodo de tiempo calculando las interacciones físicas de los átomos entre sí. El resultado de una simulación MD es la trayectoria de la proteína estudiada durante el periodo de tiempo de la simulación. La trayectoria es un conjunto de conformaciones de proteínas, denominadas también fotos, que se muestrean periódicamente durante el periodo de la simulación, por ejemplo, cada 1 picosegundo (ps). Por medio del análisis del conjunto de fotos se puede cuantificar la flexibilidad de los restos aminoacídicos de la proteína. De esta manera, un resto flexible es uno que adopta un conjunto de diferentes conformaciones en el contexto del polipéptido dentro del cual reside dicho resto. Los métodos de MD son conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Brooks et al. “Proteins: A Theoretical Perspective of Dynamics, Structure and Thermodynamics” (Wiley, Nueva York, 1988). Varios programas informáticos permiten simulaciones de MD, tales como Amber (véase Case et al. (2005) J Comp Chem 26:1668-1688), Charmm (véase Brooks et al. (1983) J Comp Chem 4:187-217; y MacKerell et al. (1998) en “The Encyclopedia of Computational Chemistry” vol. 1:271-177, Schleyer et al., eds. Chichester: John Wiley & Sons) o Impact (véase Rizzo et al. J Am Chem Soc; 2000; 122(51):12898-12900.)

La mayoría de complejos de proteína comparten una superficie oculta relativamente grande y plana y se ha demostrado que la flexibilidad de los compañeros de unión proporciona el origen de su plasticidad, lo cual permite que se adapten conformacionalmente entre sí (Structure (2000) 8, R137-R142). Como tales, se ha demostrado que ciertos ejemplos de “ajuste inducido” juegan un papel dominante en las superficies de contacto proteína-proteína. Además, hay cada vez más datos que demuestran que las proteínas realmente se unen a ligandos de diversas formas, tamaños y composición (Protein Science (2002) 11:184--187) y que la diversidad conformacional parece ser un componente esencial de la capacidad de reconocer diferentes patrones (Science (2003) 299, 1362-1367). Los restos flexibles están implicados en la unión de patrones de proteína-proteína (Structure (2006) 14, 683-693).

Los restos flexibles pueden adoptar una diversidad de conformaciones que proporcionan un conjunto de áreas de interacción que probablemente se reconocerán por las células B de memoria y desencadenarán una respuesta inmunogénica. De esta manera, un anticuerpo puede humanizarse modificando varios restos de la región flanqueante de manera que el conjunto de conformaciones y de áreas de reconocimiento presentadas por el anticuerpo modificado se parezcan lo máximo posible a las adoptadas por un anticuerpo humano.

Esto puede conseguirse modificando un número limitado de restos: (1) construyendo un modelo de homología del mAb parental y realizando una simulación MD; (2) analizar los residuos flexibles e identificar los residuos más flexibles de una molécula de anticuerpo no humana, así como identificar los residuos o motivos que probablemente serán fuente de heterogeneidad o de una reacción de degradación; (3) identificar un anticuerpo humano que presente el conjunto de áreas de reconocimiento más similar a la del anticuerpo parental; (4) determinar los residuos flexibles a mutar, donde también se mutan residuos o motivos con probabilidad de ser una fuente de heterogeneidad y degradación; y (5) comprobar la presencia de epítopos de células T o células B conocidos. Los restos flexibles pueden encontrarse usando un cálculo MD como se enseña en este documento usando un modelo de disolvente implícito, que explica la interacción del disolvente acuoso con los átomos de la proteína durante el periodo de tiempo de la simulación. Una vez que se ha identificado la serie de restos flexibles dentro de las cadenas variables ligera y pesada, se identifica una serie de regiones flanqueantes de región variable de cadena pesada y ligera humana que se parecen mucho a las del anticuerpo de interés. Esto puede hacerse, por ejemplo, usando una búsqueda blast en la serie de restos flexibles frente a una base de datos de secuencias de anticuerpo de la línea germinal humana. Esto también puede hacerse comparando la dinámica del mAb parental con la dinámica de una biblioteca de estructuras canónicas germinales. Los restos CDR y los restos vecinos se excluyen de la búsqueda para asegurar que se conserva una alta afinidad por el antígeno.

Después se reemplazan los restos flexibles. Cuando varios restos humanos muestran homologías similares, la selección se dirige también por la naturaleza de los restos que probablemente afectarán al comportamiento en solución del anticuerpo humanizado. Por ejemplo, en los bucles flexibles expuestos se preferirán restos polares a los restos hidrófobos. Los restos que son una fuente potencial de inestabilidad y heterogeneidad también se mutan aunque se encuentren en las CDR. Esto incluirá las metioninas expuestas, ya que se puede formar sulfóxido a partir de radicales de oxígeno, la escisión proteolítica de enlaces lábiles a ácidos tales como los del dipéptido Asp-Pro (Drug Dev Res (2004) 61:137-154), sitios de desamidación encontrados con un resto de asparagina expuesto seguido de un aminoácido pequeño tal como Gly, Ser, Ala, His, Asn o Cys (J Chromatog (2006) 837:35-43) y sitios de N-glicosilación tales como el sitio Asn-X-Ser/Thr. Típicamente, las metioninas expuestas se sustituirán por una Leu, las asparaginas expuestas se reemplazarán por una glutamina o por un aspartato, o se cambiará el siguiente resto. Para el sitio de glicosilación (Asn-X-Ser/Thr), se cambiará el resto Asn o el resto Ser/Thr.

En la secuencia compuesta resultante se comprueba la presencia de epítopos de células T lineales o epítopos de células B conocidos. Se realiza una búsqueda, por ejemplo, con IEDB disponible públicamente. Si se encuentra un epítopo conocido dentro de la secuencia compuesta, se recupera y se sustituye otra serie de secuencias humanas

A diferencia del método de resurfacing (modificación de superficie) de la Patente de Estados Unidos Nº 5.639.641, por medio de este método se tratan tanto las respuestas inmunogénicas mediadas por células B como las mediadas por células T. El método también evita el problema de pérdida de actividad que se observa algunas veces con el injerto de CDR (Patente de Estados Unidos Nº 5.530.101). Además, también se consideran cuestiones de estabilidad y de solubilidad en el proceso de ingeniería genética y de selección, dando como resultado un anticuerpo que está optimizado para una baja inmunogenicidad, alta afinidad por el antígeno y mejores propiedades biofísicas.

Se describen estrategias y métodos para modificar la superficie de anticuerpos, y otros métodos para reducir la inmunogenicidad de anticuerpos dentro de un hospedador diferente, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Nº 5.639.641. En resumen, en un método preferido, (1) se generan alineamientos de posiciones de un grupo de regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpo para producir posiciones expuestas en la superficie en zonas flanqueantes de la región variable de cadena pesada y ligera, donde las posiciones de alineamiento para todas las regiones variables tienen una identidad de al menos aproximadamente 98%; (2) se define una serie de restos aminoacídicos expuestos en la superficie en una zona flanqueante de la región variable de cadena pesada y ligera para un anticuerpo no humano, tal como un anticuerpo de roedor (o un fragmento del mismo); (3) se identifica una serie de residuos de aminoácidos expuestos en la superficie del marco de la región variable de la cadena pesada y ligera que es la más parecida a la serie de residuos de aminoácidos expuestos en la superficie del roedor; y (4) la serie de restos aminoacídicos expuestos en la superficie en zonas flanqueantes de la región variable de cadena pesada y ligera definido en la etapa (2) se sustituye por la serie de restos aminoacídicos expuestos en la superficie en zonas flanqueantes de la región variable de cadena pesada y ligera identificados en la etapa (3), excepto los restos aminoacídicos que están a una distancia menor de 5Å de cualquier átomo de cualquier resto de una CDR del anticuerpo de ratón, para producir un anticuerpo humanizado, tal como un anticuerpo de ratón que conserva la especificidad de unión.

Los anticuerpos pueden humanizarse por una diversidad de técnicas distintas incluyendo el injerto de CDR (documentos EPO 0 239 400; WO 91/09967; y las patentes de EE.UU. Nos. 5.530.101 y 5.585.089), recubrimiento o modificación en superficie (documentos EPO 0 592 106; EPO 0 519 596; Padlan, 1991, Molec Imm 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Prot Eng 7(6):805-814; y Roguska et al., 1994, PNAS 91:969-973) e intercambio de cadenas (Patente de Estados Unidos Nº 5.565.332). Los anticuerpos humanos pueden obtenerse por una diversidad de métodos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitación, métodos de presentación en fagos, véanse las Patentes de Estados Unidos Nº 4.444.887, 4.716.111, 5.545.806 y 5.814.318; y los documentos WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741, usando animales transgénicos tales como roedores, usando células quiméricas y similares.

“Homólogo de anticuerpo” u “homólogo” se refiere a cualquier molécula que se une específicamente a IL-4 y/o IL-13, tal como se indica en la presente memoria. De esta manera, un homólogo de anticuerpo incluye un anticuerpo nativo o recombinante, modificado o no, partes de anticuerpos que retienen las propiedades biológicas de interés, tales como la unión a IL-4 o a IL-13, tales como una molécula Fab o Fv, un anticuerpo monocatenario, un polipéptido que porta una o más regiones CDR, etc. No es necesario que la secuencia de aminoácidos del homólogo sea idéntica a la del anticuerpo natural, sino que puede haberse alterado o modificado para portar aminoácidos sustituidos, aminoácidos insertados, aminoácidos delecionados, aminoácidos distintos de los veinte que aparecen normalmente en proteínas, etc., para obtener un polipéptido con mejores propiedades u otras propiedades beneficiosas.

Los anticuerpos con secuencias homólogas son los anticuerpos con secuencias de aminoácidos que tienen una homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo para IL-4, IL-13 o un anticuerpo biespecífico para IL-4/IL-13 descrito en este documento. Preferiblemente, la homología es con la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de un anticuerpo descrito en este documento. “Homología de secuencia”, tal como se aplica a una secuencia de aminoácidos en la presente memoria, se define como una secuencia con una homología de secuencia de al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94% o mayor, y más preferiblemente una homología de secuencia de al menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con otra secuencia de aminoácidos, tal como se determina, por ejemplo, por el método de búsqueda FASTA según Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 2444-2448 (1988).

Un anticuerpo quimérico es aquel con diferentes partes de un anticuerpo derivado de diferentes fuentes, tales como diferentes anticuerpos, diferentes clases de anticuerpo, diferentes especies animales, por ejemplo, un anticuerpo que tiene una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino apareada con una región constante de inmunoglobulina humana y similares. De esta manera, un anticuerpo humanizado es una especie de anticuerpo quimérico. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica, véase, por ej., Morrison, 1985, Science 229:1202; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214; Gillies et al., 1989, J Immunol Methods 125:191-202; y las patentes de EEUU nº 5.807.715, 4.816.567 y 4.816.397.

Los anticuerpos artificiales incluyen fragmentos scFv, anticuerpos quiméricos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y mru (véanse los documentos de Winter y Milstein, 1991, Nature, 349:293-299; y Hudson, 1999, Curr. Opin. Imm.,

11:548-557), cada uno con capacidad de unión al antígeno o de unión a epitopos. En el fragmento monocatenario Fv (scFv), los dominios VH y VL de un anticuerpo están conectados mediante un péptido flexible. Generalmente, el conector es un péptido de aproximadamente 15 aminoácidos. Si el conector es mucho más pequeño, por ejemplo, de 5 aminoácidos, se forman diacuerpos. La unidad de unión más pequeña de un anticuerpo es una CDR, generalmente la CDR2 de la cadena pesada que tiene suficiente capacidad de reconocimiento específico y de unión. Dicho fragmento se denomina unidad de reconocimiento molecular o mru. Varias de estas mru se pueden unir con péptidos conectores cortos, formando por lo tanto una proteína de unión artificial con una mayor avidez que una única mru.

También se describen en este documento equivalentes funcionales de un anticuerpo de interés. La expresión "equivalentes funcionales" incluye anticuerpos con secuencias homólogas, homólogos de anticuerpos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos artificiales y anticuerpos modificados, por ejemplo, en los que cada equivalente funcional se define por la capacidad de unirse a IL-4 y/o a IL-13, inhibir la capacidad de señalización o la función de IL-4 y/o IL-13, o inhibir la unión de IL-4 y/o IL-13 a su receptor. Los expertos en la técnica entenderán que existe una superposición en el grupo de moléculas denominado "fragmentos de anticuerpo" y el grupo denominado "equivalentes funcionales". Los métodos para producir equivalentes funcionales que mantengan la capacidad de unión a IL-4 y/o IL-13 son conocidos por los expertos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en los documentos WO 93/21319, EPO Ser. Nº. 239.400, WO 89/09622, EPO Ser. Nº 338.745 y EPO Ser. Nº 332.424.

Los equivalentes funcionales de la presente solicitud incluyen también anticuerpos modificados, por ejemplo, anticuerpos modificados mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos modificados incluyen anticuerpos que se han modificado, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, pegilación, desamidación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular, unión a una toxina o a un resto citotóxico u otra proteína, etc. No es necesario que la unión covalente produzca un anticuerpo que sea inmune a la generación de una respuesta anti-idiotípica. Las modificaciones pueden conseguirse por técnicas conocidas incluyendo, pero sin limitación, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica, etc. Además, los anticuerpos modificados pueden contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Los especialistas en la técnica disponen de muchas técnicas que permiten la optimización de la afinidad de unión. Típicamente, las técnicas incluyen la sustitución de diversos restos aminoacídicos en el sitio de interés, seguido de un análisis de selección de afinidad de unión del polipéptido mutante para el epítopo o antígeno afín.

Una vez identificado y aislado el anticuerpo, a menudo es útil generar un anticuerpo variante o mutante, o muteína, en el que se han alterado uno o más restos aminoacídicos, por ejemplo, en una o más de las regiones hipervariables del anticuerpo. Como alternativa, o además, pueden introducirse en el anticuerpo una o más alteraciones (por ejemplo sustituciones) de restos flanqueantes, mejorando estas alteraciones la afinidad de unión del mutante de anticuerpo por IL-4 y/o IL-13. Los ejemplos de restos de región flanqueante que pueden modificarse incluyen los que no se unen covalentemente al antígeno directamente (Amit et al., Science 233:747-753 (1986)); interaccionan con/afectan a la conformación de una CDR (Chothia et al., J Mol Biol 196:901-917 (1987)); y/o participan en la superficie de contacto VL-VH (documento EP 239 400). En ciertas realizaciones, la modificación de uno o más de estos restos de la región flanqueante produce una mejora de la afinidad de unión del anticuerpo por el antígeno afín. Por ejemplo, pueden alterarse de aproximadamente uno a aproximadamente cinco restos flanqueantes. Algunas veces, esto puede ser suficiente para producir un anticuerpo mutante adecuado para uso en ensayo preclínicos, aunque no se haya alterado ninguno de los restos de la región hipervariable. Sin embargo, normalmente, el mutante de anticuerpo puede comprender una o más alteraciones de la región hipervariable. Las regiones constantes también pueden alterarse para obtener propiedades efectoras deseables o más deseables.

Los restos de la región hipervariable que se alteran pueden cambiarse aleatoriamente, especialmente cuando la afinidad de unión de partida del anticuerpo parental es tal que pueden explorarse fácilmente mutantes de anticuerpo producidos de manera aleatoria para seleccionar los que tienen una unión alterada en un ensayo como el que se enseña en la presente memoria.

Un procedimiento para obtener mutantes de anticuerpo, tales como mutantes de CDR, es la "mutagénesis mediante alanina" (Cunningham & Wells, Science 244:1081--1085 (1989); y Cunningham & Wells, Proc Nat Acad Sci USA 84:6434-6437 (1991)). Uno o más de los restos de la región hipervariable se reemplazan por restos de alanina o polialanina. Este o estos restos de región hipervariable que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones después se refinan introduciendo mutaciones adicionales o distintas en o en lugar de los sitios de sustitución. De esta manera, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario que esté predeterminada la naturaleza de la mutación per se. Pueden intentarse sustituciones similares con otros aminoácidos, dependiendo de la propiedad deseada de los restos explorados.

Un método más sistemático para identificar restos aminoacídicos a modificar comprende identificar restos de región hipervariable implicados en la unión a IL-4 y/o IL-13 y los restos de la región hipervariable con poca implicación o no implicados en la unión a IL-4 y/o a IL-13. Se realiza una mutación mediante alanina de los restos de la región hipervariable no implicados en la unión, ensayándose cada mutante ala con respecto al aumento de la unión a IL-4 y/o IL-13. En otra realización, se seccionan los restos implicados de manera significativa en la unión a IL-4 y/o a IL-

13 para su modificación. La modificación puede implicar la deleción de un resto o la inserción de uno o más restos adyacentes a un resto de interés. Sin embargo, normalmente, la modificación implica la sustitución del resto por otro aminoácido. Una primera sustitución puede ser una sustitución conservativa. Si esta sustitución produce un cambio en la actividad biológica (por ejemplo, en la afinidad de unión), entonces puede hacerse otra sustitución conservativa para determinar si se obtienen más cambios sustanciales.

Pueden realizarse incluso más modificaciones sustanciales en una serie de anticuerpos y la presentación de propiedades biológicas por medio de la selección de un aminoácido que difiere más sustancialmente en las propiedades del que reside normalmente en un sitio. De esta manera, esta sustitución puede realizarse manteniendo al mismo tiempo: (a) la estructura del esqueleto polipeptídico en el área de la sustitución, por ejemplo, como una lámina o conformación helicoidal; (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral.

Por ejemplo, los aminoácidos naturales pueden dividirse en grupos basándose en propiedades comunes de la cadena lateral:

(1) hidrófobos: metionina (M o met), alanina (A o ala), valina (V o val), leucina (L o leu) e isoleuquina (I o ile);

(2) neutros, hidrófilos: cisteína (C o cys), serina (S o ser), treonina (T o thr), asparagina (N o asn) y glutamina (Q o gln);

(3) ácidos: ácido aspártico (D o asp) y ácido glutámico (E o glu);

(4) básicos: histidina (H o his), lisina (K o lys) y arginina (R o arg);

(5) restos que influyen en la orientación de la cadena: glicina (G o gly) y prolina (P o pro), y

(6) aromáticos: triptófano (W o trp), tirosina (Y o tyr) y fenilalanina (F o phe).

Las sustituciones no conservativas pueden suponer el cambio de un aminoácido por un aminoácido de otro grupo. Las sustituciones conservativas pueden implicar el cambio de un aminoácido por otro dentro de un grupo.

Las sustituciones de aminoácidos preferidas incluyen aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteolisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión y (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de estos análogos. Los análogos pueden incluir diversas muteínas de una secuencia distinta de la secuencia del péptido natural. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples (preferiblemente sustituciones conservativas de aminoácidos) en la secuencia natural (preferiblemente en la porción del polipéptido fuera del dominio que forma los contactos intermoleculares). Una sustitución conservadora de aminoácidos no debería cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia parental (por ej., un aminoácido sustitutivo no debe tender a la rotura de una hélice que está presente en la secuencia parental, o romper otros tipos de estructura secundaria que caracterizan a la secuencia parental) a menos que haya un cambio en el volumen o conformación del grupo R o la cadena lateral, Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); Introduction to Protein Structure (Branden & Tooze, eds., Garland Publishing, Nueva York, N. Y. (1991)); y Thornton et al. Nature 354:105 (1991).

Normalmente, el mutante de anticuerpo con propiedades biológicas mejoradas tendrá una secuencia de aminoácidos con una identidad o similitud de secuencia de aminoácidos de al menos 75% con la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada o ligera del anticuerpo anti-IL-4 y/o IL-13 humano parental, una identidad de al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% y a menudo de al menos 95%. La identidad o similitud con respecto al anticuerpo parental se define en la presente memoria como el porcentaje de restos aminoacídicos en la secuencia candidata que son idénticos (es decir, es el mismo resto) o similares (es decir, son restos aminoacídicos del mismo grupo basándose en propiedades comunes de las cadenas laterales, supra) a los restos del anticuerpo parental, después de alinear las secuencias y de introducir huecos, si es necesario, para conseguir un máximo porcentaje de identidad de secuencia.

Como alternativa, pueden generarse mutantes de anticuerpo por mutación sistemática de las regiones FR y CDR de las cadenas ligera y pesada, o la región Fc del anticuerpo anti-IL-4, anti-IL-13 o biespecífico para IL-4/IL-13. Otro procedimiento para generar mutantes de anticuerpo implica el uso de maduración de afinidad usando presentación de fagos (Hawkins et al., J Mol Biol 254:889-896 (1992) y Lowman et al., Biochemistry 30(45):10832-10838(1991)). Se sabe que las fusiones con proteínas de la cubierta de bacteriófagos (Smith, Science 228:1315 (1985); Scott & Smith, Science 249:386 (1990); Cwirla et al. Proc Natl Acad Sci USA 8:309 (1990); Devlin et al. Science 249:404 (1990); Wells & Lowman, Curr Opin Struct Biol 2:597 (1992); y Patente de Estados Unidos Nº 5.223.409) son útiles para asociar el fenotipo de proteínas o péptidos presentados al genotipo de partículas de bacteriófagos que los codifican. También se han presentado dominios Fab de anticuerpos en fagos (McCafferty et al., Nature 348: 552 (1990); Barbas et al. Proc Natl Acad Sci USA 88:7978 (1991); y Garrard et al. Biotechnol 9:1373 (1991)).

La presentación en fagos monovalentes consiste en presentar una serie de variantes de proteína como fusiones de una proteína de la cubierta de bacteriófagos en partículas de fago (Bass et al., Proteins 8:309 (1990). La maduración de la afinidad, o mejora de las afinidades de unión en equilibrio de diversas proteínas, se ha conseguido previamente por medio de la aplicación sucesiva de mutagénesis, presentación en fagos monovalentes y análisis funcional (Lowman & Wells, J Mol Biol 234:564 578 (1993); y Patente de Estados Unidos Nº 5.534.617), por ejemplo, centrándose en las regiones CDR de anticuerpos (Barbas et al., Proc Natl Acad Sci USA 91:3809 (1994); y Yang et al., J Mol Biol 254:392 (1995)).

Pueden construirse bibliotecas de muchas (por ejemplo, 106 o más) variantes de proteínas, que difieren en posiciones definidas de la secuencia, en partículas de bacteriófagos, conteniendo cada una un ADN que codifica la variante de proteína particular. Después de los ciclos de purificación por afinidad, usando un antígeno inmovilizado, se aíslan clones de bacteriófagos individuales, y se deduce la secuencia de aminoácidos de la proteína presentada a partir del ADN.

Después de la producción del mutante de anticuerpo, puede determinarse la actividad biológica de esa molécula con respecto al anticuerpo parental como se enseña en la presente memoria. Como se ha indicado anteriormente, esto puede implicar la determinación de la afinidad de unión y/u otras actividades biológicas o propiedades físicas del anticuerpo. En una realización preferida, se prepara un panel de mutantes de anticuerpo y se explora la afinidad de unión por el antígeno. Uno o más de los mutantes de anticuerpo seleccionados de la exploración se someten opcionalmente a uno o más ensayos adicionales de actividad biológica para confirmar que el mutante o mutantes de anticuerpo tienen propiedades nuevas o mejoradas. En realizaciones preferidas, el mutante de anticuerpo retiene la capacidad de unirse a IL-4 y/o a IL-13 con una afinidad de unión similar o mejor/mayor que la del anticuerpo parental.

El mutante o mutantes de anticuerpo seleccionados de esta manera pueden someterse a modificaciones adicionales, a menudo dependiendo del uso deseado del anticuerpo. Estas modificaciones pueden implicar una alteración adicional de la secuencia de aminoácidos, fusión a polipéptidos heterólogos y/o modificaciones covalentes. Por ejemplo, un resto de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del mutante de anticuerpo puede sustituirse, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula e impedir un entrecruzamiento aberrante. Por el contrario, puede añadirse una cisteína al anticuerpo para mejorar la estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Otro tipo de mutante de anticuerpo tiene un patrón de glicosilación alterado. Esto puede conseguirse delecionando uno o más restos de carbohidrato encontrados en el anticuerpo y/o añadiendo uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo. La glicosilación de los anticuerpos típicamente está N-unida a Asn u O-unida a Ser o Thr. Las secuencias tripeptídicas, asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son secuencias de reconocimiento comunes para la unión enzimática de un resto de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. La N-acetilgalactosamina, galactosa, fucosa o xilosa, por ejemplo, se une a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxiprolina o 5-. La adición o sustitución de uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original puede mejorar la probabilidad de O-glicosilación.

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función del efector, para mejorar la eficacia del anticuerpo. Por ejemplo, pueden introducirse restos de cisteína en la región Fc, permitiéndose de esta manera la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esa región. El anticuerpo homodimérico generado de esta manera puede tener una mejor capacidad de internalización y/o mayor destrucción de células mediada por el complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), véase Caron et al., J Exp Med 176:1191-1195 (1992) y Shopes, Immunol 148:2918-2922 (1993). Como alternativa, puede obtenerse por ingeniería genética un anticuerpo que tenga regiones Fc dobles y por lo tanto puede tener mejores propiedades de lisis por el complemento y ADCC, véase Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3: 219 230 (1989).

Dentro del alcance de la invención se incluyen modificaciones covalentes del anticuerpo. Éstas pueden obtenerse por síntesis química o por escisión enzimática o química del anticuerpo, si es aplicable. En la molécula se introducen otros tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo por medio de la reacción de restos aminoacídicos diana del anticuerpo con un agente de derivatización orgánico que sea capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o con el resto N-terminal o C-terminal.

Los restos cisteinilo pueden hacerse reaccionar con α-haloacetatos (y las correspondientes aminas), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para producir derivados de carboxilmetilo o carboxiamidometilo. Los restos cisteinilo también pueden derivatizarse por reacción con bromotrifluoroacetona, ácido α-bromo-β-(5-imidozoil)propiónico, cloroacetil fosfato, N-alquilmaleimidas, 3-nitro-2-piridil disulfuro, metil 2-piridil disulfuro, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercura-4-nitrofenol o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol, por ejemplo.

Los restos histidilo pueden derivatizarse por reacción con dietilpirocarbonato a pH 5,5-7,0. También puede usarse bromuro de p-bromofenacilo, la reacción preferiblemente se realiza en cacodilato sódico 0,1 M a pH 6,0.

Los restos lisinilo y α terminales pueden hacerse reaccionar con anhídridos de ácido succínico u otros ácidos carboxílicos para invertir la carga de los restos. Otros reactivos adecuados para derivatizar restos que contienen α-amino incluyen imidoésteres tales como picolinimidato de metilo, piridoxal fosfato, piridoxal, cloroborohidruro, ácido trinitrobencenosulfónico, O-metilisourea y 2,4-pentanodiona, y el aminoácido puede modificarse por una reacción con glioxilato catalizada por transaminasa.

Los restos arginilo pueden modificarse por reacción con uno o varios reactivos convencionales, tales como fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivatización de restos de arginina a menudo requiere condiciones de reacción alcalinas. Además, los reactivos pueden reaccionar con lisina así como con el grupo ε-amino de arginina.

La modificación específica de restos de tirosilo puede realizarse con compuestos de diazonio aromáticos o tetranitrometano. Por ejemplo, para formar especies de O-acetil tirosilo y 3-nitroderivados, se usan N-acetilimidazol y tetranitrometano respectivamente. Los restos de tirosilo pueden yodarse usando 125I o 131I para preparar proteínas marcadas para uso en un radioinmunoensayo.

Los grupos laterales de carboxilo (aspartilo o glutamilo) pueden modificarse por reacción con carbodiimidas (R-N=C=C-R'), donde R y R' pueden ser diferentes grupos alquilo tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil)carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. Además, los restos de aspartilo y glutamilo pueden convertirse en restos de asparaginilo y glutaminilo por reacción con iones de amonio.

Los restos glutaminilo y asparaginilo a menudo se desamidan para dar los correspondientes restos glutamilo y aspartilo, respectivamente, en condiciones neutras o básicas. La forma desamidada de estos restos cae dentro del alcance de esta invención.

Otras modificaciones incluyen la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de restos serinilo o treonilo, la metilación de los grupos α-amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, páginas 79-86 (1983)), acetilación de la amina N-terminal y amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

Otro tipo de modificación covalente implica el acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al anticuerpo. Estos procedimientos no requieren la producción del anticuerpo en una célula hospedadora que tenga capacidades de glicosilación para N- u O-glicosilación. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, el azúcar o azúcares pueden unirse a: (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxilo libres; (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína; (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina; (e) restos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano; o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos métodos se describen en los documentos WO 87/05330 y en Aplin & Wriston, CRC Crit Rev Biochem, pág. 259-306 (1981).

La eliminación de cualquier resto de carbohidrato presente en el anticuerpo puede realizarse química o enzimáticamente. La desglicosilación química, por ejemplo, puede requerir la exposición del anticuerpo al compuesto, ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente, dando como resultado la escisión de la mayor parte o de todos los azúcares excepto el azúcar de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras que queda intacto el anticuerpo. La desglicosilación química se describe, por ejemplo, en Hakimuddin et al. Arch Biochem Biophys 259:52 (1987) y en Edge et al., Anal Biochem 118:131 (1981). La escisión enzimática de restos de carbohidrato presentes en anticuerpos puede conseguirse por cualquiera de una diversidad de endoglicosidasas y exoglicosidasas como se describe, por ejemplo, en Thotakura et al., Meth Enzymol 138:350(1987).

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende la unión del anticuerpo a uno o una diversidad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera expuesta en las Patentes de Estados Unidos Nº 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337.

Otra técnica preferida para obtener mutantes o muteínas es la maduración de la afinidad por presentación en fagos (Hawkins et al., J Mol Biol 254:889-896 (1992); y Lowman et al., Biochemistry 30(45):10832-10838 (1991)). En resumen, varios sitios de región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) se mutan para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Los mutantes de anticuerpo generados de esta manera se presentan en forma monovalente sobre partículas de fago como fusiones con una proteína encontrada en las partículas. La expresión en el fago de los diversos mutantes puede someterse a ciclos a través de vueltas de selección de unión, seguido del aislamiento y secuenciación de esos mutantes que presentan alta afinidad.

El método de selección de nuevos polipéptidos de unión puede utilizar una biblioteca de polipéptidos relacionados estructuralmente. La biblioteca de polipéptidos relacionados estructuralmente, por ejemplo, fusionados a una proteína de la cubierta de un fago, se produce por mutagénesis, y se presenta en la superficie de la partícula. Las partículas después se ponen en contacto con una molécula diana y las partículas que tienen la mayor afinidad por la diana se separan de las de menor afinidad. Los agentes de unión de alta afinidad después se amplifican por infección de una célula hospedadora bacteriana adecuada y se repite la etapa de unión competitiva. El proceso se repite hasta que se obtienen los polipéptidos de la afinidad deseada.

Como alternativa, también pueden usarse fagos multivalentes (McCafferty et al. (1990) Nature 348:552-554; y Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628) para expresar mutaciones puntuales aleatorias (por ejemplo, generadas por medio del uso de una ADN polimerasa propensa a errores) para generar una biblioteca de fragmentos de anticuerpo en fago que después podrían explorarse con respecto a la afinidad por IL-4 y/o IL-13, Hawkins et al., (1992) J Mol Biol 254:889-896.

Preferiblemente, durante el proceso de maduración de afinidad, el vector de expresión replicable está bajo un control estricto de un elemento regulador de la transcripción, y las condiciones de cultivo se ajustan de manera que la cantidad o número de partículas que presentan más de una copia de la proteína de fusión sea menor de aproximadamente 1%. También preferiblemente, la cantidad de partículas que presentan más de una copia de la proteína de fusión es menos de 10% de la cantidad de partículas que presentan una sola copia de la proteína de fusión. Preferiblemente, la cantidad es menor de 20%.

Pueden producirse equivalentes funcionales intercambiando diferentes CDR de diferentes cadenas de anticuerpo dentro de una región flanqueante o una FR compuesta derivada de anticuerpos plurales. De esta manera, por ejemplo, son posibles diferentes clases de anticuerpo para una serie dada de CDR por sustitución de diferentes cadenas pesadas, por ejemplo IgG1-4, IgM, IgA1-2 o IgD, para producir diferentes tipos e isotipos de anticuerpos para IL-4 y/o IL-13. De manera similar, los anticuerpos artificiales se pueden producir incluyendo un conjunto de CDR dado en un marco completamente sintético.

Los fragmentos de anticuerpo y equivalentes funcionales de la presente invención incluyen las moléculas con un grado detectable de unión específica a IL-13. Un grado detectable de unión incluye todos los valores en el intervalo de al menos 10-100%, preferiblemente al menos 50%, 60% o 70%, más preferiblemente al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de la capacidad de unión de un anticuerpo de interés. También se incluyen equivalentes con una afinidad mayor de 100% de la de un anticuerpo de interés.

Las CDR generalmente son importantes para el reconocimiento de epítopo y unión del anticuerpo. Sin embargo, pueden realizarse cambios en restos que constituyen las CDR sin interferir con la capacidad del anticuerpo de reconocer y de unirse al epítopo afín. Por ejemplo, pueden realizarse cambios que no afectan al reconocimiento del epítopo, pero aumentan la capacidad de unión del anticuerpo por el epítopo. Algunos estudios han sondeado los efectos de la introducción de uno o más cambios en aminoácidos en varias posiciones en la secuencia de un anticuerpo, en base al conocimiento de la secuencia de anticuerpo primaria, en las propiedades de los mismos, tales como la unión y nivel de expresión (Yang et al., 1995, J Mol Biol 254:392-403; Rader et al., 1998, Proc Natl Acad Sci USA 95:8910-8915; y Vaughan et al., 1998, Nature Biotechnology 16, 535-539).

De esta manera, pueden generarse equivalentes de un anticuerpo de interés cambiando las secuencias de los genes de cadena pesada y ligera en la CDR1, CDR2 o CDR3, o en regiones flanqueantes, usando métodos tales como mutagénesis dirigida mediada por oligonucleótidos, mutagénesis de casetes, PCR con tendencia a error, intercambio de fragmentos de ADN o cepas mutadoras de E. coli (Vaughan et al., 1998, Nat Biotech 16:535-539; y Adey et al., 1996, Chap. 16, pág. 277-291, en Phage Display of Peptides and Proteins, eds. Kay et al., Academic Press). Los métodos de cambio de la secuencia de ácido nucleico del anticuerpo primario pueden dar como resultado anticuerpos con afinidad mejorada (Gram et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89:3576-3580; Boder et al., 2000, Proc Natl Acad Sci USA 97:10701-10705; Davies & Riechmann, 1996, Immunotech 2:169-179; Thompson et al., 1996, J Mol Biol 256:77-88; Short et al., 2002, J Biol Chem 277:16365-16370; y Furukawa et al., 2001, J Biol Chem 276:27622-27628).

Pueden usarse ciclos repetidos de "selección de polipéptidos" para seleccionar una unión cada vez de mayor afinidad, por ejemplo, por medio de la selección de múltiples cambios de aminoácidos que se seleccionan por múltiples selecciones de ciclos. Después de una primera vuelta de selección, que implica una primera región de selección de aminoácidos en el polipéptido del ligando o del anticuerpo, se realizan vueltas adicionales de selección en otras regiones o aminoácidos del ligando. Los ciclos de selección se repiten hasta que se consiguen las propiedades de afinidad deseadas.

Los anticuerpos mejorados incluyen también aquellos anticuerpos que tienen características mejoradas que se preparan mediante técnicas estándar de inmunización animal, formación de hibridomas y selección de anticuerpos con características específicas.

"Antagonista" se refiere a una molécula capaz de inhibir una o más actividades biológicas de una molécula diana, tal como la señalización por IL-4 y/o IL-13. Los antagonistas pueden interferir con la unión de un receptor a un ligando y viceversa, por medio de la incapacitación o destrucción de células activadas por un ligando, y/o por medio de la interferencia con la activación del receptor o el ligando (por ejemplo, activación de tirosina quinasa) o la transducción de señales después de la unión de un ligando a un receptor. El antagonista puede bloquear completamente las interacciones de receptor-ligando o puede reducir sustancialmente estas interacciones.

"Agonista" se refiere a un compuesto, incluyendo una proteína, un polipéptido, un péptido, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un conjugado, una molécula grande o una molécula pequeña, que activa una o más actividades biológicas de IL-4 y/o IL-13. Los agonistas pueden interaccionar con la unión de un receptor a un ligando

y viceversa, por actuación como un mitógeno de células activado por un ligando, y/o por interferencia con la inactivación de células o la inhibición de la transducción de señales después de la unión de un ligando a un receptor. Todos estos puntos de intervención por un agonista se considerarán equivalentes para los fines de la presente descripción.

Las expresiones "célula," "línea celular" y "cultivo celular" incluyen su descendencia. También se entiende que toda la descendencia puede no ser precisamente idéntica, tal como en el contenido de ADN, debido a una mutación deliberada o involuntaria. Se incluye la descendencia variante que tiene la misma función o propiedades biológicas de interés para las que se realizó la selección en la célula original.

El término "vector" significa una construcción de ácido nucleico, un vehículo, que contiene un ácido nucleico, el transgén, el gen extraño o el gen de interés, que puede estar unido operativamente a secuencias de control adecuadas para la expresión del transgén en un hospedador adecuado. Estas secuencias de control incluyen, por ejemplo, un promotor para efectuar la transcripción, una secuencia operadora opcional para controlar dicha transcripción, una secuencia que codifica sitios de unión a ribosomas del ARNm adecuados y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción. El vector puede ser un plásmido, una partícula de fago o sólo un inserto genómico potencial. Una vez transformado el hospedador adecuado, el vector puede replicarse y funcionar independientemente del genoma del hospedador, o en algunos casos, puede integrarse en el genoma de la célula hospedadora. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se usan indistintamente, ya que el plásmido es una forma de vector usada comúnmente. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de vectores que tienen función de vehículo equivalentes y que son o que están siendo conocidas en la técnica tales como virus, moléculas sintéticas que llevan ácidos nucleicos, liposomas y similares.

"Mamífero", para los fines de tratamiento, se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, primates no humanos y animales de zoológico, deportivos o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc.

Los anticuerpos de interés pueden someterse a una selección o pueden usarse en un ensayo como el descrito en la presente memoria o conocido en la técnica. A menudo, estos ensayos requieren que un reactivo sea detectable, por ejemplo, que esté marcado. La palabra "marcador", cuando se usa en la presente memoria, se refiere a un compuesto o composición detectable que puede conjugarse directa o indirectamente con una molécula o proteína, por ejemplo, un anticuerpo. El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores radioisótopos, partículas o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable.

Como se usa en la presente memoria, "fase sólida" significa una matriz no acuosa a la que se puede adherir una entidad o molécula, tal como el anticuerpo de la presente invención. Los ejemplos de fases sólidas incluidas en la presente memoria incluyen las formadas parcial o completamente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poros controlados), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras puede usarse en una columna de purificación (por ejemplo, en una columna de cromatografía de afinidad). De esta manera, la fase sólida puede ser un papel, una perla, un plástico, un chip y similares, puede estar hecha de una diversidad de materiales tales como nitrocelulosa, agarosa, poliestireno, polipropileno, silicio y similares, y puede estar en una diversidad de configuraciones.

El gen o un ADNc que codifica IL-4 e IL-13 se conoce en la técnica, por ejemplo puede clonarse en un plásmido u otro vector de expresión y expresarse en cualquiera de varios sistemas de expresión de acuerdo con métodos bien conocidos por los especialistas en la técnica, y véase más abajo, por ejemplo.

Pueden prepararse moléculas de ácido nucleico que codifican mutantes de secuencia de aminoácidos por una diversidad de métodos bien conocidos en la técnica. Los métodos incluyen, pero sin limitación, mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida), mutagénesis de PCR y mutagénesis de casete de un mutante preparado previamente o de una versión no mutante de la molécula de interés (véase, por ejemplo, Kunkel, Proc Natl Acad Sci USA 82:488 (1985)).

La expresión recombinante de un anticuerpo de la invención, o su fragmento, (p. ej. una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, un anticuerpo monocatenario o una muteína de anticuerpo) incluye la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el anticuerpo o un fragmento del anticuerpo como se describe en la presente memoria. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo, el vector para la producción del anticuerpo puede producirse por tecnología de ADN recombinante como se conoce en la técnica. Un vector de expresión se construye de manera que contenga secuencias codificantes de anticuerpo y señales de control de la transcripción y la traducción apropiadas. Los métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante in vitro, técnicas sintéticas y recombinación genética in vivo.

El vector de expresión se transfiere a una célula hospedadora por técnicas convencionales y las células transfectadas después se cultivan por técnicas convencionales para producir un anticuerpo o fragmento de la invención. En un aspecto de la invención, pueden coexpresarse vectores que codifican las cadenas pesada y ligera

en la célula hospedadora para la expresión de la molécula de inmunoglobulina entera, como se detalla en la presente memoria.

Puede utilizarse una diversidad de sistemas de hospedador/vector de expresión para expresar las moléculas de anticuerpo de la invención. Estos sistemas de expresión representan vehículos por medio de los cuales las secuencias codificantes de interés pueden producirse y posteriormente purificarse, pero también representan células que, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, expresan una molécula de anticuerpo de la invención in situ. Para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante, especialmente para la expresión de moléculas de anticuerpo recombinantes enteras, comúnmente se usan células bacterianas tales como E. coli, y célula eucariotas. Por ejemplo, células de mamífero tales como células CHO, junto con un vector, tal como uno que lleva el elemento promotor del gen temprano intermedio principal del citomegalovirus humano, son un sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foecking et al., Gene 45:101 (1986); y Cockett et al., Bio/Technology 8:2 (1990)). Para preparar las proteínas de interés, como es conocido en la técnica, también pueden usarse plantas y cultivo de células vegetales, células de insecto y similares.

Además, se elige una célula hospedante que modula la expresión de las secuencias insertadas, o que modifica y procesa el producto génico de la forma específica deseada. Estas modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de los productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Las diferentes células hospedadoras tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento postraduccional y la modificación de proteínas y productos génicos. Pueden elegirse líneas celulares o sistemas hospedadores apropiados para garantizar la modificación y el procesamiento correctos del anticuerpo expresado de interés. Por lo tanto, pueden usarse células hospedadoras eucariotas que posean la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario, glicosilación y fosforilación del producto génico. Estas células hospedadoras de mamífero incluyen, pero sin limitación, células CHO, COS, 293, 3T3 o células de mieloma.

Para la producción de alto rendimiento, a largo plazo, de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, pueden obtenerse por ingeniería genética líneas celulares que expresan de manera estable la molécula de anticuerpo. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales, las células hospedadoras pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, secuencias promotoras, potenciadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación etc.) y un marcador de selección. Después de la introducción del ADN foráneo, puede permitirse el crecimiento de las células modificadas por ingeniería durante uno o dos días en un medio enriquecido, y después se pasan a un medio de selección. El marcador de selección del plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de manera estable el plásmido en un cromosoma y se expanda en una línea celular. Estas líneas celulares modificadas por ingeniería genética no sólo son útiles para la producción de anticuerpos, sino que también son útiles en la selección y evaluación de compuestos que interaccionan directa o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

Pueden usarse varios sistemas de selección incluyendo, pero sin limitación, los genes de la timidina quinasa del virus Herpes simplex (Wigler et al., Cell 11:223 (1977)), la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska et al., Proc Natl Acad Sci USA 48:202 (1992)), la selección de glutamato sintasa en presencia de metionina sulfoxamida (Adv Drug Del Rev 58, 671, 2006 y véase la página web o la bibliografía de Lonza Group Ltd.) y la adenina fosforribosiltransferasa (Lowy et al., Cell 22:817 (1980)) en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. Además, puede usarse la resistencia antimetabolito como base de la selección de los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler et al., Proc Natl Acad Sci USA 77:357 (1980); O'Hare et al., Proc Natl Acad Sci USA 78:1527 (1981)); gpt, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan et al., Proc Natl Acad Sci USA 78:2072 (1981)); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Wu et al., Biotherapy 3:87 (1991)); e hygro, que confiere resistencia a higromicina (Santerre et al., Gene 30:147 (1984)). Los métodos conocidos en la técnica de tecnología de ADN recombinante se pueden aplicar de manera rutinaria para seleccionar el clon recombinante deseado, y tales métodos se describen, por ejemplo, en Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press (1990); Dracopoli et al., eds., Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons (1994); y Colberre-Garapin et al., J Mol Biol 150:1 (1981).

Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo pueden aumentarse por amplificación del vector (por ejemplo, véase Bebbington et al., en DNA Cloning, Vol. 3. Academic Press (1987)). Cuando un marcador presente en el sistema de vector que expresa el anticuerpo se puede amplificar, un aumento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo aumentará el número de copias del gen marcador. Como la región amplificada está asociada con el gen del anticuerpo, también aumentará la producción del anticuerpo (Crouse et al., Mol Cell Biol 3:257 (1983)).

La célula hospedadora puede cotransfectarse con dos o más vectores de expresión de la invención, por ejemplo, codificando el primer vector un polipéptido derivado de cadena pesada y codificando el segundo vector un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores de selección idénticos que permiten una expresión igual de los polipéptidos de cadena pesada y ligera. Como alternativa, puede usarse un solo vector que codifica, y es capaz de expresar, polipéptidos tanto de cadena pesada como de cadena ligera. En estas situaciones, la cadena ligera debe ponerse antes que la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada

libre que produce toxicidad (Proudfoot, Nature 322:52 (1986); y Kohler, Proc Natl Acad Sci USA 77:2197 (1980)). Las secuencias codificantes de las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez que una molécula de anticuerpo de la invención se ha producido por un animal, se ha sintetizado químicamente o se ha expresado de manera recombinante, puede purificarse por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, particularmente por afinidad por IL-4 y/o IL-13 después de la Proteína A y cromatografía de exclusión molecular y similares), centrifugación, solubilidad diferencial o por cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos de la presente invención o sus fragmentos pueden fusionarse con secuencias de polipéptidos heterólogas descritas en la presente memoria o conocidas en la técnica de otra manera, para facilitar la purificación.

Los anticuerpos de la presente invención pueden generarse por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender anticuerpos policlonales, aunque debido a la modificación de anticuerpos para optimizar el uso en seres humanos, así como para optimizar el uso del anticuerpo per se, se prefieren los anticuerpos monoclonales debido a la facilidad de producción y manipulación de proteínas particulares. Los métodos para preparar anticuerpos policlonales son conocidos para el especialista en la técnica (Harlow et al., Antibodies: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988)).

Los anticuerpos de la presente invención preferiblemente comprenden anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando tecnología de hibridoma, tal como es descrito por Kohler et al., Nature 256:495 (1975); patente de EE.UU. Pat. No. 4.376.110; Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. (1988) y Hammerling et al., Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier (1981), métodos de ADN recombinante, por ejemplo, preparación y uso de transfectomas, u otros métodos conocidos para el especialista en la técnica. Otros ejemplos de métodos que pueden emplearse para producir anticuerpos monoclonales incluyen, pero sin limitación, la técnica de hibridoma de células B humanas (Kosbor et al., Immunology Today 4:72 (1983); y Cole et al., Proc Natl Acad Sci USA 80:2026 (1983)), y la técnica del hibridoma de EBV (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pág. 77-96, Alan R. Liss (1985)). Estos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA e IgD, y cualquier subclase de la misma. El hibridoma que produce el mAb de la invención puede cultivarse in vitro o in vivo.

En el modelo de hibridoma, un hospedador tal como un ratón, un ratón humanizado, un ratón transgénico con genes del sistema inmune humano, hámster, conejo, rata, camello o cualquier otro animal hospedador apropiado, se inmuniza para inducir linfocitos que producen o pueden producir anticuerpos que se unen específicamente a IL-4 o IL-13. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar in vitro. Los linfocitos a continuación se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, pág. 59-103 (1986)).

En general, para preparar hibridomas productores de anticuerpos, se usan linfocitos de sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano, o se usan células de bazo o de ganglio linfático si se desean fuentes de mamífero no humanas. Las líneas celulares inmortalizadas normalmente son células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de roedor, de origen bovino o humano. Típicamente se emplea una línea de células de mieloma de rata o de ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si la célula parental carece de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), sustancias que previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Son líneas celulares inmortalizadas preferidas las que se fusionan eficazmente, soportan una producción estable y de alto nivel de anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Entre estas líneas celulares de mieloma se encuentran líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de los tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. y células SP2/0, FO o X63-Ag8-653 disponibles en la colección americana de cultivos tipo (American Type Culture Collection, Manassas, VA).

También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J Immunol 133:3001 (1984); y Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc, pág. 51-63 (1987)). También puede usarse la línea celular de mieloma de ratón NSO (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wilshire, UK).

Otra alternativa es usar fusión eléctrica en lugar de fusión química para formar hibridomas. En lugar de por medio de fusión, una célula B puede inmortalizarse usando, por ejemplo, el virus de Epstein Barr u otro gen de transformación, véase, por ejemplo, Zurawaki et al., en Monoclonal Antibodies, ed., Kennett et al., Plenum Press, pág. 19-33. (1980). También pueden usarse ratones transgénicos que expresan inmunoglobulinas y ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) en los que se han trasplantado linfocitos B humanos.

El medio de cultivo en el que están creciendo las células de hibridoma se ensaya con respecto a la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra IL-4 y/o IL-13. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma puede determinarse por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión in vitro, tal como un radioinmunoensayo (RIA), análisis fluorocitométrico (FACS) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). Estas técnicas son conocidas en este campo y están dentro de la experiencia del especialista. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal por IL-4 y/o IL-13 puede determinarse, por ejemplo, por medio de un análisis de Scatchard (Munson et al., Anal Biochem 107:220 (1980)).

Después de identificar a las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseada, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y cultivarse por métodos convencionales (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, pág. 59-103 (1986)). Los medios de cultivo adecuados incluyen, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) o medio RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse in vivo como tumores ascíticos en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones convenientemente se separan o se aíslan del medio de cultivo, líquido ascítico o suero por procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, proteína G-Sepharose, cromatografía en hidroxilapatita, cromatografía de exclusión molecular, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

En la técnica existe una diversidad de métodos para la producción de anticuerpos monoclonales y, de esta manera, la invención no se limita a su única producción en hibridomas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse por métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567. En este contexto, la expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo derivado de un solo clon eucariota, de fago o procariota.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se aísla y se secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos, o dichas cadenas de origen humano, humanizadas o de otras fuentes) (Innis et al. in PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic (1990), y Sanger et al., Proc Natl Acad Sci 74:5463 (1977)). Las células de hibridoma sirven como fuente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede ponerse en vectores de expresión que después se introducen por transfección en células hospedadoras tales como células E. coli, células NSO, células COS, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de melanoma que no producen de otra manera proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de dominios constantes de cadena pesada y dominios constantes de cadena ligera humana por las secuencias murinas homólogas (Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567; y Morrison et al., Proc Natl Acad Sci USA 81:6851 (1984)) o por medio de la unión covalente a la secuencia codificante de la inmunoglobulina de todo o parte de la secuencia codificante de un péptido que no es una inmunoglobulina. Dicho polipéptido que no es una inmunoglobulina puede sustituir a los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o puede sustituir a los dominios variables de un sitio de combinación de IL-13 de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Los métodos para preparar anticuerpos monovalentes son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de cadena ligera y cadena pesada modificada de inmunoglobulina. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto de la región Fc para prevenir la formación de enlaces cruzados en la cadena pesada. Como alternativa, los restos de cisteína pertinentes se sustituyen por otro resto aminoacídico o se delecionan para prevenir la formación de enlaces cruzados.

Pueden generarse fragmentos de anticuerpo que reconozcan epítopos específicos por técnicas conocidas. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtuvieron por digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto et al., J Biochem Biophys Methods 24:107 (1992); y Brennan et al., Science 229:81 (1985)). Por ejemplo, pueden producirse fragmentos Fab y F(ab')2 de la invención por escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')2). Los fragmentos F(ab')2 contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada. Sin embargo, estos fragmentos pueden producirse directamente por células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse a partir de una biblioteca de anticuerpos en fagos. Alternativamente, pueden recuperarse directamente fragmentos F(ab')2-SH a partir de E. coli y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')2 (Carter et al., Bio/Technology 10:163 (1992). De acuerdo con otra estrategia, pueden aislarse fragmentos F(ab')2 directamente a partir del cultivo de células hospedadoras recombinantes. Para el especialista en la técnica serán evidentes otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (Fv) (documento WO 93/16185).

Para algunos usos, incluyendo el uso in vivo de anticuerpos en seres humanos y ensayos de detección in vitro, puede ser preferible el uso de anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica, véase, por ej., Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al.,

BioTechniques 4:214 (1986); Gillies et al., J Immunol Methods 125:191 (1989); y las patentes de EE.UU. 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397.

Los anticuerpos humanizados proceden de moléculas de anticuerpo generadas en una especie no humana que se unen a IL-4 y/o IL-13 donde una o más CDR se insertan en regiones FR de una molécula de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos pueden humanizarse usando una diversidad de técnicas conocidas en este campo incluyendo, por ejemplo, injerto de CDR (documentos EPO 239.400; WO 91/09967; y las patentes de EE.UU. 5.225.539;5.530.101; y 5.585.089), recubrimiento o modificación en superficie (EPO 592.106; EPO 519.596; Padlan, Molecular Immunology 28:489 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7:805 (1994); y Roguska et al., Proc Natl Acad Sci USA 91:969 (1994)), e intercambio de cadenas (Patente de Estados Unidos Nº 5.565.332).

Un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos aminoacídicos de una fuente que no es humana. Los restos aminoacídicos no humanos a menudo se denominan restos "importados", que típicamente se toman de un dominio variable "importado". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo los métodos de Winter y colaboradores (Jones et al., Nature 321:522 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323 (1988); y Verhoeyen et al., Science 239:1534 (1988)), utilizando CDR no humanas o partes de secuencias de CDR en lugar de las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Por consiguiente, estos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados típicamente son anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos de FR se sustituyen desde sitios análogos en anticuerpos de roedores. La región constante de la cadena pesada y la región de bisagra pueden proceder de cualquier clase o subclase para obtener el efecto deseado, tal como una función efectora particular.

A menudo, los restos flanqueantes en las regiones flanqueantes humanas pueden sustituirse por el resto correspondiente del anticuerpo donador de CDR para alterar, y posiblemente mejorar, la unión a antígenos. Las sustituciones flanqueantes se identifican por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, por modelado de las interacciones de la CDR y los restos flanqueantes para identificar restos flanqueantes importantes para la unión a antígenos y la comparación de secuencias para identificar restos flanqueantes inusuales en posiciones particulares, véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 5.585.089; y Riechmann et al., Nature 332:323 (1988).

Además es preferible que los anticuerpos humanizados retengan alta afinidad por IL-4 y/o IL-13, y retengan o adquieran otras propiedades biológicas favorables. De esta manera, los anticuerpos humanizados se preparan por un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parental y humanizada. Los modelos tridimensionales de las inmunoglobulinas están disponibles comúnmente y los especialistas en la técnica estarán familiarizados con estos métodos. Se dispone de programas informáticos que ilustran y presentan probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de las presentaciones permite el análisis del papel probable de ciertos residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a IL-4 y/o a IL-13. De esta manera, pueden seleccionarse y combinarse restos de FR procedentes del receptor y secuencias de importación de manera que se maximice la característica del anticuerpo deseada, tal como una mayor afinidad por el antígeno diana, aunque son los restos de la CDR los que influyen de manera más directa y más sustancial sobre la unión a IL-4 o IL-13. Las regiones CDR también pueden modificarse para contener uno o más aminoácidos que varían del obtenido del anticuerpo parental a partir del cual se obtuvo la CDR, para proporcionar propiedades de interés mejores o diferentes, tales como unión de mayor afinidad o mayor avidez, por ejemplo.

Ciertas partes de las regiones constantes de un anticuerpo pueden manipularse y cambiarse para proporcionar homólogos, derivados, fragmentos de anticuerpo y similares con propiedades diferentes o mejores que las observadas en el anticuerpo parental. De esta manera, por ejemplo, muchos anticuerpos IgG4 forman enlaces disulfuro intracatenarios cerca de la región de bisagra. El enlace intracatenario puede desestabilizar la molécula bivalente parental formando moléculas monovalentes que comprenden una cadena pesada con la cadena ligera asociada. Estas moléculas pueden reasociarse, pero en una base aleatoria.

Se observó que modificando aminoácidos de la región de bisagra de moléculas de IgG4 se puede reducir la probabilidad de formación de enlaces intracatenarios, estabilizando de esta manera la molécula de IgG4, lo cual minimizará la probabilidad de formar moléculas biespecíficas. Esa modificación será beneficiosa si un anticuerpo terapéutico es una molécula de IgG4, ya que la mayor estabilidad minimizará la probabilidad de que la molécula se disocie durante la producción y fabricación, así como *in vivo*. Un anticuerpo monovalente puede no tener la misma eficacia que la molécula parental bivalente. Por ejemplo, cuando se administra la IgG4 bivalente a un paciente, el porcentaje de IgG4 bivalente se reduce a aproximadamente 30% durante un periodo de dos semanas. Una sustitución de un aminoácido en la posición 228 aumenta la estabilidad de IgG4. La serina que reside en la posición 228 puede reemplazarse por otro aminoácido, tal como uno de los 19 aminoácidos restantes. Este cambio puede hacerse particularmente con anticuerpos recombinantes en los que la secuencia de ácido nucleico codificante puede mutarse para producir un aminoácido de reemplazo en la posición 228. Por ejemplo, la S puede reemplazarse por una prolina.

Otra serie de aminoácidos adecuados para la modificación incluyen aminoácidos en el área de la bisagra que afectan a la unión de una molécula que contiene una cadena pesada con la unión al receptor de Fc y la internalización de la molécula de anticuerpo. Estos aminoácidos incluyen, en moléculas IgG1, los restos de aproximadamente 233 a aproximadamente 237 (Glu-Leu-Leu-Gly-Gly); (SEC ID Nº:49) de aproximadamente 252 a aproximadamente 256 (Met-Ile-Ser-Arg-Thr) (SEC ID Nº:50) y de aproximadamente 318 (Glu) a aproximadamente 331 (Pro), incluyendo, por ejemplo, Lys_{320}, Lys_{322} y Pro_{329}

Son particularmente convenientes los anticuerpos completamente humanos para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos pueden obtenerse por una diversidad de métodos conocidos en la técnica, incluyendo métodos de presentación en fagos descritos anteriormente usando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana, véanse las Patentes de Estados Unidos Nº 4.444.887 y 4.716.111; y los documentos WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741. También están disponibles la técnicas de Cole et al. y Boerner et al. para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss (1985); y Boerner et al., J Immunol 147:86 (1991)).

También pueden producirse anticuerpos humanos usando ratones transgénicos que no pueden expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que también expresan ciertos genes de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, los complejos de genes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina humana pueden introducirse aleatoriamente o por recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Como alternativa, la región variable humana, la región constante y la región de diversidad pueden introducirse en células madre embrionarias de ratón, además de los genes de cadena ligera y pesada humana. Los genes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina de ratón pueden hacerse no funcionales por separado o simultáneamente con la introducción de los loci de inmunoglobulina humana por recombinación homóloga. En particular, la deleción homocigota de la región JH impide la producción de anticuerpos endógenos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y se microinyectan en blastocitos para producir ratones quiméricos. Los ratones quiméricos después se reproducen para producir descendientes homocigotos que expresan anticuerpos humanos, véase, por ejemplo, Jakobovitis et al., Proc Natl Acad Sci USA 90:2551 (1993); Jakobovitis et al., Nature 362:255 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol 7:33 (1993); y Duchosal et al., Nature 355:258 (1992)).

Los ratones transgénicos se inmunizan de la manera normal con citoquina IL-4 o IL-13, por ejemplo, todo o parte de IL-4 o IL-13. Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales dirigidos contra IL-4 e IL-13 a partir de los ratones transgénicos inmunizados usando la tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados por los ratones transgénicos se reordenan durante la diferenciación de linfocitos B, y posteriormente experimentan mutación por cambio de clase y somática. De esta manera, usando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Como visión de conjunto, véase Lonberg et al., Int Rev Immunol 13:65-93 (1995). Como descripción de la producción de anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y de protocolos para producir dichos anticuerpos, véanse, por ejemplo, los documentos WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; y WO 96/33735; EPO No. 0 598 877; y las patentes de EE.UU. Nos. 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; 5.885.793; 5.916.771; y 5.939.598. Además, puede contratarse a compañías tales como Amgen (Fremont, CA), Genpharm (San Jose, CA) y Medarex, Inc. (Princeton, NJ) para que proporcionen anticuerpos humanos dirigidos contra IL-4 y/o IL-13 usando una tecnología similar a la descrita anteriormente.

Además, podrían obtenerse mAb humanos inmunizando ratones en los que se han trasplantado leucocitos de sangre periférica, esplenocitos o médula ósea de origen humano (por ejemplo, por la técnica de trioma de XTL Biopharmaceuticals, Israel). Pueden generarse anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítopo seleccionado usando una técnica denominada "selección guiada." En esta estrategia, se usa un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítopo (Jespers et al., Bio/technology 12:899 (1988)).

Cuando se usan técnicas recombinantes, la variante de anticuerpo puede producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente al medio. Si la variante de anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa, pueden retirarse los desechos en forma de partículas, las células hospedadoras o los fragmentos lisados, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., Bio/Technology 10:163 (1992) describe un procedimiento para aislar anticuerpos que se segregan al espacio periplásmico de E. coli. En resumen, la pasta celular se expone a acetato de sodio (pH 3,5) and EDTA. El desecho celular puede retirarse por centrifugación. Cuando se secreta al medio la variante de anticuerpo, el sobrenadante de estos sistemas de expresión generalmente primero se concentra usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasa tal como PMSF para inhibir la proteolisis, y pueden incluirse antibióticos para impedir el crecimiento de contaminantes extraños.

La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad. La idoneidad de la proteína A o la proteína G como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio de Fc de inmunoglobulina que esté presente en la variante de anticuerpo. Puede usarse proteína A para purificar anticuerpos

que se basan en cadenas pesadas de IgG1, IgG2 o IgG4 humanas (Lindmark et al., J Immunol Meth 62:1 (1983)). Puede usarse proteína G para isotipos de ratón y para IgG3 humana (Guss et al., EMBO J 5:1567 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad la mayoría de las veces es agarosa, pero se dispone de otras matrices. Las matrices estables mecánicamente, tales como el vidrio de poros controlados o poli(estirenodivinil)benceno, permiten flujos más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden conseguirse con agarosa. Cuando la variante de anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABXTM (JT Baker; Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. También se dispone de otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina agarosa en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatoenfoque, SDS-PAGE y precipitación con sulfato amónico, dependiendo del anticuerpo o la variante a recuperar.

Después de cualquier etapa de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo o la variante de interés y los contaminantes puede someterse a cromatografía de interacción hidrófoba de bajo pH usando un tampón de elución a un pH comprendido entre aproximadamente 2,5 y 4,5, preferiblemente realizada a baja concentración de sal (por ejemplo, una concentración de sal de aproximadamente 0-0,25 M).

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos pueden ser monoclonales, preferentemente anticuerpos humanos o humanizados, anticuerpos que presentan especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En una realización preferida, el anticuerpo biespecífico, su fragmento y demás, presentan especificidades de unión dirigidas a IL-4 e IL-13.

Los métodos para obtener anticuerpos biespecíficos son bien conocidos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein et al., Nature 305:537 (1983)). Debido al surtido aleatorio de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, los hibridomas (cuadromas) producen una posible mezcla de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta normalmente se realiza por etapas de cromatografía de afinidad. Se describen procedimientos similares en el documento WO 93/08829 y en Traunecker et al., EMBO J 10:3655 (1991). Se proporcionan otros métodos para obtener anticuerpos biespecíficos, por ejemplo, en Kufer et al., Trends Biotech 22:238-244, 2004.

Pueden fusionarse dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión preferiblemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones de bisagra, CH2 y CH3. Puede ser que la primera región constante de cadena pesada (CH1) contenga el sitio necesario para la unión de cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión distintos y se utilizan para co-transformar un organismo hospedador adecuado. Si se desean más detalles de la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., Meth Enzym 121:210 (1986).

La presente invención también contempla anticuerpos heteroconjugados. Los anticuerpos heteroconjugados se componen de dos anticuerpos unidos covalentemente. Estos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune hacia células indeseadas (Patente de Estados Unidos Nº 4.676.980). Se contempla que los anticuerpos pueden prepararse in vitro usando métodos conocidos en la química de síntesis de proteínas, incluyendo los que implican agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o por medio de la formación de un enlace tioéster. Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato, y los descritos, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Nº 4.676.980.

Además, se pueden generar anticuerpos de un solo dominio contra IL-4 y/o IL-13. Se han descrito ejemplos de esta tecnología en el documento WO9425591 para anticuerpos derivados de la cadena pesada de Ig de camélidos, así como en el documento US20030130496 que describe el aislamiento de anticuerpos completamente humanos de un solo dominio procedentes de bibliotecas de fagos.

Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (patente de EE.UU. No. 4.946.778; Bird, Science 242:423 (1988); Huston et al., Proc Natl Acad Sci USA 85:5879 (1988); y Ward, et al., Nature 334:544 (1989)) para producir anticuerpos monocatenarios. Los anticuerpos monocatenarios se forman por unión de los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv a través de un enlace de aminoácido, dando como resultado un polipéptido de una sola cadena. También pueden usarse técnicas para el ensamblaje de fragmentos Fv funcionales en E. coli (Skerra et al., Science 242:1038 (1988)).

La presente invención incluye anticuerpos fusionados de manera recombinante o conjugados químicamente (incluyendo tanto conjugaciones covalentes como conjugaciones no covalentes) a un polipéptido. Pueden usarse anticuerpos fusionados o conjugados de la presente invención para facilitar la purificación, véanse, por ejemplo, los documentos WO 93/21232; EP 439.095; Naramura et al., Immunol Lett 39:91 (1994); patente de EE.UU. No. 5.474.981; Gillies et al., Proc Natl Acad Sci USA 89:1428 (1992); y Fell et al., J Immunol 146:2446 (1991). La

secuencia de aminoácidos marcadora puede ser un péptido de hexahistidina, tal como el marcador proporcionado en un vector pQE (QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA), entre otros, de los que muchos están disponibles en el mercado, Gentz et al., Proc Natl Acad Sci USA 86:821 (1989). Otros marcadores de péptidos útiles para la purificación incluyen, pero sin limitación, el marcador "HA", que corresponde a un epítopo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson et al., Cell 37:767 (1984)) y el denominado marcador "flag".

También se pueden crear moléculas de unión de una sola cadena peptídica en las que están conectadas las regiones Fv de cadena pesada y ligera. Se describen anticuerpos monocatenarios ("scFv") y el método de su construcción, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Nº 4.946.778. Como alternativa, pueden construirse y expresarse Fab por medios similares. Todos los anticuerpos completa y parcialmente humanos pueden ser menos inmunogénicos que los anticuerpos monoclonales completamente murinos, y los fragmentos y anticuerpos monocatenarios también pueden ser menos inmunogénicos.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo pueden aislarse a partir de bibliotecas de fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty et al., Nature 348:552 (1990). Clarkson et al., Nature 352:624 (1991) y Marks et al., J Mol Biol 222:581 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Las publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) por intercambio de cadenas (Marks et al., Bio/Technology 10:779 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación in vivo como una estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse et al., Nucl Acids Res 21:2265 (1993)). De esta manera, las técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma de anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos anti-IL-4 y/o IL-13 candidatos se ensayan por medio de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), FACS, inmunotransferencia de Western u otras técnicas inmunoquímicas conocidas en la técnica.

Para determinar si un homólogo de anticuerpo particular se une a la IL-4 y/o IL-13 humana, puede usarse cualquier ensayo de unión convencional. Los ensayos de unión a IL-4 e IL-13 incluyen análisis FACS, ensayos ELISA, resonancia de plasmón superficial (Biacore), radioinmunoensayos y similares, que detectan la unión de un anticuerpo y las funciones resultantes de dicha unión, a la IL-4 y/o IL-13 humanas. En estos ensayos son útiles formas de longitud completas y solubles de la IL-4 e IL-13 humanas enseñadas en la presente memoria. La unión de un anticuerpo u homólogo a IL-4 y/o IL-13, o a fragmentos solubles de las mismas, puede detectarse de manera conveniente por medio del uso de un segundo anticuerpo específico para inmunoglobulinas de la especie de la que procede el anticuerpo u homólogo.

Para determinar si un anticuerpo particular u homólogo bloquea o no de forma significativa la unión a IL-4 y/o IL-13, puede usarse cualquier ensayo de competición adecuado. Los ensayos útiles incluyen, por ejemplo, ensayos ELISA, ensayos FACS, radioinmunoensayos y similares que cuantifican la capacidad del anticuerpo o del homólogo de competir con la IL-4 y/o la IL-13. Preferiblemente, se mide la capacidad de un ligando de bloquear la unión de la IL-4 y/o IL-13 humana marcada al anticuerpo u homólogo inmovilizado.

Los anticuerpos descritos en este documento pueden describirse o especificarse en términos del epítopo o epítopos o de la parte o partes de la IL-4 y/o la IL-13 que reconocen el anticuerpo o a las que se unen específicamente. El epítopo o epítopos o la parte o partes de polipéptido pueden especificarse como se describe en la presente memoria, por ejemplo, por las posiciones N-terminal y C-terminal, por tamaño en restos aminoacídicos contiguos, epítopos conformacionales y similares.

Los anticuerpos descritos en este documento también pueden describirse o especificarse en términos de reactividad cruzada. También se incluyen en la presente invención anticuerpos que se unen a polipéptidos de IL-4 y/o IL-13, que tienen una identidad de al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 65%, al menos 60%, al menos 55% y al menos 50% (calculada usando métodos conocidos en la técnica y descritos en este documento) con la IL-4 y/o la IL-13.

Los anticuerpos descritos en este documento también se pueden describir o especificarse en términos de afinidad de unión a IL-4 y/o IL-13. Los anticuerpos anti-IL-4 y/o anti-IL-13 se pueden unir con un KD de menos de aproximadamente 10-7 M, menos de aproximadamente 10-6 M, o menos de aproximadamente 10-5 M. Afinidades de unión más elevadas en un anticuerpo de interés pueden ser beneficiosas, tales como aquellas con una constante de equilibrio de disociación o KD desde aproximadamente 10-8 a aproximadamente 10-15 M, de aproximadamente 10-8 a aproximadamente 10-12 M, de aproximadamente 10-9 a aproximadamente 10-11 M, o de aproximadamente 10-8 a aproximadamente 10-10 M. La presente descripción también proporciona anticuerpos que inhiben competitivamente la unión de un anticuerpo a un epítopo descritos en este documento tal como se determina mediante cualquier método conocido en la técnica para determinar la unión competitiva, por ejemplo, los inmunoensayos descritos en la presente memoria. En realizaciones preferidas, el anticuerpo inhibe competitivamente la unión al epítopo en al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 60% o al menos 50%.

La presente descripción también incluye conjugados que comprenden un anticuerpo de interés. Los conjugados comprenden dos componentes primarios, un anticuerpo de interés y un segundo componente, que puede ser un agente de unión a las células, un agente citotóxico y similares.

Como se usa en la presente memoria, la expresión “agente de unión a las células” se refiere a un agente que reconoce específicamente y se une a una molécula en la superficie de la célula. De esta manera, el agente de unión a las células puede ser un antígeno CD, un antígeno de patógeno, tal como un antígeno de virus, un antígeno de diferenciación, un antígeno de cáncer, un antígeno con especificidad de célula, un antígeno con especificidad de tejido, una molécula Ig o de tipo Ig y similares.

Los agentes de unión a las células pueden ser de cualquier tipo conocido actualmente, o que se está conociendo, e incluyen péptidos, no péptidos, sacáridos, ácidos nucleicos, ligandos, receptores y similares, o combinaciones de los mismos. El agente de unión a las células puede ser cualquier compuesto que puede unirse a una célula, de una manera específica o no específica. Generalmente, el agente puede ser un anticuerpo (especialmente anticuerpos monoclonales), linfoquinas, hormonas, factores de crecimiento, vitaminas, moléculas de transporte de nutrientes (tales como transferrina), o cualquier otra molécula o sustancia que se una a las células.

Otros ejemplos de agentes de unión a las células que pueden usarse incluyen: anticuerpos policlonales; anticuerpos monoclonales; y fragmentos de anticuerpos tales como Fab, Fab', F(ab')2 y Fv (Parham, J. Immunol. 131:2895-2902 (1983); Spring et al., J. Immunol. 113:470-478 (1974); y Nisonoff et al., Arch. Biochem. Biophys. 89: 230 -244 (1960)).

El segundo componente también puede ser un agente citotóxico. El término “agente citotóxico” como se usa en este documento se refiere a una sustancia que reduce o bloquea la función, o crecimiento, de las células y/o produce la destrucción de las células. De esta manera, el agente citotóxico puede ser un taxol, a maitansinoide tal como DM1 o DM4, CC-1065 o un análogo de CC-1065, una ricina, mitomicina C y similares. En algunas realizaciones, el agente citotóxico, como ocurre con cualquier agente de unión de un conjugado de la presente descripción, se une covalentemente, directamente o a través de un enlazador escindible o no escindible, a un anticuerpo de interés.

Los ejemplos de maitansinoides adecuados incluyen maitansinol y análogos de maitansinol. Los maitansinoides inhiben la formación de microtúbulos y son muy tóxicos para las células de mamífero.

Los ejemplos de análogos de maitansinol adecuados incluyen aquellos que tienen un anillo aromático modificado y aquellos que tienen modificaciones en otras posiciones. Tales maitansinoides adecuados se describen en las patentes de EE.UU. Nos. 4.424.219; 4.256.746; 4.294.757; 4.307.016; 4.313.946; 4.315.929; 4.331.598; 4.361.650; 4.362.663; 4.364.866; 4.450.254; 4.322.348; 4.371.533; 6.333.410; 5.475.092; 5.585.499; y 5.846.545.

Los ejemplos de análogos adecuados de maitansinol que tienen un anillo aromático modificado incluyen: (1) C-19-descloro (Patente de Estados Unidos Nº 4.256.746) (preparado, por ejemplo, por reducción con LAH de ansamitocina P2); (2) C-20-hidroxi (o C-20-desmetil) +/- C-19-descloro (Patentes de Estados Unidos Nº 4.361.650 y 4.307.016) (preparado, por ejemplo, por desmetilación usando Streptomyces o Actinomyces o descloración usando hidruro de litio y aluminio (LAH)); y (3) C-20-desmetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/-descloro (Patente de Estados Unidos Nº 4.294.757) (preparado por acilación usando cloruros de acilo).

Los ejemplos de análogos adecuados de maitansinol que tienen modificaciones de otras posiciones incluyen: (1) C-9-SH (Pat. de EEUU No. 4.424.219) (preparado por la reacción de maitansinol con H2S o P2S5); (2) C-14-alcoximetil (desmetoxi/CH2OR) (Pat. de EEUU No. 4.331.598); (3) C-14-hidroximetil o aciloximetil (CH2OH o CH2OAc) (Pat. de EEUU No. 4.450.254) (preparado de Nocardia); (4) C-15-hidroxi/aciloxi (Patente de Estados Unidos Nº 4.364.866) (preparado mediante la conversión de maitansinol por Streptomyces); (5) C-15-metoxi (Pat. de EE.UU. Nos. 4.313.946 y 4.315.929) (aislado de Trewia nudiflora); (6) C-18-N-desmetil (Patentes de Estados Unidos Nº 4.362.663 y 4.322.348) (preparado mediante la desmetilación de maitansinol por Streptomyces); y (7) 4,5-desoxi (patente de Estados Unidos Nº 4.371.533) (preparado por la reducción con tricloruro de titanio/LAH de maitansinol).

Los conjugados citotóxicos se pueden preparar mediante métodos *in vitro*. Para unir un agente citotóxico, fármaco o profármaco al anticuerpo, comúnmente se usa un grupo de unión. Los grupos de unión adecuados son conocidos en la técnica e incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles a ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles a peptidasas y grupos lábiles a esterasas. Por ejemplo, pueden construirse conjugados usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter entre un anticuerpo de interés y el fármaco o profármaco.

Como se ha descrito anteriormente, la presente descripción proporciona secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican un anticuerpo o su fragmento funcional tal como se describe en el presente documento, construcciones de vectores que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifican la porción de unión IL-13 del anticuerpo o de su fragmento funcional de la presente invención, células hospedadoras que comprenden dicho vector, y técnicas recombinantes para la producción del polipéptido.

El vector normalmente contiene componentes conocidos en la técnica y generalmente incluye, pero sin limitación, uno o más de los siguientes elementos: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores

o de selección, secuencias que facilitan y/o mejoran la traducción, un elemento potenciador y similares. De esta manera, los vectores de expresión incluyen una secuencia de nucleótidos unida de manera funcional a dichas secuencias de nucleótidos reguladoras de la transcripción o la traducción adecuadas tales como las derivadas de genes de mamífero, microbianos, virales o de insecto. Los ejemplos de secuencias reguladoras adicionales incluyen operadores, sitios de unión a ribosomas de ARNm, y/u otras secuencias apropiadas que controlan la transcripción y la traducción, tales como la iniciación y la terminación. Las secuencias de nucleótidos están "unidas de manera funcional" cuando la secuencia reguladora está relacionada funcionalmente con la secuencia de nucleótidos para el polipéptido apropiado. De esta manera, una secuencia de nucleótidos promotora está unida operativamente a, por ejemplo, la secuencia de la cadena pesada de anticuerpo si la secuencia promotora controla la transcripción de esa secuencia de nucleótidos.

Además, en los vectores de expresión pueden incorporarse secuencias que codifican péptidos señal apropiados que no están asociados de manera natural con las secuencias de cadena pesada y/o ligera de anticuerpo. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos para un péptido señal (líder de secreción) puede fusionarse en fase con la secuencia polipeptídica de manera que el anticuerpo se secrete en el espacio periplásmico o al medio. Un péptido señal que es funcional en la célula hospedadora deseada aumenta la secreción extracelular del anticuerpo apropiado o de una parte del mismo. El péptido señal puede escindirse del polipéptido tras la secreción del anticuerpo por la célula. Los ejemplos de estas señales de secreción son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, los descritos en las Patentes de Estados Unidos Nº 5.698.435; 5.698.417; y 6.204.023.

El vector puede ser un plásmido, un vector viral monocatenario o bicatenario, un ARN monocatenario o bicatenario o un vector de fago de ADN, un fagémido, un cósmido o cualquier otro vehículo de un transgén de interés. Estos vectores pueden introducirse en las células como polinucleótidos por técnicas bien conocidas para introducir ADN o ARN en las células. Los vectores, en el caso de los vectores de fago y virales, también pueden introducirse en las células como virus empaquetados o encapsulados por técnicas bien conocidas para infección y transducción. Los vectores virales pueden ser competentes para la replicación o defectuosos para la replicación. En este último caso, generalmente sólo tendrá lugar la propagación viral en la complementación de células hospedadoras y en el uso de vectores plurales que llevan los diversos componentes de virus necesarios para producir una partícula. También pueden emplearse sistemas de traducción sin células para producir la proteína usando ARN derivados de las presentes construcciones de ADN (véanse, por ejemplo, los documentos WO 86/05807 y WO 89/01036; y la Patente de Estados Unidos Nº 5.122.464).

Los anticuerpos de la presente invención pueden expresarse en cualquier célula hospedadora adecuada. Los ejemplos de células hospedadoras útiles en la presente invención incluyen células procariotas, levaduras o células eucariotas superiores e incluyen, pero sin limitación, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, E. coli, B. subtilis, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, Serratia y Shigella, así como bacilos, Pseudomonas y Streptomyces) transformadas con vectores de ADN de bacteriófago, ADN plasmídico o ADN cosmídico que contienen las secuencias codificantes de anticuerpo de interés; levaduras (por ejemplo, Saccharomyces, Pichia, Actinomycetes, Kluyveromyces, Schizosaccharomyces, Candida, Trichoderma, Neurospora y hongos filamentosos tales como Neurospora, Penicillium, Tolypocladium y Aspergillus) transformados con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias codificantes de anticuerpo; sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, Baculovirus) que contienen secuencias codificantes de anticuerpo; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, el virus del mosaico de la coliflor, CaMV; o virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, el plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpo; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293 o 3T3) que llevan construcciones de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; o el promotor 7.5K del virus vaccinia).

Los vectores de expresión para uso en células hospedadoras procariotas generalmente comprenden uno o más genes marcadores de selección fenotípicos. Un gen marcador de selección fenotípico es, por ejemplo, un gen que codifica una proteína que confiere resistencia a antibióticos o que proporciona un requisito autotrófico. Los ejemplos de vectores de expresión útiles para células hospedadoras procariotas incluyen los derivados de plásmidos disponibles en el mercado tales como pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia), pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI), pET (Novagen, Madison, WI) y la serie de vectores pRSET (Invitrogen, Carlsbad, CA) (Studier, J Mol Biol 219:37 (1991); y Schoepfer, Gene 124:83 (1993)). Las secuencias promotoras usadas comúnmente para vectores de expresión de células hospedadoras procariotas recombinantes incluyen el sistema promotor de T7, (Rosenberg et al., Gene 56:125 (1987)), de β-lactamasa (penicilinasa) y de lactosa (Chang et al., Nature 275:615 (1978); y Goeddel et al., Nature 281:544 (1979)), el sistema promotor de triptófano (trp) (Goeddel et al., Nucl Acids Res 8:4057 (1980)), y el promotor tac (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1990)).

Los vectores de levadura a menudo contendrán una secuencia de origen de replicación, tal como el del plásmido de levadura 2μ, una secuencia de replicación autónoma (ARS), una región promotora, secuencias de poliadenilación, secuencias para la terminación de la transcripción y un gen marcador de selección. Las secuencias promotoras adecuadas para los vectores de levadura incluyen, entre otras, promotores para metalotioneína, 3-fosfoglicerato

quinasa (Hitzeman et al., J Biol Chem 255:2073 (1980)) u otras enzimas glicolíticas (Holland et al., Biochem 17:4900 (1978)) tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa. Se describen otros vectores y promotores adecuados para uso en la expresión en levaduras en Fleer et al., Gene 107:285 (1991). Otros promotores y vectores adecuados para levaduras y para los protocolos de transformación de levaduras son bien conocidos en la técnica. Los protocolos de transformación de levaduras son bien conocidos. Uno de estos protocolos se describe por Hinnen et al., Proc Natl Acad Sci 75:1929 (1978), que selecciona transformantes Trp+ en un medio selectivo.

Se puede utilizar cualquier cultivo de células eucariotas, ya sea un cultivo de células de vertebrados o de invertebrados. Ejemplos de células invertebradas incluyen células de insectos y plantas (Luckow et al., Bio/Technology 6:47 (1988); Miller et al., Genetic Engineering, Setlow et al., eds., vol. 8, págs. 277-9, Plenum Publishing (1986); y Maeda et al., Nature 315:592 (1985)). Por ejemplo, pueden usarse sistemas de Baculovirus para la producción de proteínas heterólogas. En un sistema de insecto, puede usarse el virus de la polihedrosis nuclear de Autographa californica (AcNPV) como vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de Spodoptera frugiperda. La secuencia codificante de anticuerpo puede clonarse bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de la polihedrina). Otros hospedantes que se han identificado incluyen Aedes, Drosophila melanogaster y Bombyx mori. La variedad EsA de cepas virales para transfección están disponibles al público , por ejemplo, la variante L-1 de AcNPV y la cepa Bm-5 de Bombyx mori NPV. Además, también pueden utilizarse como hospedadores cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco, como se conoce en la técnica.

Las células de vertebrados y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejidos) pueden ser un procedimiento rutinario, aunque existen líneas de células más delicadas que requieren, por ejemplo, un medio especializado con factores únicos, células de alimentación y similares, véase Tissue Culture, Kruse et al., eds., Academic Press (1973). Son ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamífero útiles riñón de mono; línea de riñón embrionario humano; células de riñón de cría de hámster; células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc Natl Acad Sci USA 77:4216 (1980)); células de sertoli de ratón; células de carcinoma cervical humano (por ejemplo, HeLa); células de riñón de perro; células de pulmón humano; células hepáticas humanas; tumor mamario de ratón; y células NSO.

Las células hospedadoras se transforman con vectores para la producción de anticuerpo y se cultivan en medio nutriente convencional que contiene factores de crecimiento, vitaminas, minerales y similares, así como inductores apropiados para las células y los vectores usados. Las secuencias promotoras y secuencias potenciadoras usadas comúnmente proceden del virus de polioma, Adenovirus 2, virus de simio 40 (SV40) y citomegalovirus humano (CMV). Pueden usarse secuencias de ADN derivadas del genoma viral de SV40 para proporcionar otros elementos genéticos para la expresión de una secuencia de gen estructural en una célula hospedadora de mamífero, por ejemplo, el origen de SV40, promotor temprano y tardío, potenciador, sitios de corte y empalme y poliadenilación. Los promotores tempranos y tardíos virales son particularmente útiles porque se obtienen fácilmente a partir de un genoma viral como un fragmento que también puede contener un origen de replicación viral. Están disponibles en el mercado vectores de expresión ejemplares para uso en células hospedadoras de mamífero.

Para el cultivo de las células hospedadoras son adecuados medios disponibles en el mercado tales como medio F10 de Ham, Medio Esencial Mínimo (MEM), RPMI-1640 y Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., Meth Enzymol 58:44 (1979) y Barnes et al., Anal Biochem 102:255 (1980), y en las Patentes de Estados Unidos Nº 4.767.704; 4.657.866; 4.560.655; 5.122.469; 5.712.163; o 6.048.728 puede usarse como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede suplementarse cuando sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruros, tales como cloruro de sodio, calcio o magnesio; y fosfatos), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos, oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos presentes normalmente a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. Puede incluirse cualquier otro suplemento necesario a las concentraciones apropiadas, según la elección del diseño. Las condiciones de cultivo tales como la temperatura, el pH y similares, son las conocidas en la técnica apropiada para la célula y las que permiten la expresión deseada del transgén.

Los polinucleótidos de interés pueden obtenerse, y la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos determinarse, por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, si se conoce la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, puede ensamblarse un polinucleótido que codifica el anticuerpo a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (por ejemplo, como se describe en Kutmeier et al., Bio/Techniques 17:242 (1994)) y después pueden amplificarse los oligonucleótidos ligados, por ejemplo, por PCR.

Como alternativa, un polinucleótido que codifica un anticuerpo puede generarse a partir de un ácido nucleico de una célula que lo expresa. Si no se dispone de un clon que contiene un ácido nucleico que codifica un anticuerpo particular, pero se conoce la secuencia de la molécula de anticuerpo, puede obtenerse un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina a partir de una fuente adecuada, tal como una biblioteca, que puede ser una específica para las células productoras de anticuerpo, tales como células de hibridoma seleccionadas para expresar un

anticuerpo de la invención. Pueden configurarse cebadores adecuados para la amplificación por PCR. Los ácidos nucleicos amplificados generados por PCR después pueden clonarse en vectores de clonación replicables usando cualquier método bien conocido en la técnica.

Una vez que se han determinado la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente del anticuerpo, la secuencia de nucleótidos del anticuerpo puede manipularse para obtener los equivalentes de interés descritos en la presente memoria usando métodos conocidos en la técnica para la manipulación de secuencias de nucleótidos, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida, PCR etc. (véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1990); y Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1998) para generar anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo, para crear sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos.

La secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada y/o de cadena ligera puede inspeccionarse para identificar las secuencias de las CDR por métodos bien conocidos, por ejemplo, por comparación con secuencias de aminoácidos conocidas de otras regiones variables de cadena pesada y ligera para determinar las regiones de hipervariabilidad de secuencia. Usando las técnicas rutinarias de ADN recombinante, una o más de las CDR se pueden insertar dentro de las regiones marco, por ejemplo, en regiones marco humanas para humanizar un anticuerpo no humano, como se describe más arriba. El polinucleótido de interés generado por la combinación de las regiones marco y una o más CDR codifica un anticuerpo que se une específicamente a IL-4 y/o IL-13, o al menos al dominio ED del mismo. Por ejemplo, estos métodos pueden usarse para realizar sustituciones o deleciones de aminoácidos de uno o más restos de cisteína de la región variable que participan en un enlace disulfuro intracatenario para generar moléculas de anticuerpo que carecen de uno o más enlaces disulfuro intracatenarios.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención detectan la IL-13, y por lo tanto a las células que expresan IL-13, en una muestra biológica *in vitro* o *in vivo*. En una realización, el anticuerpo IL-13 de la invención se usa para determinar la presencia y el nivel de IL-13 en un tejido o en células procedentes del tejido. Los niveles de IL-13 en el tejido o biopsia pueden determinarse, por ejemplo, en un inmunoensayo con los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención. El tejido o la biopsia de éste puede ser congelado o fijado. Pueden usarse los mismos o distintos métodos para determinar otras propiedades de IL-13, tales como el nivel, la localización celular, los niveles de ARNm, sus mutaciones y similares.

El método descrito anteriormente puede usarse, por ejemplo, para diagnosticar un cáncer en un sujeto que se sabe o que se sospecha que tiene un cáncer, donde el nivel de IL-13 medido en dicho paciente se compara con el de un sujeto de referencia normal o patrón. El ensayo de interés también puede usarse para diagnosticar artritis u otra enfermedad autoinmune caracterizada por infiltración y concentración de células B, junto con el desarrollo de tejido linfoide diferenciado.

La presente invención proporciona además anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados y fragmentos de unión a epítopos de los mismos como se define en las reivindicaciones anejas, que están marcados adicionalmente para uso en aplicaciones de investigación o diagnóstico. En algunas realizaciones, el marcador es un radiomarcador, un fluoróforo, un cromóforo, un agente de formación de imágenes o un ión metálico.

También se proporciona un método de diagnóstico en el que dichos anticuerpos marcados o sus fragmentos de unión a epítopo se administran a un sujeto que se sospecha que tiene un cáncer, artritis, enfermedades autoinmunes u otra enfermedad mediada por IL-4 y/o IL-13, y se mide o se controla la distribución del marcador dentro del cuerpo del sujeto.

El anticuerpo y los fragmentos del mismo de la presente invención pueden usarse como agentes de purificación por afinidad. En este proceso, los anticuerpos se inmovilizan en una fase sólida, tal como una resina de dextrano o de agarosa o papel de filtro, usando métodos conocidos en la técnica. El anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene IL-4 y/o IL-13 o con células que las llevan a purificar, y posteriormente el soporte se lava con un disolvente adecuado que retirará sustancialmente todo el material de la muestra excepto la IL-4 y/o IL-13 o la célula a purificar, que se une al anticuerpo inmovilizado de interés. Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente adecuado tal como tampón glicina, a pH 5,0, que liberará la IL-4 y/o IL-13 o la célula del anticuerpo de interés.

Para aplicaciones de diagnóstico, el anticuerpo de interés típicamente se marcará con un marcador detectable. Se dispone de numerosos marcadores que pueden agruparse generalmente en las siguientes categorías: (a) radioisótopos, tales como 36S, 14C, 125I, 3H y 131I (el anticuerpo puede marcarse con el radioisótopo usando técnicas descritas en Current Protocols in Immunology, vol. 12, Coligen et al., ed., Wiley-Interscience, Nueva York (1991), por ejemplo, y la radiactividad puede medirse usando recuento de centelleo); (b) marcadores fluorescentes tales como quelatos de tierras raras (quelatos de europio), fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, lisamina, ficoeritrina y rojo de texas, pudiendo conjugarse los marcadores fluorescentes con el anticuerpo usando una técnica descrita en Current Protocols in Immunology, supra, por ejemplo, donde la fluorescencia puede cuantificarse usando un fluorímetro; y (c) diversos marcadores de sustratos enzimáticos que están disponibles (la Patente de Estados Unidos Nº 4.275.149 proporciona una revisión), catalizando generalmente la enzima una

alteración química del sustrato cromogénico que puede medirse usando diversas técnicas, por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que puede medirse espectrofotométricamente, o la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Se conocen técnicas para cuantificar un cambio en fluorescencia, por ejemplo, usando un luminómetro, o el marcador dona energía a un aceptor fluorescente. Los ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; patente de EE.UU. No. 4,737,456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinodionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa, tales como peroxidasa de rábano (HRPO), fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares. Se describen técnicas para conjugar enzimas a anticuerpos en O'Sullivan et al., Meth Enz, ed. Langone & Van Vunakis, Academic Press, New York, 73 (1981).

Cuando se usan estos marcadores, se dispone de sustratos adecuados, tales como: (i) en el caso de la peroxidasa de rábano picante, se usa hidrógeno peroxidasa como sustrato, donde la hidrógeno peroxidasa oxida un precursor de colorante (por ejemplo, hidrocloruro de ortofenilen diamina (OPD) o 3,3',5,5'-tetrametil bencidina (TMB)); (ii) en el caso de la fosfatasa alcalina (AP), se usa p-nitrofenil fosfato como sustrato cromogénico; y (iii) β-D-galactosidasa (β-D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil-β-D-galactosidasa) o un sustrato fluorogénico tal como 4-metilumbeliferil-β-D-galactosidasa.

Los especialistas en la técnica disponen de otras combinaciones de enzima-sustrato. Como revisión general, véanse las Patentes de Estados Unidos Nº 4.275.149 y 4.318.980.

Algunas veces, el marcador se conjuga indirectamente con el anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con biotina y cualquiera de los indicadores mencionados anteriormente puede conjugarse con avidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a la avidina y, de esta manera, el marcador puede conjugarse con el anticuerpo de esa manera indirecta. Como alternativa, para conseguir la conjugación indirecta del marcador, el anticuerpo se conjuga con un hapteno pequeño (por ejemplo, digoxina) y uno de los diferentes tipos de marcadores o indicadores mencionados anteriormente se conjuga con un anticuerpo anti-digoxina. De esta manera, puede conseguirse la conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo o muteína usando un segundo anticuerpo.

En otra realización de la presente invención, el anticuerpo no necesita marcarse, y su presencia puede detectarse usando un anticuerpo marcado que se une al anticuerpo, otra forma de segundo anticuerpo.

Los anticuerpos de la presente invención pueden emplearse en cualquier método de ensayo conocido tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de sándwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques (CRC Press, Inc. 1987).

Los ensayos de unión competitiva se basan en la capacidad de un patrón marcado de competir con la muestra de ensayo por la unión con una cantidad limitada de anticuerpo. La cantidad de antígeno en la muestra de ensayo es inversamente proporcional a la cantidad de patrón que se une a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de patrón que se une, los anticuerpos generalmente se insolubilizan antes o después de la competición. Como resultado, el patrón y la muestra de ensayo que están unidos a los anticuerpos pueden separarse convenientemente del patrón y las muestras de ensayo que permanecen sin unir.

Los ensayos de tipo sándwich implican el uso de dos anticuerpos, siendo cada uno capaz de unirse a una parte inmunogénica diferente, determinante o epítopo, de la diana a detectar. En un ensayo de tipo sándwich, la muestra de ensayo a analizar se une a un primer anticuerpo que se inmoviliza directa o indirectamente en un soporte sólido, y posteriormente un segundo anticuerpo marcado directa o indirectamente se une a la muestra de ensayo unida, formando de esta manera un complejo de tres partes insoluble, véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 4.376.110. El segundo anticuerpo puede estar marcado a su vez con un resto detectable (ensayo de tipo sándwich directo) o puede medirse usando un anticuerpo anti-inmunoglobulina u otro miembro adecuado del par de unión (anticuerpo/antígeno, receptor/ligando, enzima/sustrato, por ejemplo) que está marcado con un resto detectable (ensayo de tipo sándwich indirecto). Por ejemplo, un tipo de ensayo de tipo sándwich es un ensayo ELISA, en cuyo caso el resto detectable es una enzima.

La presente invención también incluye kits, como se define en las reivindicaciones anejas, p. ej. que comprenden un anticuerpo, su fragmento, un conjugado marcado o citotóxico, e instrucciones para el uso del anticuerpo, conjugado para matar tipos de células particulares y similares. Las instrucciones pueden incluir orientaciones para usar el anticuerpo, conjugado y similares *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. El anticuerpo puede estar en forma líquida o como un sólido, generalmente liofilizado. El kit puede contener otros reactivos adecuados tales como un tampón, una solución de reconstitución y otros ingredientes necesarios para el uso deseado. Se contempla una combinación envasada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para su uso, tal como para el uso terapéutico o para realizar un ensayo de diagnóstico. Cuando el anticuerpo está marcado, tal como con una enzima, el kit puede incluir sustratos y cofactores requeridos por la enzima (por ejemplo, un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, pueden incluirse otros aditivos tales como estabilizantes, tampones (por ejemplo, un tampón de bloqueo o un tampón de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden variarse para proporcionar concentrados de una solución de reactivo que proporciona flexibilidad al usuario,

economía de espacio, economía de reactivos y similares. Los reactivos pueden proporcionarse como polvos secos, normalmente liofilizados, incluyendo excipientes, que tras la disolución proporcionan una solución de reactivo que tiene la concentración apropiada.

Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse para tratar a un mamífero. En una realización, el anticuerpo o equivalente de interés se administra a un mamífero no humano con el fin de obtener datos preclínicos, por ejemplo. Los mamíferos no humanos ejemplares a tratar incluyen primates no humanos, perros, gatos, roedores y otros mamíferos en los que se realizan estudios preclínicos. Estos mamíferos pueden ser modelos animales establecidos para una enfermedad a tratar con el anticuerpo, o pueden usarse para estudiar la toxicidad del anticuerpo de interés. En cada una de estas realizaciones, pueden realizarse estudios de aumento de la dosis en el mamífero.

Un anticuerpo con o sin un segundo componente, tal como un resto terapéutico conjugado con el mismo, administrado solo o en combinación con uno o más factores citotóxicos puede usarse como agente terapéutico. Se describen en este documento terapias basadas en anticuerpos que implican la administración de anticuerpos de la invención a un animal, un mamífero o un ser humano, para tratar una enfermedad, trastorno o afección mediada por IL-13.

El término "tratamiento", como se emplea en la presente invención, se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Se refiere a prevenir, curar, revertir, atenuar, aliviar, minimizar, suprimir o interrumpir los efectos perjudiciales de una enfermedad, avance de una enfermedad, agente causal de una enfermedad (p. ej., bacterias o virus) u otra condición anormal.

De esta manera, la invención también incluye anticuerpos polivalentes, que incluyen anticuerpos anti-IL-4/IL-13 biespecíficos, que tienen unidas moléculas efectoras diagnóstica o terapéuticamente funcionales, átomos u otras especies. Por ejemplo, el anticuerpo puede tener agregada una etiqueta diagnóstica radiactiva o un átomo citotóxico radiactivo o especies metálicas o citotóxicas para diagnóstico o terapia del cáncer *in vivo*.

Asimismo, los anticuerpos de acuerdo con la invención se pueden usar en inmunoensayos, en métodos de purificación y en otros métodos en los que se usan inmunoglobulinas o sus fragmentos. Dichos usos son muy conocidos en la técnica.

Por consiguiente, la invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los anti-IL-13 o fragmentos de los mismos de acuerdo con la invención, convenientemente en combinación con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable que son convencionales en la técnica.

La expresión "composición farmacéutica", como se emplea en la presente invención, se refiere a formulaciones de diversas preparaciones. Las formulaciones que contienen cantidades terapéuticamente eficaces de los anticuerpos polivalentes son soluciones líquidas estériles, suspensiones líquidas o versiones liofilizadas y opcionalmente contienen estabilizantes o excipientes.

El término "trastorno", como se usa en la presente invención, se refiere a cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con el anticuerpo de la presente invención. Estos incluyen trastornos o enfermedades crónicas y agudas que incluyen las afecciones patológicas que predisponen al mamífero y en particular a seres humanos, al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitativos de trastornos que se han de tratar mediante la presente invención incluyen cáncer, inflamación, enfermedades autoinmunitarias, infecciones, enfermedades cardiovasculares, enfermedades respiratorias, enfermedades neurológicas y enfermedades metabólicas.

Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse para tratar, curar o prevenir una enfermedad, tal como una enfermedad alérgica, una enfermedad mediada por Th2, una enfermedad mediada por IL-13, y/o una enfermedad mediada por IL-4/IL-13. Los ejemplos de estas enfermedades incluyen enfermedad de Hodgkin, asma, asma alérgica, dermatitis atópica, alergia atópica, colitis ulcerosa, esclerodermia, rinitis alérgica, fibrosis pulmonar idiopática COPD3, rechazo de injerto crónico, fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, fibrosis pulmonar inducida por radiación, granuloma pulmonar, esclerosis sistémica progresiva, esquistosomiasis, fibrosis hepática, cáncer renal, linfoma de Burkitt, enfermedad no Hodgkin, síndrome de Sézary, asma, artritis séptica, dermatitis herpetiforme, urticaria idiopática crónica, colitis ulcerativa, esclerodermia, cicatrización hipertrófica, enfermedad de Whipple, hiperplasia prostática benigna, un trastorno pulmonar en el que interviene la IL-4, una afección en la que interviene una rotura de la barrera epitelial mediada por el receptor de IL-4, un trastorno del sistema digestivo en el que interviene el receptor de IL-4, una reacción alérgica a una medicación, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de células falciformes, síndrome de Churg-Strauss, enfermedad de Grave, preeclampsia, síndrome de Sjogren, síndrome linfoproliferativo autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, esófago de Barrett, uveítis autoinmune, tuberculosis, fibrosis quística, micosis broncopulmonar alérgica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, neumopatía inducida por bleomicina y fibrosis, proteinosis alveolar pulmonar, síndrome de insuficiencia respiratoria en adultos, sarcoidosis, síndrome de hiper IgE, síndrome hipereosinofílico idiopático, una enfermedad autoinmune de formación de ampollas, pénfigo vulgar, penfigoide buloso, miastenia grave, síndrome de fatiga crónica y nefrosis).

La expresión "enfermedad alérgica" se refiere a una patología en la que un paciente está hipersensibilizado y crea una reacción inmunológica contra una sustancia que normalmente no es inmunogénica. La enfermedad alérgica

generalmente se caracteriza por la activación de mastocitos por la IgE que produce una respuesta inflamatoria (por ejemplo, una respuesta local o una respuesta sistémica) que puede tener síntomas tan benignos como moqueo, hasta choque anafiláctico que pone en peligro la vida, y muerte. Los ejemplos de enfermedades alérgicas incluyen, pero sin limitación, rinitis alérgica (por ejemplo, fiebre del heno), asma (por ejemplo, asma alérgica), dermatitis alérgica (por ejemplo, eccema), dermatitis de contacto, alergia alimentaria y urticaria (ronchas).

Como se usa en la presente memoria "enfermedad mediada por Th2" se refiere a una enfermedad en la que la patología se produce (en su totalidad o en parte) por una respuesta inmune (respuesta inmune de tipo Th2) que está regulada por linfocitos Th2 CD4+, que producen de manera característica IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. Una respuesta inmune de tipo Th2 está asociada con la producción de ciertas citoquinas (por ejemplo, IL-4, IL-13) y de ciertas clases de anticuerpos (por ejemplo, IgE), y está asociada con la inmunidad humoral. Las enfermedades mediadas por Th2 se caracterizan por la presencia de niveles elevados de citoquinas Th2 (por ejemplo, IL-4, IL-13) y/o ciertas clases de anticuerpos (por ejemplo, IgE) e incluyen, por ejemplo, enfermedad alérgica (por ejemplo, rinitis alérgica, dermatitis atópica, asma (por ejemplo, asma atópica), enfermedad alérgica de las vías respiratorias (AAD), choque anafiláctico, conjuntivitis), trastornos autoinmunes asociados con niveles elevados de IL-4 y/o IL-13 (por ejemplo, artritis reumatoide, enfermedad de hospedador contra injerto, enfermedad renal (por ejemplo, síndrome nefrítico, nefritis lúpica)), e infecciones asociadas con niveles elevados de IL-4 y/o IL-13 (por ejemplo, infección viral, parasitaria, fúngica (por ejemplo, por C. albicans)). Ciertos cánceres están asociados con niveles elevados de IL-4 y/o IL-13 o están asociados con la proliferación de célula cancerosas inducida por IL-4 y/o IL-13 (por ejemplo, linfoma de células B, linfoma de células T, mieloma múltiple, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama y cáncer de ovario). Estos cánceres pueden tratarse, eliminarse o prevenirse usando el ligando de la invención.

El término "cáncer" como se usa en este documento, se refiere a o describe el estado fisiológico en mamíferos, en particular seres humanos, que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia.

La expresión "enfermedad autoinmunitaria", como se emplea en este documento, se refiere a una enfermedad o trastorno no maligno que surge y se dirige contra los tejidos de una persona. Los ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunitarios incluyen, aunque sin limitarse a ellos, respuestas inflamatorias como enfermedades inflamatorias de la piel, por ejemplo psoriasis y dermatitis; cuadros alérgicos, como eczema y asma; otras afecciones que implican infiltración de células T y respuestas inflamatorias crónicas; aterosclerosis; diabetes mellitus (p. ej., diabetes mellitus de tipo I o diabetes mellitus insulinodependiente; esclerosis múltiple y trastorno inflamatorio del sistema nervioso central (SNC).

Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse como composiciones administradas por separado o junto con otros agentes. Los anticuerpos pueden usarse en terapia combinada con agentes terapéuticos de IL-13 existentes (por ejemplo, agentes de IL-13 existentes tales como anticuerpo anti-IL-13Rαl, IL-4/13 Trap, anti-IL-13) más anticuerpo anti-IL-4 y agentes de IL-4 existentes (por ejemplo, anticuerpo anti-IL-4R, IL-4 Mutein, IL-4/13 Trap) más anticuerpo anti-IL-13 y anticuerpos de IL-4 (por ejemplo, documentos WO05/0076990 (CAT), WO03/092610 (Regeneron), WO00/64944 (Genetic Inst.) y WO2005/062967 (Tanox)).

Los anticuerpos de la presente invención pueden administrarse y/o formularse junto con uno o más agentes terapéuticos o activos adicionales. Cuando un ligando se administra con un agente terapéutico adicional, el ligando puede administrarse antes, simultáneamente con o después de la administración del agente adicional. Generalmente, el ligando y el agente adicional se administran de una manera que proporciona un solapamiento del efecto terapéutico. Los agentes adicionales que pueden administrarse o formularse con el ligando de la invención incluyen, por ejemplo, diversos agentes inmunoterapéuticos tales como ciclosporina, metotrexato, adriamicina o cisplatino, antibióticos, antimicóticos, agentes antivirales e inmunotoxinas. Por ejemplo, cuando el antagonista se administra para prevenir, reprimir o tratar una inflamación pulmonar o una enfermedad respiratoria (por ejemplo, asma), puede administrarse junto con inhibidores de fosfodiesterasa (por ejemplo, inhibidores de fosfodiesterasa 4), broncodilatadores (por ejemplo, agonistas β2, anticolinérgicos, teofilina), beta-agonistas de actuación a corto plazo (por ejemplo, albuterol, salbutamol, bambuterol, fenoter[sigma]l, isoeterina, isoproterenol, leva[iota]buterol, metaproterenol, pirbuterol, terbutalina y tornlate), beta-agonistas de actuación a largo plazo (por ejemplo, formoterol y salmeterol), anticolinérgicos de actuación a corto plazo (por ejemplo, bromuro de ipratropio y bromuro de oxitropio), anticolinérgicos de actuación a largo plazo (por ejemplo, tiotropio), teofilina (por ejemplo, formulación de actuación a corto plazo, formulación de actuación a largo plazo), esteroides inhalados (por ejemplo, beclometasona, beclometasona, budesonida, flunisolida, propionato de fluticasona y triamcinolona), esteroides orales (por ejemplo, metilprednisolona, prednisolona, prednisolon y prednisona), beta agonistas de actuación a corto plazo combinados con anticolinérgicos (por ejemplo, albuterol/salbutamol/ipratopio, y fenoterol/ipratopio), beta-agonistas de actuación a largo plazo combinados con esteroides inhalados (por ejemplo, salmeterol/fluticasona y formolerol/budesonida) y agentes mucolíticos (por ejemplo, erdosteína, acetilcisteína, bromheksina, carbocislcina, guiafencsina y glicerol yodado.

Otros agentes coterapéuticos adecuados que pueden administrarse con un anticuerpo de la presente invención para prevenir, reprimir o tratar el asma (por ejemplo, asma alérgica) incluyen un corticosteroide (por ejemplo, beclometasona, budesonida, fluticasona), cromoglicato, nedocromil, beta-agonistas (por ejemplo, salbutamol, terbutalina, bambuterol, fenoterol, reproterol, tolubuterol, salmeterol, formoterol), zafirlukast, salmeterol, prednisona,

prednisolona, teofilina, zileutron, montelukast, y modificadores de leucotrieno. Los ligandos de la invención pueden coadministrarse con una diversidad de agentes coterapéuticos adecuados para tratar enfermedades (por ejemplo, una enfermedad mediada por Th-2, una enfermedad mediada por YL-A, una enfermedad mediada por IL-13, una enfermedad mediada por IL-4 y cáncer), incluyendo citoquinas, analgésicos/antipiréticos, antieméticos y agentes quimioterapéuticos.

Los anticuerpos de la invención pueden proporcionarse en composiciones farmacéuticamente aceptables conocidas en la técnica o como se describe en la presente memoria. La expresión "fisiológicamente aceptable," "farmacológicamente aceptable" y similares significa aprobado por la agencia reguladora del gobierno federal o de un gobierno estatal o como se indica en la farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea reconocida generalmente para uso en animales y más particularmente en seres humanos.

Los anticuerpos anti-IL-4, anti-IL-13 y anti-IL-4/IL-13 biespecíficos se pueden administrar a un mamífero y en particular a seres humanos, de cualquier manera aceptable. Los métodos de introducción incluyen, pero sin limitación, la vía parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, intranasal, epidural, inhalación y oral, y si se desea para el tratamiento inmunosupresor, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intradérmica, intravenosa, intraarterial o intraperitoneal. Los anticuerpos o composiciones pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en embolada, por absorción a través de los revestimientos epitelial o mucocutáneo (por ejemplo, a través de la mucosa oral, la mucosa rectal e intestinal etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir los anticuerpos o composiciones terapéuticas de la invención en el sistema nervioso central por cualquier vía adecuada, incluyendo inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede facilitarse por medio de un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito Ommaya. Además, el anticuerpo se administra convenientemente por infusión pulsátil, particularmente con dosis decrecientes del anticuerpo. Preferiblemente, la dosificación se administra por inyección, preferiblemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo, en parte, de si la administración es breve o crónica.

Se conocen otros sistemas de administración y pueden usarse para administrar un anticuerpo de la presente invención, incluyendo, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas (véase Langer, Science 249:1527 (1990); Treat et al., en Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein et al., eds., págs 353-365 (1989); y Lopez-Berestein, ibid., págs 317-327) y células recombinantes capaces de expresar el compuesto; endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu et al., J Biol Chem 262:4429 (1987)); construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro vector etc.

Los ingredientes activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Estas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, A. Osal, Ed. (1980).

También se puede emplear la administración pulmonar, p.ej., mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente de aerosolización. El anticuerpo también puede administrarse en los pulmones de un paciente en forma de una composición en polvo seco, véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 6.514.496.

En una realización específica, puede ser deseable administrar los anticuerpos o composiciones terapéuticas de la invención localmente en el área que necesita tratamiento; lo cual puede conseguirse, por ejemplo, y no a modo de limitación, por infusión local, aplicación tópica, por inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas tales como membranas silásticas o fibras. Preferiblemente, cuando se administra un anticuerpo de la invención, debe tenerse cuidado de usar materiales que no absorban o adsorban la proteína.

En otra realización, el anticuerpo puede administrarse en un sistema de liberación controlada. En una realización, se puede usar una bomba (véase Langer, Science 249:1527 (1990); Sefton, CRC Crit Ref Biomed Eng 14:201 (1987); Buchwald et al., Surgery 88:507 (1980); y Saudek et al., N Engl J Med 321:574 (1989)). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos (véase Medical Applications of Controlled Release, Langer et al., eds., CRC Press (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen et al., eds., Wiley (1984); Ranger et al., J Macromol Sci Rev Macromol Chem 23:61 (1983); véase también Levy et al., Science 228:190 (1985); During et al., Ann Neurol 25:351 (1989); y Howard et al., J Neurosurg 71:105 (1989)). En otra realización, puede ponerse un sistema de liberación controlada cerca de la diana terapéutica.

Pueden prepararse formulaciones terapéuticas del polipéptido o anticuerpo para el almacenamiento como formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas mezclando el polipéptido que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, diluyentes, excipientes o estabilizantes "farmacéuticamente aceptables" opcionales empleados típicamente en la técnica, es decir, agentes tamponantes, agentes estabilizantes, conservantes, agentes de

isotonicidad, detergentes no iónicos, antioxidantes y otros diversos aditivos, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª ed., Osol, ed. (1980). Estos aditivos generalmente son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, por lo tanto, los excipientes, diluyentes, vehículos y similares son farmacéuticamente aceptables.

Un anticuerpo "aislado" o "purificado" carece sustancialmente de material celular u otras proteínas contaminantes procedentes de la célula o tejido original o del medio del que procede la proteína, o carece sustancialmente de precursores químicos u otros agentes químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión "carece sustancialmente de material celular" incluye preparaciones de un anticuerpo en las que el polipéptido/proteína está separado de componentes celulares de las células a partir de las cuales se aísla o se produce de manera recombinante. De esta manera, un anticuerpo que carece sustancialmente de material celular incluye preparaciones del anticuerpo que tienen menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, 5%, 2,5% o 1% (en peso seco) de proteínas contaminantes. Cuando el anticuerpo se produce de manera recombinante, también carece preferiblemente de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20%, 10%, 5%, 2,5% o 1% del volumen de la preparación de proteínas. Cuando el anticuerpo se produce por síntesis química, preferiblemente carece sustancialmente de precursores químicos u otros agentes químicos y reactivos, es decir, el anticuerpo de interés se separa de precursores químicos u otros agentes químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. Por consiguiente, estas preparaciones del anticuerpo tienen menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, 5% o 1% (en peso seco) de precursores químicos o compuestos distintos del anticuerpo de interés. En una realización preferida, los anticuerpos se aíslan o purifican.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "niveles de bajos a indetectables de agregación" se refiere a muestras que contienen no más de 5%, no más de 4%, no más de 3%, no más de 2%, no más de 1% y con frecuencia no más de 0,5% de agregación, por peso de proteína, medido, por ejemplo, por cromatografía de exclusión por tamaños de alta resolución (HPSEC).

Como se usa en la presente memoria, la expresión "niveles de bajos a indetectables de fragmentación" se refiere a muestras que contienen una cantidad igual o mayor que 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%, de la proteína total, por ejemplo, en un solo pico, como se determina por HPSEC, o en dos (2) picos (cadena pesada y cadena ligera), por ejemplo, por electroforesis capilar en gel reducido (rCGE) y que no contienen ningún otro pico individual con más de 5%, más de 4%, más de 3%, más de 2%, más de 1% o más de 0,5% de la proteína total. La rCGE como se usa en la presente memoria se refiere a electroforesis capilar en gel en condiciones reductoras suficientes para reducir enlaces disulfuro en un anticuerpo o molécula de tipo anticuerpo o derivada de un anticuerpo.

Como se usan en la presente memoria, los términos "estabilidad" y "estable" en el contexto de una formulación líquida que comprende un anticuerpo contra IL-13 o un fragmento de unión del mismo se refieren a la resistencia del anticuerpo o de un fragmento de unión a antígeno del mismo presente en la formulación a la desnaturalización térmica y química, agregación, degradación o fragmentación en condiciones de fabricación, preparación, transporte y almacenamiento dadas. Las formulaciones "estables" de la invención retienen una actividad biológica igual o mayor de 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 99,5% en unas condiciones específicas de fabricación, preparación, transporte y almacenamiento. La estabilidad de dicha preparación de anticuerpo puede evaluarse por grados de agregación, degradación o fragmentación por métodos conocidos para los especialistas en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, rCGE, electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) y HPSEC, en comparación con una referencia.

El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Estos vehículos fisiológicos pueden ser líquidos estériles tales como agua y aceites, incluyendo los procedentes del petróleo o de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un vehículo adecuado cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También pueden emplearse soluciones salinas y soluciones de glicerol como vehículos líquidos, particularmente en caso de soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, carbonato cálcico, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada deshidratada, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH. Las composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida, depósitos y similares. La composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. Las formulaciones orales pueden incluir vehículos convencionales tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio etc. Se describen ejemplos de vehículos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences," Martin. Estas composiciones contendrán una cantidad eficaz del anticuerpo, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma para la administración apropiada al paciente. Como se conoce en la técnica, la formulación se construirá para adecuarse al modo de administración.

Los agentes tamponantes ayudan a mantener el pH en el intervalo que se aproxima a las condiciones fisiológicas. Los tampones están presentes preferiblemente a un intervalo de concentraciones de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM. Los agentes tamponantes adecuados para uso con la presente invención incluyen tanto

ácidos orgánicos como inorgánicos, y sales de los mismos, tales como tampones citrato (por ejemplo, mezcla de citrato monosódico-citrato disódico, mezcla de ácido cítrico-citrato trisódico, mezcla de ácido cítrico-citrato monosódico etc.), tampones succinato (por ejemplo, mezcla de ácido succínico-succinato monosódico, mezcla de ácido succínico-hidróxido sódico, mezcla de ácido succínico-succinato disódico etc.), tampones tartrato (por ejemplo, mezcla de ácido tartárico-tartrato sódico, mezcla de ácido tartárico-tartrato potásico, mezcla de ácido tartárico-hidróxido sódico etc.), tampones fumarato (por ejemplo, mezcla de ácido fumárico-fumarato monosódico, mezcla de ácido fumárico-fumarato disódico, mezcla de fumarato monosódico-fumarato disódico etc.), tampones gluconato (por ejemplo, mezcla de ácido glucónico-gluconato sódico, mezcla de ácido glucónico-hidróxido sódico, mezcla de ácido glucónico-gluconato potásico etc.), tampones oxalato (por ejemplo, mezcla de ácido oxálico-oxalato sódico, mezcla de ácido oxálico-hidróxido sódico, mezcla de ácido oxálico-oxalato potásico etc.), tampones lactato (por ejemplo, mezcla de ácido láctico-lactato sódico, mezcla de ácido láctico-hidróxido sódico, mezcla de ácido láctico-lactato potásico etc.) y tampones acetato (por ejemplo, mezcla de ácido acético-acetato sódico, mezcla de ácido acético-hidróxido sódico etc.). Pueden usarse tampones fosfato, tampones carbonato, tampones de histidina, sales de trimetilamina tales como Tris, HEPES y otros de estos tampones conocidos.

Pueden añadirse conservantes para retrasar el crecimiento microbiano y pueden añadirse en cantidades que varían de 0,2%-1% (p/v). Los conservantes adecuados para uso con la presente invención incluyen fenol, alcohol bencílico, m-cresol, metilparabeno, propilparabeno, cloruro de octadecildimetilbencilamonio, haluros de benzalconio (por ejemplo, cloruro, bromuro y yoduro), cloruro de hexametonio, alquilparabenos tales como metil o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol y 3-pentanol.

Están presentes agentes de isotonicidad para asegurar la isotonicidad fisiológica de las composiciones líquidas de la presente invención e incluyen alcoholes de azúcares polihidroxílicos, preferiblemente alcoholes de azúcares trihidroxílicos o superiores, tales como glicerina, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol. Los alcoholes polihidroxílicos pueden estar presentes en una cantidad comprendida entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 25%, en peso, preferiblemente de 1% a 5% teniendo en cuenta las cantidades relativas de los demás ingredientes.

Los estabilizantes se refieren a una categoría amplia de excipientes que pueden cambiar en función de un agente para proporcionar volumen a un aditivo que solubiliza el agente terapéutico o ayuda a prevenir la desnaturalización o adherencia a la pared del recipiente. Los estabilizantes típicos pueden ser alcoholes de azúcares polihidroxílicos; aminoácidos tales como arginina, lisina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, alanina, ornitina, L-leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina etc., azúcares orgánicos o alcoholes de azúcares tales como lactosa, trehalosa, estaquiosa, arabitol, eritritol, manitol, sorbitol, xilitol, ribitol, mioinositol, galactitol, glicerol y similares, incluyendo ciclitoles tales como inositol; polietilenglicol; polímeros de aminoácidos; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglicolato sódico, tioglicerol, α-monotioglicerol y tiosulfato sódico; polipéptidos de bajo peso molecular (es decir, <10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero humano, albúmina de suero bovino, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona, sacáridos, monosacáridos tales como xilosa, manosa, fructosa y glucosa; disacáridos tales como lactosa, maltosa y sacarosa; trisacáridos tales como rafinosa; polisacáridos tales como dextrano y similares. Los estabilizantes están presentes en el intervalo de 0,1 a 10.000 p/p por parte de proteína activa.

Otros diversos excipientes incluyen agentes para proporcionar volumen (por ejemplo, almidón), agentes quelantes (por ejemplo, EDTA), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metionina o vitamina E) y codisolventes.

La formulación de la presente memoria también puede contener más de un compuesto activo cuando sea necesario para la indicación particular a tratar, preferiblemente los que tienen actividades complementarias que no interfieren de manera adversa entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar además un agente inmunosupresor. Estas moléculas convenientemente están presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin para el que están destinadas.

Como se usa en la presente memoria, el término "tensioactivo" se refiere a sustancias orgánicas que tienen estructuras anfipáticas, particularmente se componen de grupos de tendencias de solubilidad opuestas, típicamente una cadena de hidrocarburo soluble en aceite y un grupo iónico soluble en agua. Los tensioactivos pueden clasificarse, dependiendo de la carga del resto tensioactivo, en tensioactivos aniónicos, catiónicos y no iónicos. Los tensioactivos a menudo se usan como agentes humectantes, emulsionantes, solubilizantes y dispersantes para diversas composiciones farmacéuticas y preparaciones de materiales biológicos.

Pueden añadirse tensioactivos o detergentes no iónicos (también conocidos como "agentes humectantes") para ayudar a solubilizar el agente terapéutico, así como para proteger al agente terapéutico frente a la agregación inducida por agitación, lo cual también permite que la formulación se exponga a tensiones de cizalla en la superficie sin que se produzca desnaturalización de la proteína. Los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen polisorbatos (20, 80 etc.), poloxámeros (184, 188 etc.), polioles Pluronic® y monoéteres de polioxietileno sorbitano (TWEEN-20®, TWEEN-80® etc.). Los tensioactivos no iónicos pueden estar presentes en un intervalo de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente 0,07 mg/ml a aproximadamente 0,2 mg/ml.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "sal inorgánica" se refiere a cualquier compuesto que no contiene carbono que resulta del reemplazo de parte o todo el hidrógeno de un ácido o un ácido por un grupo metálico o un grupo que actúa como un metal, y a menudo se usa como compuesto de ajuste de la tonicidad en composiciones farmacéuticas y preparaciones de materiales biológicos. Las sales inorgánicas más comunes son NaCl, KCl, NaH2PO4 etc.

La presente invención abarca formulaciones líquidas que tienen estabilidad a temperaturas encontradas en un refrigerador y congelador comercial como el encontrado en la oficina de un médico o en un laboratorio, tal como de aproximadamente -20º C a aproximadamente 5º C, evaluándose dicha estabilidad, por ejemplo, por cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución (HPSEC), con fines de almacenamiento, tal como durante aproximadamente 60 días, durante aproximadamente 120 días, durante aproximadamente 180 días, durante aproximadamente un año, durante aproximadamente 2 años o más. Las formulaciones líquidas de la presente invención también presentan estabilidad, como se evalúa, por ejemplo, por HSPEC, a temperatura ambiente, durante al menos unas pocas horas, tal como una hora, dos horas o aproximadamente tres horas antes del uso.

La expresión "molécula pequeña" y expresiones análogas incluyen, pero sin limitación, péptidos, peptidomiméticos, aminoácidos, análogos de aminoácidos, polinucleótidos, análogos de polinucleótidos, nucleótidos, análogos de nucleótidos, compuestos orgánicos o inorgánicos (es decir, incluyendo compuestos heteroogánicos y/u organometálicos) que tienen un peso molecular menor de aproximadamente 10.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular menor de aproximadamente 5.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular menor de aproximadamente 1.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular menor de aproximadamente 500 gramos por mol, y sales, ésteres y otras formas farmacéuticamente aceptables de estos compuestos.

De esta manera, en el caso de un cáncer, los anticuerpos de la invención pueden administrarse solos o en combinación con otros tipos de tratamientos para cánceres, incluyendo agentes quimioterapéuticos convencionales (paclitaxel, carboplatino, cisplatino y doxorubicina), agentes anti-EGFR (gefitinib, erlotinib y cetuximab), agentes anti-angiogénesis (bevacizumab y sunitinib), así como agentes inmunomoduladores tales como interferón-α y talidomida.

Tal como se usan en la presente memoria, las expresiones "agente terapéutico" y "agentes terapéuticos" se refieren a cualquier agente o agentes que pueden usarse en el tratamiento, control o mejora de una enfermedad, trastorno, mal o similares asociados con un metabolismo y actividad aberrante de IL-4 y/o IL-13.

Además, los anticuerpos de la presente invención se pueden conjugar a diversas moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionucleótidos o toxinas, véanse, por ej., los documentos WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; la patente de EE.UU. No. 5.314.995; y documento EPO 396.387. Un anticuerpo o un fragmento del mismo puede conjugarse con un resto terapéutico tal como una citotoxina (por ejemplo, un agente citostático o citocida), un agente terapéutico o un ión metálico radiactivo (por ejemplo, emisores α tales como, por ejemplo, 213Bi). Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracendiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos y homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo y dacarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina, daunomicina y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina, actinomicina, bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)), y agentes antimitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Las técnicas para conjugar este resto terapéutico a anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo, Arnon et al., en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), págs 243-56 Alan R. Liss (1985); Hellstrom et al., en Controlled Drug Delivery, 2ª ed., Robinson et al., eds., págs 623-53, Marcel Dekker (1987); Thorpe, en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al., eds., págs 475-506 (1985); Monoclonal Antibodies For Cancer Detection and Therapy, Baldwin et al., eds., págs 303-16, Academic Press (1985); y Thorpe, et al., Immunol Rev 62:119 (1982). Como alternativa, un anticuerpo puede conjugarse con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo, tal como un anticuerpo bifuncional, véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 4.676.980.

Los conjugados descritos en este documento pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada, y el agente terapéutico o resto de fármaco no debe considerarse limitado a los agentes quimioterapéuticos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Estas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina diftérica; una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, interferón α, interferón β, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador de plasminógeno tisular, un agente apoptótico, por ejemplo, TNF-α, TNF-β, AIM I (documento WO 97/33899), AIM II (documento WO 97/34911), ligando Fas (Takahashi et al., Int Immunol, 6:1567 (1994)), VEGF (documento WO 99/23105); un agente trombótico; un agente

antiangiogénico, por ejemplo angiostatina o endostatina; o modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfoquinas, interleuquina-1 (IL--1), interleuquina-2 (IL-2), interleuquina-6 (IL-6), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos (GCSF) u otros factores de crecimiento.

Las formulaciones a usar para la administración in vivo deben ser estériles. Esto puede conseguirse, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles. Por ejemplo, las formulaciones líquidas de la presente invención pueden esterilizarse por filtración usando un filtro de 0,2 µm o de 0,22 µm.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o matrices. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato), poli(alcohol vinílico)), polilactidas (Patente de Estados Unidos Nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico (tales como microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque ciertos polímeros tales como el etileno-acetato de vinilo y el ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Pueden idearse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través de intercambio de tio-disulfuro, la estabilización puede conseguirse modificando restos sulfhidrilo, por liofilización de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados, por sustitución de aminoácidos y creando composiciones de matrices poliméricas específicas.

La composición de anticuerpo o de variante se formulará, dosificará y administrará de una manera coherente con la buena práctica médica. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular a tratar, el mamífero o ser humano particular tratado, la situación clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, el programa de administración y otros factores conocidos para los médicos. La "cantidad terapéuticamente eficaz" del anticuerpo o variante a administrar vendrá dirigida por estas consideraciones, y puede ser la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar o tratar una enfermedad, afección o trastorno mediado por IL-4 y/o IL-13.

El anticuerpo o la variante opcionalmente se formula con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de estos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores discutidos anteriormente. Generalmente se usan en las mismas dosificaciones y con las vías de administración usadas anteriormente en la presente memoria o de 1 a 99% de las dosificaciones empleadas hasta ahora.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de una terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico) que es suficiente para reducir la gravedad y/o duración de una enfermedad mediada por IL-4 y/o IL-13, mejorar uno o más síntomas de la misma, prevenir el avance de una enfermedad mediada por IL-4 y/o IL-13 o causar la regresión de una enfermedad, o que es suficiente para dar como resultado la prevención del desarrollo, recurrencia, inicio o progresión de una enfermedad mediada por IL-4 y/o IL-13 o uno o más de sus síntomas, o mejorar o aumentar los efectos profilácticos y/o terapéuticos de otra terapia (por ejemplo, otro agente terapéutico) útil para tratar una enfermedad mediada por IL-4 y/o IL-13.

La cantidad de anticuerpo terapéutico o fragmento del mismo que será eficaz en el uso o tratamiento de un trastorno o afección particular dependerá de la naturaleza del trastorno o afección y puede determinarse por técnicas clínicas estándar. Cuando sea posible, debe realizarse una curva de dosis-respuesta y las composiciones farmacéuticas de la invención primero deben prepararse *in vitro*. Si se dispone de un modelo animal adecuado, de nuevo puede obtenerse una curva de dosis-respuesta y usarse para extrapolar una dosis humana adecuada poniendo en práctica métodos conocidos en la técnica. Sin embargo, basándose en el conocimiento común de la técnica, una composición farmacéutica eficaz para promover una disminución de un efecto inflamatorio, por ejemplo, puede proporcionar una concentración local de agente terapéutico comprendida entre aproximadamente 5 y 20 ng/ml, y preferiblemente, entre aproximadamente 10 y 20 ng/ml.

En una realización preferida, puede administrarse una solución acuosa de polipéptido, anticuerpo o fragmento terapéutico del mismo por inyección subcutánea. Cada dosis puede variar de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal, o más preferiblemente, de aproximadamente 3 mg a aproximadamente 30 mg por kilogramo de peso corporal. La dosificación puede averiguarse empíricamente para la enfermedad particular, población de pacientes, modo de administración y similares, poniendo en práctica métodos farmacéuticos conocidos en la técnica.

El programa de dosificación para administración subcutánea puede variar de una vez por semana a diariamente dependiendo de varios factores clínicos que incluyen el tipo de enfermedad, la gravedad de la enfermedad y la sensibilidad del sujeto al agente terapéutico.

En este documento también se describen métodos para preparar formulaciones líquidas del anticuerpo o del fragmento de unión a IL-4 y/o IL-13 del mismo, comprendiendo dichos métodos concentrar una fracción de anticuerpo purificado a una concentración final de aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 80 mg/ml, aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 250 mg/ml, aproximadamente 300 mg/ml o más usando, por ejemplo, una membrana semipermeable con un límite de peso molecular (pm) apropiado (por ejemplo, un límite de 30 kD para sus fragmentos F(ab')2; y un límite de 10 kD para fragmentos Fab).

Además, la presente invención también abarca formulaciones líquidas estables de los productos de interés que tienen semi-vida in vivo mejorada. Así, el anticuerpo de interés tiene una semi-vida en un sujeto, preferiblemente un ser humano, de más de 3 días, mayor que 7 días, mayor que 10 días, mayor que 15 días, mayor que 25 días, mayor que 30 días, mayor que 35 días, mayor que 40 días, mayor que 45 días, mayor que 2 meses, mayor que 3 meses, mayor que 4 meses, mayor que 5 meses o más.

Para prolongar la circulación en suero de un anticuerpo in vivo, pueden usarse varias técnicas. Por ejemplo, pueden unirse moléculas de polímero inerte, tales como polietilenglicol (PEG) de alto peso molecular, a un anticuerpo con o sin un enlazador multifuncional por medio de una conjugación con especificidad de sitio del PEG al extremo N o al extremo C del anticuerpo o a través de grupos ε amino presentes en restos de lisina. Puede usarse derivatización de polímeros lineal o ramificada que ocasiona una pérdida mínima de actividad biológica. El grado de conjugación puede controlarse de cerca por SDS-PAGE y espectrometría de masas para asegurar la conjugación apropiada de las moléculas de PEG a los anticuerpos. El PEG que no ha reaccionado puede separarse de los conjugados de anticuerpo-PEG por cromatografía de exclusión por tamaños o cromatografía de intercambio iónico. Los anticuerpos derivatizados con PEG pueden ensayarse con respecto a la actividad de unión así como con respecto a la eficacia in vivo usando métodos conocidos por los especialistas en la técnica, por ejemplo, por inmunoensayos descritos en la presente memoria.

También puede generarse un anticuerpo con una mayor vida media in vivo introduciendo una o más modificaciones de aminoácidos (es decir, sustituciones, inserciones o deleciones) en un dominio constante de IgG, o fragmento de unión a FcR del mismo (tal como un fragmento de Fe o un fragmento de dominio Fe de bisagra), véanse, por ejemplo, los documentos WO 98/23289; WO 97/34631; y la Patente de Estados Unidos Nº 6.277.375.

Además, un anticuerpo puede conjugarse con albúmina para hacer que el anticuerpo sea más estable in vivo o tenga una mayor vida media in vivo. Las técnicas son conocidas en este campo, véanse por ejemplo los documentos WO 93/15199, WO 93/15200 y WO 01/77137; y EPO 413. 622. El anticuerpo también puede modificarse, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, y similares.

En una realización, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando es necesario, la composición también incluye un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína u otro anestésico “caína” para evitar el dolor en el sitio de inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran por separado o mezclados entre sí en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado sin agua en un recipiente cerrado herméticamente, tal como una ampolla o bolsita que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición se va a administrar por infusión, puede dispensarse con un frasco de infusión que contiene solución salina o agua estéril de calidad farmacéutica. Cuando la composición se administra por inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina, por ejemplo, en un kit, de manera que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

La invención también prevé que una formulación líquida de la presente invención se envase en un recipiente cerrado herméticamente tal como una ampolla o bolsita que indica la cantidad del producto de interés. Las formulaciones líquidas de la presente invención pueden estar en un envase sellado indicando la cantidad y concentración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo. La formulación líquida de la presente invención puede suministrarse en un recipiente cerrado herméticamente con al menos 15 mg/ml, 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, 100 mg/ml, 150 mg/ml, 200 mg/ml, 250 mg/ml o 300 mg/ml de anticuerpo contra IL-4 y/o IL-13 en una cantidad de 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 15 ml o 20 ml, por ejemplo.

Se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para el diagnóstico, prevención o tratamiento de una afección o enfermedad mediada por IL-4 y/o IL-13 y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). La etiqueta en o asociada con el recipiente indica que la composición se usa para el tratamiento de la afección particular. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal

como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Además, puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de uso.

La invención ahora se ejemplificará para ayuda del especialista en la técnica por medio de los siguientes ejemplos no limitantes que representan algunas de las realizaciones por medio de y en las cuales puede ponerse en práctica la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Secuenciación del dominio Fv de anticuerpo monoclonal de ratón anti-IL-13 humana del clon B-B13

El reactivo usado en el siguiente método era anticuerpo monoclonal de ratón anti anti-IL-13 del clon B-B13 adquirido en Cell Sciences, Inc. (Canton, MA, EE.UU.). Cell Sciences es el distribuidor estadounidense de Diaclone (Besançon, Francia), que fabricó el anticuerpo B-B13.

La secuencia de aminoácidos de anticuerpo monoclonal anti-IL-13 del clon B-B13 se determinó por una combinación de secuenciación N-terminal de Edman y análisis espectrométrico de masas. El anticuerpo se sometió a las siguientes estrategias diferentes para generar polipéptidos o fragmentos peptídicos, y éstos se fraccionaron por diferentes estrategias para preparar muestras que posteriormente se sometieron a secuenciación N-terminal de Edman y a análisis de cromatografía líquida/espectrometría de masas/espectrometría de masas (LC-MS/MS) con emparejamiento de péptidos de la base de secuencias de proteínas asociada.

El análisis por SDS-Page del anticuerpo, sin tratar o tratado con pirogluamino peptidasa, para separar las cadenas pesadas y ligeras, seguido de transferencia a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) y secuenciación N-terminal de Edman de las bandas.

La proteolisis parcial limitada con proteasas específicas del anticuerpo seguida de SDS-Page y transferencia a membrana de PVDF y secuenciación N-terminal de Edman de las bandas.

La escisión química parcial limitada del anticuerpo entero, o de las bandas de gel de SDS-Page de cadena pesada y ligera, seguido de SDS-Page y transferencia a membrana de PVDF y secuenciación N-terminal de Edman de las bandas.

La Proteolisis del anticuerpo entero o las bandas de SDS-Page de cadena pesada y ligera con proteasas específicas y análisis de LC/MS/MS.

La proteolisis de las bandas de gel de SDS-Page de cadena ligera y pesada con proteasas específicas seguido de fraccionamiento por cromatografía de alta presión de fase inversa (rp-hplc), y posterior secuenciación N-terminal de Edman y análisis de LC/MS/MS de las fracciones.

Proteolisis limitada del anticuerpo con la proteasa papaína, fraccionamiento de la banda de gel de Fd (fragmento VH-CH1 de la cadena pesada del anticuerpo) por SDS-Page, proteolisis con proteasas específicas, cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (rp-hplc) y posterior secuenciación N-terminal de Edman y análisis de LC/MS/MS de las fracciones.

Ejemplo 2: Secuenciación del dominio Fv del anticuerpo monoclonal de ratón anti-IL-4 humana del clon 8D4-8

El reactivo anticuerpo monoclonal de ratón anti-IL-4 del clon 8D4-8 se adquirió en Biozol diagnostica Vertrieb GmbH (Eching, Alemania). Biozol es el distribuidor alemán de BioLegend (San Diego, CA, USA) que fabricó el anticuerpo 8D4-8.

La secuencia de aminoácidos de un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IL-4 (clon 8D4-8) se determinó por una combinación de secuenciación de Edman y espectrometría de masas (Pham et al., 2006, Anal. Biochem. 352: 77-86; Roberts et al., 2005, Anal. Chem. 67: 3613-25). En resumen, el anticuerpo primero se separó en cadenas ligeras y pesadas y después cada cadena se escindió por proteasas con especificidad de secuencia o químicamente. Los péptidos resultantes se separaron por cromatografía de fase inversa y se analizaron por desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI) y/o LC-MS/MS. Los péptidos únicos así como las cadenas pesada y ligera intactas después se sometieron a secuenciación de Edman para una determinación inequívoca de la secuencia de la proteína.

Ejemplo 3: Humanización del dominio Fv de anticuerpo monoclonal de ratón anti-IL-13 humana del clon B-B13

El protocolo de humanización descrito anteriormente en la presente memoria se usó para humanizar el clon B-B13. Se sugirieron seis versiones humanizadas que incluyen mutaciones en las CDR para solucionar los restos problemáticos (sitio de desamidación, metionina expuesta al disolvente, posiciones de ácidos biliares).

Las secuencias VL y VH de B-B13 se sometieron a una búsqueda Blast frente a la versión de julio de 2007 del Banco de Datos de Proteínas (PDB). Se recuperaron las secuencias de aminoácidos de cadena ligera y pesada más

similares. Se descubrió que el homólogo más parecido para la cadena ligera variable era 1EGJ. Se descubrió que el homólogo más parecido para la cadena pesada era 1FNS. Las estructuras 1EGJ y 1FNS se usaron para construir un modelo de homología de los dominios variables que posteriormente se sometió a una minimización de energía usando el procedimiento convencional realizado en Molecular Operating Environment (MOE). MOE es un juego completo de programas informáticos para el diseño de fármacos asistido por ordenador distribuido por el grupo Chemical Computing. Posteriormente se realizó un cálculo de dinámica molecular (MD) de un modelo de homología 3D de B-B13 durante 1,7 nanosegundos en disolvente implícito de Generalized Born. Las 1.700 fotos resultantes de la trayectoria de MD posteriormente se usaron para calcular, para cada aminoácido de B-B13, la distribución de sus desviaciones cuadráticas medias (rmsd) en comparación con una posición medoid de referencia. Finalmente se usa un ensayo estadístico que compara la distribución de rmsd de cada aminoácido con respecto a la distribución de rmsd global, para decidir si el aminoácido es suficientemente flexible, como se ve durante la MD, como para considerar que es probable que interaccione con receptores de células B y que sea responsable de la activación de la respuesta inmune. Las posiciones flexibles de la región variable de B-B13 murino se compararon con las posiciones correspondientes en secuencias de anticuerpo humano en la versión de enero de 2007 de la base de datos ImMunoGeneTics que se ha descargado localmente. Sólo los restos que presentan una flexibilidad mayor de tres veces la media y unos pocos restos flanqueantes que conservan las estructuras 3D de estos restos flexibles se retuvieron para la búsqueda. Se eligió la región variable de anticuerpo humano con los restos flexibles más parecidos, dando una importancia especial a las posiciones a una distancia menor o igual a 5,0 Å de una CDR, para reemplazar a los restos flexibles de región variable del anticuerpo B-B13 murino. En las versiones propuestas también se propusieron varias mutaciones en las CDR para evitar restos problemáticos. Se consideraron los siguientes restos de secuencias: Asp-Pro (enlace lábil a ácidos), Asn-X-Ser/Thr (glicosilación), Asn-Gly/Ser/Thr (sitio de desamidación en área expuesta), Met (oxidación en área expuesta). Las secuencias humanizadas resultantes se sometieron a una búsqueda Blast para buscar similitudes de secuencia frente a una base de datos UniProtKB/Swiss-Prot para demostrar que se había hecho una suposición razonable. Se descubrió que todas las secuencias muestran un alto grado de similitud con varios anticuerpos humanos. Además, ninguna de las secuencias contiene ningún epítopo de células B o T conocido de los indicados en la Base de Datos de Epítopos Inmunitarios y Análisis de Recursos (base de datos IEDB).

Se sugirieron tres versiones para la cadena pesada (HI, H2, H3) y tres versiones para la cadena ligera (L1, L2, L3). Las tres versiones de la cadena ligera proceden de CAA83271.1 (número de acceso del Genebank CAA83271). La versión L1 tiene 4 mutaciones. La versión L2 incluye una mutación adicional para retirar un sitio DP (Pro99) en la CDR3. L3 incorpora dos mutaciones adicionales localizadas en las CDR en comparación con L2, que son dos supuestos sitios de desamidación (N34Q, N96A). Las versiones H1, H2 y H3 de la cadena pesada proceden de CAC39364.1 (número acceso del Genebank CAC39364). Esta plantilla no era la plantilla de máxima puntuación, pero era la plantilla de mayor puntuación que no contenía una secuencia que presentara una alta homología (> 70 %) con una secuencia inmunogénica conocida. La versión H1 contiene 6 mutaciones y la secuencia de H2 incorpora dos mutaciones adicionales para dirigirse a tres sitios de desamidación (N60A, N73T y N83T). La numeración secuencial de aminoácidos refleja su orden natural dentro de la proteína (de extremo N a extremo C). H3 contiene dos mutaciones adicionales (Y100R y D106K) que se consideró que mejoraban la potencia. Se recomendaron seis combinaciones de variantes de VL y VH para la generación de anticuerpos humanizados: VL1xVH1, VL2xVH2, VL1xVH3, VL3xVH1, VL3xVH2 y VL3xVH3. Como se muestra en la Tabla 1, los cambios de aminoácidos se realizaron en las variantes de VL y VH de B-B13 humanizado usando la tecnología de resurfacing (modificación de la superficie) explicada en la sección de descripción detallada de la presente solicitud. La columna de la izquierda indica los aminoácidos originales y sus posiciones en el mAb B-B13 murino.

Tabla 1

Cadena Ligera (numeración secuencial)	(VL1)	(VL2)	(VL3)
Asn1	Asp	Asp	Asp
Asn34	Asn	Asn	Gln
Pro44	Ala	Ala	Ala
Glu83	Gln	Gln	Gln
Asp85	Glu	Glu	Glu
Asn96	Asn	Asn	Ala
Pro99	Pro	Ser	Ser

	4 mutaciones	5 mutaciones	7 mutaciones
Cadena Pesada	(VH1)	(VH2)	(VH3)
Gln1	Glu	Glu	Glu
Ser15	Gly	Gly	Gly
Glen16	Gly	Gly	Gly
Asn60	Asn	Ala	Ala
Ser61	Asp	Asp	Asp
Asn73	Asn	Ser	Ser
Lys81	Glu	Glu	Glu
Asn83	Asn	Thr	Thr
Gln86	Asn	Asn	Asn
Tyr100	Tyr	Tyr	Asn
Asp106	Asp	Asp	Lys
	6 mutaciones	9 mutaciones	11 mutaciones

Ejemplo 4: Humanización del dominio Fv del anticuerpo monoclonal de ratón anti-IL-4 humana del clon 8D4-8

La tecnología de humanización (resurfacing) descrita anteriormente en la presente memoria se usó para humanizar el clon 8D4-8. Se prepararon dos versiones humanizadas. Una versión incluye una mutación en las CDR de la cadena pesada que se pensó que se dirigía a un resto problemático (posiciones lábiles a ácidos expuestas).

Las secuencias de VL y VH de 8D4-8 se sometieron a una búsqueda Blast frente a la versión de julio de 2007 de la PDB. Se recuperaron las secuencias de aminoácidos de cadena ligera y pesada más similares. El homólogo más parecido para la cadena ligera variable es 1YDJ. Se descubrió que el homólogo más parecido para la cadena pesada era 1IQW. Las estructuras de 1YDJ y 1IQW se usaron para construir un modelo de homología de los dominios variables que posteriormente se sometió a una minimización de energía usando el procedimiento estándar realizado en MOE. Posteriormente se realizó un cálculo de dinámica molecular (MD) de un modelo de homología de 8D4-8 durante 1,7 nanosegundos en disolvente implícito de Generalized Born. Las 1.700 fotos resultantes de la trayectoria de MD posteriormente se usaron para calcular, para cada aminoácido de 8D4, la distribución de sus desviaciones cuadráticas medias (rmsd) en comparación con una posición medoid de referencia. Finalmente se usa un ensayo estadístico que compara la distribución de rmsd de cada aminoácido con respecto a la distribución de rmsd global, para decidir si el aminoácido es suficientemente flexible, como se ve durante la MD, como para considerar que es probable que interaccione con receptores de células B y que sea responsable de la activación de la respuesta inmune. Las posiciones flexibles de la región variable de 8D4-8 murino se compararon con las posiciones correspondientes en secuencias de anticuerpo humano en la versión de enero de 2007 de la base de datos ImMunoGeneTics que se ha descargado localmente. Sólo los restos que presentan una flexibilidad mayor de tres veces la media y unos pocos restos flanqueantes que conservan las estructuras 3D de estos restos flexibles se retuvieron para la búsqueda. Se eligió la región variable de anticuerpo humano con los restos flexibles más parecidos, dando una importancia especial a las posiciones a una distancia menor a 5,0 Å de una CDR, para reemplazar a los restos flexibles de región variable del anticuerpo 8D4-8 murino. Finalmente, también se realizaron algunas mutaciones adicionales para evitar restos problemáticos. Se consideraron los siguientes restos de secuencias: Asp-Pro (enlace lábil a ácidos), Asn-X-Ser/Thr (glicosilación), Asn-Gly/Ser/Thr (sitio de desamidación en área expuesta), Met (oxidación en área expuesta). El único resto problemático encontrado fue un sitio DP en la CDR2 de la cadena pesada. Las secuencias humanizadas resultantes se sometieron a una búsqueda blast para buscar similitudes de secuencia contra la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot que ofreció seguridad con respecto a que se ha hecho una hipótesis razonable. Todas las secuencias demostraron un alto grado de similitud con un número de anticuerpos humanos. A su vez, ninguna de las secuencias contiene ningún epítopo de células B o T conocido enumerado en la base de datos IEDB.

Se sugirieron dos versiones para la cadena pesada (HI, H2) y una versión para la cadena ligera (L1). La versión L1 de la cadena ligera procede de BAC01676.1 (número de acceso del Genebank BAC01676). La versión L1 tiene 3 mutaciones. Las versiones H1 y H2 de la cadena pesada proceden de BAC02418.1 (número acceso del Genebank BAC02418). La versión H1 contiene 9 mutaciones y la versión H2 incluye una mutación adicional para eliminar un sitio DP (Pro53) en la CDR2. Se prepararon dos combinaciones, VL1xVH1 y VL1xVH2.

La Tabla 2 muestra los cambios de aminoácidos que se realizaron en variantes de VL y VH de 8D4-8 humanizado usando la tecnología de humanización (resurfacing). La columna de la izquierda indica los aminoácidos originales y sus posiciones en el mAb 8D4-8 murino.

Tabla 2

Cadena Ligera (numeración secuencial)	(VL1)	
Asn5	Thr	
Leu15	Val	
Ser39	Lys	
	3 mutaciones	
Cadena Pesada	(VH1)	(VH2)
G1n10	Glu	Glu
Arg13	Lys	Lys
Thr16	Ala	Ala
Pro53	Pro	Ala
Lys65	Gln	Gln
Asp66	Gly	Gly
Arg74	Glu	Glu
Ser76	Thr	Thr
Leu93	Val	Val
Thr118	Leu	Leu
	9 mutaciones	10 mutaciones

Ejemplo 5: Clonación y generación de anticuerpo monoclonal quimérico anti-IL-13 del clon B-B13, un anticuerpo monoclonal quimérico anti-IL-4 del clon 8D4-8 y variantes humanizadas

Se retrotradujeron secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera variables del clon anti-IL-13 B-B13 y del clon anti-IL-4 8D4-8 en secuencias de nucleótidos y se generaron respectivamente usando un protocolo modificado de la PCR de extensión solapante (OE-PCR) descrita por Young L. y Dong Q. (Nucl. Acids Res. (2004), 32(7), e59). Los productos de PCR se clonaron en el pCR®4-TOPO usando el kit de clonación TOPO TA de Invitrogen (Nº de catálogo 45-0641) y se secuenciaron usando cebadores directos de M13 e inversos de M13. Los dominios variables se fusionaron a la vez con la cadena pesada constante (IGHG1, número de acceso del Genebank Q569F4) o con la cadena ligera (IGKC) número de acceso del Genebank Q502W4) respectivamente, se digirieron con NheI y HindIII y cada uno se unió a los sitios NheI/HindIII de un vector de expresión episomal pXL, un análogo del vector pTT descrito por Durocher et al. (2002), Nucl. Acids Res. 30(2), E9, creando los plásmidos para la expresión en mamífero de las cadenas pesada y ligera del B-B13 quimérico y las cadenas pesada y ligera del 8D4-8 quimérico.

También se generaron sintéticamente los clones de expresión que codificaban las variantes humanizadas del clon B-B13 anti-IL-13 y del clon 8D4-8 anti-IL-4 por PCR de extensión solapante (OE-PCR), basándose en los cambios de aminoácidos propuestos de las secuencias originales.

Los plásmidos de expresión que codificaban la cadena pesada y ligera del anticuerpo se propagaron en E.coli DH5a. Los plásmidos usados para la transinfección se prepararon a partir de E.coli usando el Estuche EndoFree Plasmid Mega de Qiagen.

Para transfección de células HEK293FreeStyle (Invitrogen) se sembraron 3 x 105 células/mL en 100 mL volumen de medio FreeStyle libre de suero (Invitrogen) en un matraz agitador de 500 mL. Las células se cultivaron en una incubadora a 37°C con una atmósfera humidificada de 8% CO2, en una plataforma con agitador orbital que giraba a 110 rpm.

Tres días después de la siembra se determinaron las células viables y totales con un contador celular electrónico CASY (Schärfe System GmbH). Para la transfección se usaron células con una viabilidad mayor de 90% a una densidad de 1-1,5 x 106 células/ml. Se usaron 100 ml de células para la transfección en un matraz agitador de 500 ml con una mezcla de plásmidos de expresión de cadena pesada y ligera (5x10-7 µg de ADN/célula) usando FugeneHD (Roche) a una relación de ADN:FugeneHD de 2:7, en las condiciones descritas por el fabricante. Las células transfectadas se cultivaron durante 7 días en un incubador a 37°C (8% de CO2) en una plataforma de agitación orbital que giraba a 110 rpm.

Se recubrió una placa Nunc F96-MaxiSorp-Immuno con IgG anti-humana de cabra (específica de Fc) [NatuTec A80-104A]. El anticuerpo se diluyó hasta 10 ug/ml en tampón con recubrimiento de carbonato (carbonato sódico 50 mM, pH 9,6) y se dispensó a 50 uL por pocillo. La placa se selló con una cinta adhesiva y se almacenó durante una noche a 4ºC. La placa se lavó 3 veces con tampón de lavado (PBS pH 7,4 Tween20 al 0,1%). Se distribuyeron 150 µl de solución de bloqueo (BSA al 1%/PBS) en cada pocillo para cubrir la placa. Después de 1 hora a TA, la placa se lavó 3 veces con tampón Wash. Se añadieron 100 uL de muestras o patrones (en un intervalo de 1500 ng/ml a 120 ng/ml) y se dejó reposar durante 1 hora a TA. La placa se lavó 3 veces con tampón Wash. Se añadieron 100 µl de conjugado de IgG anti-humana-FC–HRP [NatuTec A80-104P-60] diluido 1:10.000 usando solución de incubación (BSA al 0,1%, PBS pH 7,4, Tween20 al 0,05%). Después de 1 hora de incubación a TA, la placa se lavó tres veces con tampón de lavado. Se añadieron 100 µl de sustrato ABTS (10 mg de comprimido ABTS (Pierce 34026) en ml de Na2HPO4 0,1 M, solución de ácido cítrico 0,05 M, pH 5,0. La adición de 10 µl de H2O2 al 30%/10 ml de tampón de sustrato antes del uso en cada pocillo permitió que se desarrollara color. Después de que el color se había revelado (aproximadamente 10 a 15 minutos), se añadieron 50 uL de solución SDS al 1% para detener la reacción. La placa se leyó a A405.

Las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad en Proteína A (HiTrap™ Protein A HP Columns, GE Life Sciences). Después de la elución de la columna con tampón acetato 100 mM con NaCl 100 mM pH 3,5, los anticuerpos monoclonales se formularon en PBS y se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm. La concentración de proteína se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm. Cada partida se analizó usando un kit Protein 200 Plus LabChip en el bioanalizador Agilent 2100 bajo condiciones reductoras y no reductoras para determinar la pureza y el peso molecular de cada subunidad y del monómero.

Ejemplo 6: Caracterización de variantes del clon humanizado anti-IL-13 B13 y de variantes del clon humanizado anti-IL-4 8D4-8

Los reactivos IL-13 e IL-4 humanas recombinantes se adquirieron en Chemicon (USA). El análisis cinético Biacore se realizó como se indica a continuación.

Se usó la tecnología de resonancia de plasmón superficial en un Biacore 3000 (GE Healthcare) para la caracterización cinética detallada de anticuerpos purificados. Se usó un ensayo de captura usando un anticuerpo con especificidad de especie (por ejemplo, MAB 1302 con especificidad de Fc de humano, Chemicon) para la captura y orientación de los anticuerpos investigados. El anticuerpo de captura se inmovilizó a través de grupos amina primaria (10000 RU) en un chip CM5 de calidad de investigación (GE Life Sciences) usando procedimientos convencionales. El anticuerpo analizado se capturó con un valor de RU ajustado que daría como resultado una unión máxima de analito de 30 RU a un caudal de 10 µl/min. La cinética de unión se midió contra IL-4 e IL-13 humana recombinante en un intervalo de concentración entre 0 y 50 nM en HBS EP (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, Tensioactivo P20 al 0,005 %) a un caudal de 30 µl/min. Las superficies del chip se regeneraron con glicina 10 mM pH 2,5. Los parámetros cinéticos se analizaron y se calcularon en el paquete de programas BIAevaluation usando una célula de flujo sin anticuerpo capturado como referencia. Para investigar la unión aditiva a los dos antígenos, se ha aplicado un método de coinyección "wizard-driven" en el que se inyectó inmediatamente un antígeno seguido de la mezcla antigénica de IL-13/IL-4.

Se midió la actividad biológica de los anticuerpos midiendo la inhibición de la proliferación celular mediada por IL-4 o IL-13 en células TF-1. En resumen, los solicitantes usaron IL-4 o IL-13 para estimular el crecimiento de las células TF-1. TF-1 es una línea celular que es dependiente de citoquinas para el crecimiento y responde a muchas citoquinas incluyendo IL-4 e IL-13. El crecimiento inducido (en comparación con las condiciones basales en ausencia

de citoquina) representa la actividad biológica de IL-4 o IL-13. Se demostró que los anticuerpos anti-IL-4, anti-IL-13 y biespecíficos anti-IL-4/IL-13 bloqueaban el crecimiento de células TF-1 inducido por IL-4 o IL-13. Además, se demostró que los anticuerpos biespecíficos anti-IL-4/IL-13 bloqueaban la proliferación de células TF-1 inducida por la estimulación combinada por IL-4 e IL-13. El efecto bloqueante se midió de una manera dependiente de la dosis para generar el valor de CI50 (concentración de anticuerpo a una inhibición de 50%) como potencia de neutralización de anticuerpo contra su diana, es decir, IL-4 o IL-13. Más adelante se describen con más detalle los métodos empleados.

Se mantuvieron células TF-1 (ATCC, CRL-2003) en medio completo (DMEM con alto contenido de glucosa, tampón Hepes 25 mM y glutamina, FBS al 10%, P/S 1x, piruvato sódico 1 mM) que contenía hGM-CSF añadido recientemente a una concentración final de 4 ng/ml 24 horas antes del tratamiento con IL-13 (15 ng/ml) o IL-4 (1 ng/ml). Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a 0,05 x10^6/ml en medio completo sin hGM-CSF. Se preincubaron diluciones seriadas de anticuerpo con la citoquina correspondiente durante 30 minutos a 37ºC antes de la adición a las células. Las células se cultivaron durante 72 horas (37ºC, 5% de CO2). Se añadió solución MTS/PMS de cellTiter 96 Aqueous. Las células después se incubaron durante 3 horas. Después de ese periodo, se registró la absorbancia a 490 nm usando un lector de placas. Los valores de CI50 se calcularon usando el software Speed.

En la Tabla 3 se muestra la cinética de unión y la actividad de neutralización de variantes de B-B13 humanizado. (nt, no ensayado).

Tabla 3

anticuerpo	velocidad de asociación ($M^{-1}\times S^{-1}$)	velocidad de disociación (S-1)	KD (M)	IC50 (M)
B-B13 murino	8,64E+05	3,73E-04	5,63E-10	Nt
chB-B13 WT	1,76E+06	4.61 E-04	2,61E-10	7,4E-9
huB-B13 VL1×VH1	1,74E+06	6.91 E-04	3,96E-10	1,57E-8
huB-B13 VL1×VH3	1,93E+06	3,95E-04	2,05E-10	Nt
huB-B13 VL2×VH2	1,13E+06	1,77E-04	1,57E-10	Nt
huB-B13 VL3×VH1	1,93E+06	3,33E-04	1,72E-10	5,2E-9
huB-B13 VL3×VH2	2,55E+06	1,12E-04	4,39E-11	3,2E-9
huB-B13 VL3×VH3	2,14E+06	4,05E-04	1,89E-10	Nt

Una variante de B-B13 humanizada, huB-B13 VL3xVH2, tiene una afinidad significativamente mayor que el anticuerpo B-B13 murino original (13 veces mayor) y que el anticuerpo B-B13 quimérico (6 veces mayor). La mejor afinidad puede llevar a una mayor potencia y eficacia cuando estos anticuerpos humanizados anti-IL-13 se usan para tratar a pacientes con asma. Además, los anticuerpos humanizados pueden tener una menor inmunogenicidad que el anticuerpo murino o el anticuerpo quimérico cuando se usan en el ser humano.

En la Tabla 4 se muestran la cinética de unión y la actividad de neutralización de variantes humanizadas de 8D4-8.

Tabla 4

anticuerpo	velocidad de asociación (M-1×S-1)	velocidad de disociación (S-1)	KD (M)	IC50 (M)
8D4-8 murino	5,57E+06	2,17E-04	3,77E-11	9,7E-11
ch8D4-8 WT	2,49E+07	1,95E-04	7,83E-12	8,4E-11
Hu8D4-8 VL1×VH1	4,72E+07	1,55E-04	3,29E-12	4,1E-11
Hu8D4.8 VL1×VH2	2,57E+07	3,48E-04	1,39E-11	1,35E-10

Una variante de 8D4-8 humanizada, hu8D4-8 VL1xVH1 tiene una afinidad significativamente mayor que el anticuerpo 8D4-8 murino original (11 veces mayor) y que el anticuerpo 8D4-8 quimérico (2 veces). La mejor afinidad puede llevar a una mayor potencia y eficacia cuando este anticuerpo humanizado anti-IL-4 se usa para tratar a pacientes con asma. Además, el anticuerpo humanizado puede tener una menor inmunogenicidad que el anticuerpo murino o el anticuerpo quimérico cuando se usan en el ser humano.

Ejemplo 7: Clonación y generación de anticuerpos biespecíficos anti-IL-4/IL-13 humanizados

El formato usado para la expresión de anticuerpos biespecíficos (BsAb) es una variante de IgG del formato de cabeza doble de dominio dual descrito en el documento US 5.989.830. En este formato, una molécula de IgG se alarga por su extremo N en las correspondientes cadenas pesadas y ligeras, por un dominio variable adicional de un segundo anticuerpo. De esta manera, la molécula de IgG resultante es un heterotetrámero compuesto de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Las cadenas pesadas consisten en dos dominios pesados variables (VH1-VH2) procedentes de dos anticuerpos diferentes unidos entre sí por un conector compuesto por diez aminoácidos (G4S)2 y fusionados al dominio constante de IgG4. Las cadenas ligeras consisten en dos dominios ligeros variables (VL1-VL2) procedentes de dos anticuerpos diferentes, unidos entre sí por un conector compuesto por diez aminoácidos (G4S)2 y fusionados a la región constante kappa.

Se generaron secuencias para los dominios pesados y ligeros variables de las variantes de 8D4-8 por PCR introduciendo un sitio de restricción BamHI (GGA TCC) en sus extremos 5' respectivos que codifican una parte de $(G4S)_2$-(GGA TCC)-804-8.La secuencia 3’ de la VH de los variantes humanizados 8D4-8 terminaba con un sitio de restricción ApaI (que codifica los primeros aminoácidos del dominio CH1) para una fusión posterior con la secuencia de IGHG4 (Q569F4, con deleción de la Lys terminal y una doble mutación S241P y L248E). El extremo 3’ de VL8D4-8 terminaba con un sitio de restricción BsiWI que codificaba los dos primeros aminoácidos de la cadena constante kappa para una fusión posterior con IGKC (número de registro del GeneBank Q502W4).

Se generaron secuencias para los dominios pesados y ligeros variables de las variantes de B-B13 por PCR introduciendo un sitio de restricción BamHI en sus extremos 3' respectivos que codificaban una parte de (G4S)2-(B-B13)-(GGA GGC GGA GGG TCC GGA GGC GGA GGA TCC (SEC ID Nº: 7)). Las dos secuencias para VH y VL de los variantes B-B13 se generaron con un sitio de restricción NheI en sus respectivos extremos 5', seguido de un codón de inicio ATG y una secuencia codificadora de péptido conductor.

Las VH de B-B13 y de 8D4-8 se fusionaron entre sí a través de sus sitios BamHI dentro del conector (G4S)2. Las VL de B-B13 y de 8D4-8 se fusionaron entre sí a través de sus sitios BamHI dentro del conector (G4S)2. Por lo tanto, los tándems de cadenas pesadas y ligeras generados tenían la siguiente composición.

Cadena pesada de anticuerpo biespecífico: NheI-péptido conductor-VH-B-B13-(G4S)2-VH 8D4-8-ApaI.

Cadena ligera de anticuerpo biespecífico: NheI-péptido conductor-VL-B-B13-(G4S)2-VL 8D4-8-BsiWI.

Todos los fragmentos de PCR intermedios se clonaron en pCR4-TOPO®4 usando el kit de clonación TOPO TA cloning® (nº de catálogo 45-0641) y se secuenciaron usando cebadores M13 en sentido directo y M13 en sentido inverso.

Después de la validación de la secuencia, los tándems de cadena pesada se fusionaron a través de su sitio ApaI con la secuencia de IGHG4 y los tándems de cadena ligera se fusionaron a través de su sitio BsiWI con IGKC. La cadena ligera y la cadena pesada del dominio dual creado se digirieron con NheI y HindIII y cada una se unió a los sitios NheI/HindIII del vector de expresión episómico pXL, creando los plásmidos para la expresión en mamífero de las cadenas pesada y ligera de TBTI respectivamente.

Se generaron cuatro construcciones anti-IL-4/anti-IL-13 biespecíficas humanizadas basándose en las siguientes combinaciones de las versiones de VH y VL humanizadas de B-B13 y 8D4-8, tal como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5

Ab biespecífico anti-IL-4/anti-IL-13	Fv de anti- IL-13	Fv de anti- IL-4
huTBTI3_1_1	B-B13 VL3xVH2	8D4-8 VL1xVH2
huTBTI3_2_1	B-B13 VL3xVH2	8D4-8 VL1xVH1
huTBTI3_1_2	B-B13 VL2xVH2	8D4-8 VL1xVH2
huTBTI3_2_2	B-B13 VL2xVH2	8D4-8 VL1xVH1

Ejemplo 8: Caracterización de los anticuerpos biespecíficos humanizados

Se realizaron ensayos de la actividad de unión y neutralización como se ha descrito en los ejemplos anteriores.

La Tabla 6 representa la cinética de unión de cuatro variantes de anticuerpo anti-IL-4/IL-13 humanizado. Las cuatro construcciones de anticuerpos biespecíficos se unen a IL-4 e IL-13 con altas afinidades.

Tabla 6

	Afinidad por IL-13			Afinidad por IL-4		
BsAB	velocidad de asociación (M-1×S-1)	velocidad de disociación (S-1)	KD (M)	velocidad de asociación (M-1×S-1)	velocidad de disociación (S-1)	KD (M)
huTBTI3-1_1	2,27E+06	1,70E-04	7,47E-11	2,55E+06	3,78E-04	1,48E-10
huTBTI3-2_1	2,17E+06	1,69E-04	7,80E-11	4,00E+06	1,39E-04	3,47E-11
huTBTI3-1_2	8,50E+05	1,64E-04	1,93E-10	2,23E+06	3,08E-04	1,38E-10
huTBTI3-2_2	8,20E+05	2,12E-04	2,59E-10	3,96E+06	1,32E-04	3,32E-11

La actividad de neutralización de las variantes de anticuerpo biespecífico anti-IL-4/IL-13 humanizado se resume en la Tabla 7. Tanto huTBTI3-1_1 como huTBTI3-2_1 neutralizaban completamente la proliferación celular de TF-1 inducida por IL-13 o IL-4 con los valores de CI50 mostrados a continuación.

Tabla 7

Anticuerpo	CI50 (nM) en el ensayo de IL-13	CI50 (nM) en el ensayo de IL-4
huTBTI3-1_1	3,7	1,7
huTBTI3-2_1	4,1	0,32

Es bien sabido que, con una alta frecuencia, un alelo de IL-13 mutante está asociado con el asma (Heinzmann A. et al., 2000, Hum Mol Genet 9, 4, p549-559). Por lo tanto, se estudió la cinética de unión de los anticuerpos biespecíficos a la proteína IL-13 mutante (variante de IL-13 humana R112Q, PeproTech, Rocky Hill, NJ, EE.UU.). Los resultados indicaron que huTBTI3-1_1 y huTBTI3-2_1 se unían a la variante de IL-13 de forma similar a la IL-13 de tipo silvestre.

La Tabla 8 muestra la cinética de unión de moléculas anti-IL-4/IL-13 humanizadas a la proteína IL-13 mutante.

Tabla 8

	afinidad variante IL-13		
BsAB	velocidad de asociación (M-1×S-1)	velocidad de disociación (S-1)	KD (M)
huTBTI3-1_1	9,74E+05	1,18E-04	1,21E-10
huTBTI3-2_1	9,48E+05	2,00E-04	2,11E-10

LISTA DE SECUENCIAS

<110> sanofi-aventis us Inc

Rao, Ercole

Mikol, vincent

Li, Danxi

Kruip, Jochen

Davison, Matthew

<120> ANTICUERPOS QUE UNEN IL-4 Y/O IL-13 Y SUS USOS

<130> 589-148T8

<160> 7

<170> Patentin versión 3.5

<210> 1

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ratón humanizado/ región VL3 de ratón

<400> 1

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

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

Gly Gln Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
    50                  55                  60

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

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

Glu Asp Ser Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 2

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ratón humanizado/ región VH2 de ratón

<400> 2

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Ser
            20                  25                  30

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

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Leu Lys
    50                  55                  60

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

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

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

Ser Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 3

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ratón humanizado/ región VL1 de ratón

<400> 3

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

Asp Thr Ile Thr Leu Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asp Val Trp
            20                  25                  30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

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

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

```
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala His Ser Tyr Pro Phe
                85                  90                  95

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

<210> 4

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ratón humanizado/ región VH1 de ratón

<400> 4

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

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

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

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Thr Arg Leu Lys Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val
            100                 105                 110

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

<210> 5

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ratón humanizado/ región VH2 de ratón

<400> 5

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

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

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

Gly Met Ile Asp Ala Ser Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Thr Arg Leu Lys Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val
            100                 105                 110

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

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ligante

<400> 6

```
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1               5                  10
```

<210> 7

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 7

ggaggcggag ggtccggagg cggaggatcc 30

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humanizado aislado o uno de sus fragmentos de anticuerpo que se une específicamente a IL-13, en donde el anticuerpo o uno de sus fragmentos de anticuerpo comprende una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 1 y comprende una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 2.

2. El anticuerpo o uno de sus fragmentos de anticuerpo según la reivindicación 1, que además comprende dominios de región constante, en donde los dominios de región constante preferiblemente consisten en CH1, CH2, CH3 y CL.

3. El anticuerpo o uno de sus fragmentos de anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el anticuerpo o su fragmento de anticuerpo neutraliza la actividad de la IL-13 y preferiblemente neutraliza la proliferación de células mediadas por IL-13 en células TF-1.

4. El anticuerpo o uno de sus fragmentos de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.

5. El anticuerpo o uno de sus fragmentos según la reivindicación 4, en donde el anticuerpo biespecífico se une específicamente a IL-4 e IL-13.

6. El anticuerpo o uno de sus fragmentos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que además se conjuga a una molécula efectora, en donde la molécula efectora preferiblemente se selecciona del grupo que consiste en polipéptidos heterólogos, fármacos, radionucleótidos y toxinas.

7. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o uno de sus fragmentos de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

8. Una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo o uno de sus fragmentos de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

9. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 8.

10. Una célula hospedante que comprende el vector según la reivindicación 9.

11. Un método para fabricar un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprenden

a) construir un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el anticuerpo o uno de sus fragmentos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5;

b) transferir el vector de expresión a una célula hospedante; y

c) cultivar células transfectadas para producir dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos.

12. El anticuerpo o uno de sus fragmentos de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso en el tratamiento, la supresión o la prevención de una enfermedad.

13. El anticuerpo o uno de sus fragmentos de anticuerpo según la reivindicación 12, en donde la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en enfermedad alérgica, asma, cáncer, una enfermedad autoinmunitaria, esclerodermia y fibrosis pulmonar idiopática.

14. El uso del anticuerpo o fragmento de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en aplicaciones de investigación o diagnóstico in vitro, en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende un marcador tal como un radiomarcador, un fluoróforo, un cromóforo, un agente de formación de imágenes o un ión metálico.

15. Un kit que comprende el anticuerpo o uno de sus fragmentos de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 e instrucciones de uso.

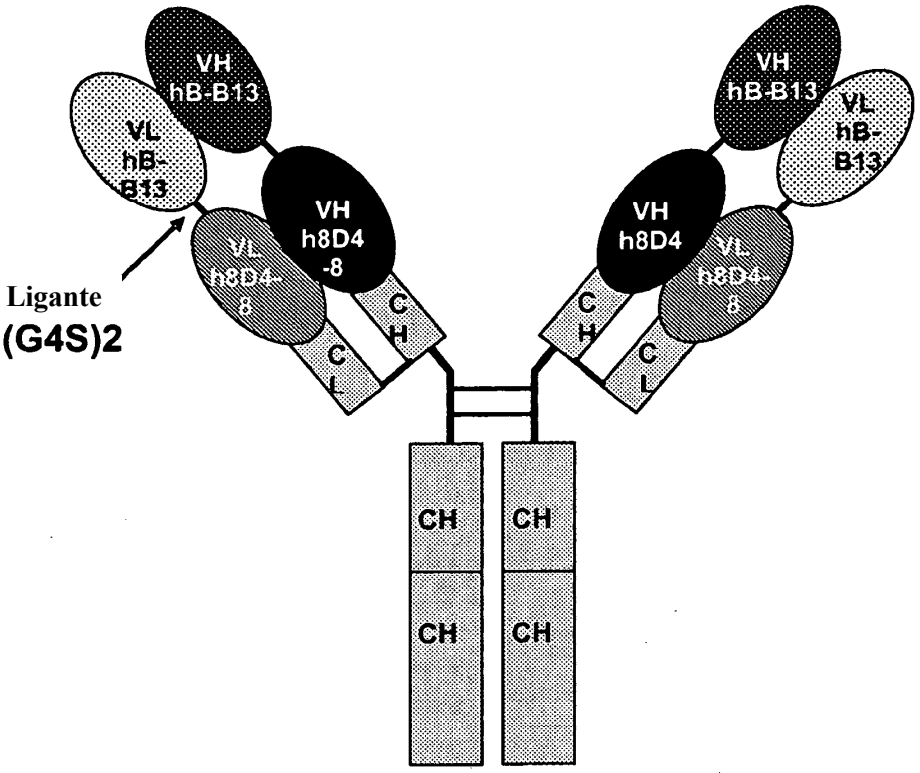
VH
hB-B13
VL
hB-
B13
VH
h8D4
-8
VL
h8D4-
8
Ligante
(G4S)2
C
H
C
L
VH
hB-B13
VL
hB-
B13
VH
h8D4
VL
h8D4-
8
C
H
C
L
CH
CH
CH
CH

FIGURA 1

Anti-IL13 hB-B13 VL3 (SEQ ID NO: 1):
DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISC**RASESVD SYGQSYMH**WY QQKAGQPPKL LIY**LASNLES** GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVQAEDAATY YC**QQNAEDSR TF**GGGTKLEI K

Anti-IL13 hB-B13 VH2 (SEQ ID NO: 2):
EVQLKESGPG LVAPGGSLSI TCTVS**GFSLT DSSIN**WVRQP PGKGLEWLGM IWG**DGRID**YA DALKSRLSIS KDSSKSQVFL EMTSLRTDDT ATYYCAR**DGY FPYAMDF**WGQ GTSVTVSS

Anti-IL4 h8D4-8 VL1 (SEQ ID NO: 3):
DIQMTQSPAS LSVSVGDTIT LTC**HASQNID VWLS**WFQQKP GNIPKLLIY**K ASNLHTG**VPS RFSGSGSGTG FTLTISSLQP EDIATYYC**QQ AHSYPFT**FGG GTKLEIKR

Anti-IL4 h8D4-8 VH1 (SEQ ID NO: 4):
QVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKAS**GYSFT SYWIH**WIKQR PGQGLEWIGM **IDPSDGETR**L NQRFQGRATL TVDESTSTAY MQLRSPTSED SAVYYCTR**LK EYGNYDSFYF DV**WGAGTLVT VSSA

Anti-IL4 h8D4-8 VH2 (SEQ ID NO: 5):
QVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKAS**GYSFT SYWIH**WIKQR PGQGLEWIGM **IDASDGETR**L NQRFQGRATL TVDESTSTAY MQLRSPTSED SAVYYCTR**LK EYGNYDSFYF DV**WGAGTLVT VSSA

FIGURA 2