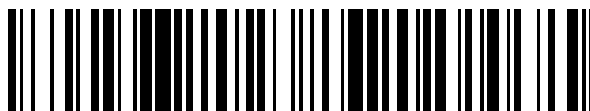


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 032**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2007 PCT/US2007/019660**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.10.2008 WO08127271**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2007 E 07873427 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 2064336**

54 Título: **Proteínas de unión a interleucina-13**

30 Prioridad:

08.09.2006 US 843249 P

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

27.03.2018

73 Titular/es:

**ABBVIE BAHAMAS LTD. (100.0%)
Sassoon House, Shirley Street & Victoria Avenue
New Providence, Nassau, BS**

72 Inventor/es:

**WU, CHENGBIN;
DIXON, RICHARD, W.;
BELK, JONATHAN, P.;
YING, HUA;
ARGIRIADI, MARIA, A.;
CUFF, CAROLYN, A.;
HINTON, PAUL, R.;
KUMAR, SHANKAR;
MELIM, TERRY, L. y
CHEN, YAN**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 661 032 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas de unión a interleucina-13

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a proteínas de unión a IL-13, y específicamente a tales proteínas de unión para su uso en la prevención y/o el tratamiento de diversas enfermedades que incluyen asma, alergia, EPOC, fibrosis y cáncer.

10

Referencia al acuerdo de investigación conjunta

El contenido de esta solicitud se basa en un acuerdo de investigación conjunto celebrado por y entre Protein Design Labs, Inc. y Abbott Laboratories el 14 de diciembre de 2005, y dirigido a anticuerpos de modificados genéticamente para IL-13.

15

Antecedentes de la invención

La IL-13 humana es una glicoproteína de 17 kDa clonada a partir de células T activadas (Zurawski y de Vries 1994 Immunol Today 15 19-26), y es producida por las células T activadas del linaje Th2, aunque las células T Th0 y Th1 CD4+, las células T CDR8+ y varias poblaciones de células no T tales como los mastocitos también producen IL-13 (Zurawski y de Vries 1994 Immunol Today 15 19-26). La función de IL-13 incluye el cambio de isotipo de inmunoglobulina a IgE en células B humanas (Punnonen, Aversa et al. 1993 Proc Natl Acad Sci USA 90 3730-4) y la supresión de la producción de citocinas inflamatorias tanto en seres humanos como en ratones (de Waal Malefyt, Figdor et al. 1993 J Immunol 151 6370-81; Doherty, Kastelein et al. 1993 J Immunol 151 7151-60). La IL-13 se une a sus receptores de superficie celular, IL-13Ralfa1 e IL-13Ralfa2. El IL-13Ralfa1 interacciona con IL-13 con baja afinidad (KD ~ 10 nM), seguido del reclutamiento de IL-4Ra para formar el complejo de receptor heterodimérico de señalización de alta afinidad (KD ~ 0,4 nM) (Aman, Tayebi et al. 1996 J Biol Chem 271 29265-70; Hilton, Zhang et al. 1996 Proc Natl Acad Sci USA 93 497-501). El complejo IL-4R/IL-13Ralfa1 se expresa sobre muchos tipos de células tales como células B, monocitos/macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, basófilos, fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales de las vías respiratorias y células del músculo liso de las vías respiratorias (Graber, Gretener et al. 1998 Eur J Immunol 28 4286-98; Murata, Husain et al. 1998 Int Immunol 10 1103-10; Akaiwa, Yu et al. 2001 Cytokine 13 75-84). La ligación del complejo del receptor IL-13Ralfa1/IL-4R da como resultado la activación de una variedad de vías de transducción de señales que incluyen el transductor de señal y el activador de la transcripción (STAT6) y las vías del sustrato 2 de receptor de insulina (IRS-2) (Wang, Michieli et al. 1995 Blood 86 4218-27; Takeda, Kamanaka et al. 1996 J Immunol 157 3220-2). La cadena de IL-13Ralfa2 sola tiene una alta afinidad (KD ~ 0,25-0,4 nM) para IL-13, y funciona como un receptor señuelo que regula negativamente la unión a IL-13 (Donaldson, Whitters et al. 1998 J Immunol 161 2317-24), y como un receptor de señalización que induce la síntesis de TGF- β y la fibrosis a través de la vía AP-1 en macrófagos y posiblemente otros tipos de células (Fichtner-Feigl, Strober et al. 2006 Nat Med 12 99-106).

20

25

30

35

40

Varios estudios realizados en modelos animales preclínicos para el asma indican que la IL-13 juega un papel importante en el asma. Estos datos incluyen la resistencia al asma en los ratones con el gen de IL-13 inactivado así como la inhibición del fenotipo de asma con antagonistas de IL-13 (receptores de IL-13 solubles, mAb anti-IL-13, etc.) en varios modelos de ratón (Sela 1999 Harefuah 137 317-9; Wills-Karp y Chiaramonte 2003 Curr Opin Pulm Med 9 21-7; Wills-Karp 2004 Immunol Rev 202 175-90). Múltiples estudios han demostrado que la administración farmacológica de IL-13 recombinante a los pulmones de ratones y cobayas induce hiper-secreción de moco en las vías respiratorias, eosinofilia y AHR (Grunig, Warnock et al. 1998 Science 282 2261-3; Wills-Karp, Luyimbazi et al. 1998 Science 282 2258-61; Kibe, Inoue et al. 2003 Am J Respir Crit Care Med 167 50-6; Vargaftig y Singer 2003 Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 284 L260-9; Vargaftig y Singer 2003 Am J Respir Cell Mol Biol 28 410-9). Estos efectos de IL-13 se reproducen en sistemas de ratones transgénicos con expresión constitutiva o inducible de IL-13 (Zhu, Homer et al. 1999 J Clin Invest 103 779-88; Zhu, Lee et al. 2001 Am J Respir Crit Care Med 164 S67-70; Lanone, Zheng et al. 2002 J Clin Invest 110 463-74). La expresión excesiva transgénica crónica de IL-13 también induce fibrosis subepitelial y enfisema. Los ratones que carecen de la molécula de señalización IL-13 (e IL-4) STAT6 no desarrollan AHR inducida por alérgenos ni producción excesiva de moco (Kuperman, Huang et al. 2002 Nat Med 8 885-9). Los estudios que utilizaban la proteína de fusión soluble del receptor de IL-13 (sIL-13Ralfa2Fc) han demostrado el papel fundamental de esta citocina en la enfermedad de las vías respiratorias inducida por el alérgeno ovoalbúmina (OVA) experimental (Grunig, Warnock et al. 1998 Science 282 2261-3; Wills-Karp, Luyimbazi et al. 1998 Science 282 2258-61; Taube, Duez et al. 2002 J Immunol 169 6482-9). La eficacia del tratamiento anti-IL-13 también se demostró en un modelo crónico de asma murina. Además de exhibir características de hipersecreción de moco y AHR, este modelo de asma crónica demuestra varias características de la enfermedad humana que faltan en los modelos más agudos. Estas incluyen la eosinofilia del tejido pulmonar localizado en los espacios inter-epiteliales,

45

50

55

60

así como la fibrosis del músculo liso medida por aumentos en el depósito de colágeno. El modelo de asma crónica es inducido con exposiciones repetidas a aerosoles con OVA en ratones sensibilizados a OVA 1x/semana durante un total de 4 semanas. El anticuerpo anti-IL-13 administrado durante las últimas 2 semanas de exposición a OVA (desde el día 36 con lecturas de eficacia evaluadas en el día 53 del estudio) inhibió significativamente AHR, la inflamación pulmonar, la hiperplasia de células caliciformes, la hipersecreción de moco y la fibrosis de las vías respiratorias (Yang, Li et al. 2005 J Pharmacol Exp Ther). Por otra parte, también se demostró que el efecto terapéutico del antagonista de IL-13 inhibía la AHR en un modelo de asma de primates [Abstract, American Thoracic Society 2005].

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

Debido al papel de la IL-13 humana en una variedad de trastornos humanos, se han diseñado estrategias terapéuticas para inhibir o contrarrestar la actividad de la IL-13. En particular, se han buscado anticuerpos que se unen a, y neutralizan, la IL-13 como un medio para inhibir la actividad de IL-13. Sin embargo, existe una necesidad en la técnica de anticuerpos mejorados capaces de unirse a IL-13. Preferiblemente, los anticuerpos se unen a la IL-13 humana. Preferiblemente, los anticuerpos son capaces de neutralizar la IL-13 humana. La presente invención proporciona una nueva familia de proteínas de unión, anticuerpos injertados con CDR, anticuerpos humanizados y fragmentos de los mismos, capaces de unirse a IL-13 humana, que unen con alta afinidad y que se unen a, y neutralizan la IL-13 humana.

Compendio de la invención

El alcance de la invención y diversas realizaciones de la invención se definen mediante las reivindicaciones adjuntas.

Por consiguiente, la presente invención proporciona una proteína de unión que comprende un dominio de unión a antígeno, siendo capaz dicha proteína de unión de unirse a IL-13, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno seis CDR: CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, y CDR-L3, en donde dichas seis CDR se seleccionan de los conjuntos de CDR (a) a (f) de la siguiente manera:

(a)

CDR-H1 es: S-S-W-I-H (residuos 31-35 de SEQ ID NO: 32),
 CDR-H2 es: M-I-H-P-S-D-S-E-T-R-L-N-O-K-F-K-D (residuos 50-66 de SEQ ID NO: 32),
 CDR-H3 es: T-A-T-D-F-D-Y (residuos 99-105 de SEQ ID NO: 32),
 CDR-L1 es: K-S-T-K-S-L-L-N-S-D-G-F-T-Y-L-D (residuos 24-39 de SEQ ID NO: 33),
 CDR-L2 es: L-V-S-N-R-F-S (residuos 55-61 de SEQ ID NO: 33), y
 CDR-L3 es: F-O-H-N-Y-L-P-L-T (residuos 94-102 de SEQ ID NO: 33);

(b)

CDR-H1 es: T-S-D-M-G-V-D (residuos 31-37 de SEQ ID NO: 46),
 CDR-H2 es: H-I-W-W-D-D-V-K-R-Y-N-P-A-L-K-S (residuos 52-67 de SEQ ID NO: 46),
 CDR-H3 es: T-V-S-S-G-Y-I-Y-A-M-D-Y (residuos 100-112 de SEQ ID NO: 46),
 CDR-L1 es: R-A-S-Q-D-I-R-N-Y-L-N (residuos 24-34 de SEQ ID NO: 47),
 CDR-L2 es: Y-T-S-K-L-H-S (residuos 50-56 de SEQ ID NO: 47), y
 CDR-L3 es: Q-Q-G-N-T-L-P-L-T (residuos 89-97 de SEQ ID NO: 47);

(c)

CDR-H1 es: T-S-D-L-G-V-G (residuos 31-37 de SEQ ID NO: 50),

CDR-H2 es: H-I-W-W-D-D-V-K-R-Y-N-P-A-L-K-S (residuos 52-67 de SEQ ID NO: 50),
 CDR-H3 es: I-G-S-G-Y-I-Y-Y-E-M-D-Y (residuos 100-112 de SEQ ID NO: 50),
 CDR-L1 es: R-A-S-O-D-I-R-N-Y-L-N (residuos 24-34 de SEQ ID NO: 51),
 CDR-L2 es: Y-T-S-R-L-H-S (residuos 50-56 de SEQ ID NO: 51), y
 CDR-L3 es: O-O-G-N-T-L-P-L-T (residuos 89-97 de SEQ ID NO: 51);

(d)

CDR-H1 es: T-S-D-M-G-V-D (residuos 31-37 de SEQ ID NO: 80),
 CDR-H2 es: H-I-W-W-D-D-V-K-R-Y-N-P-A-L-K-S (residuos 52-67 de SEQ ID NO: 80),
 CDR-H3 es: T-V-S-G-Y-I-Y-Y-A-M-D-Y (residuos 100-112 de SEQ ID NO: 80),
 CDR-L1 es: R-A-S-Q-D-I-R-N-Y-L-N (residuos 24-34 de SEQ ID NO: 92),
 CDR-L2 es: Y-T-S-M-K-P-R (residuos 50-56 de SEQ ID NO: 92), y
 CDR-L3 es: residuos Q-Q-G-N-T-L-P-L-T 89-97 de SEQ ID NO: 92);

(e)

CDR-H1 es: T-S-D-M-G-V-D (residuos 31-37 de SEQ ID NO: 80),
 CDR-H2 es: H-I-W-W-D-D-V-K-R-Y-N-P-A-L-K-S (residuos 52-67 de SEQ ID NO: 80),
 CDR-H3 es: T-V-S-G-Y-I-Y-Y-A-M-D-Y (residuos 100-112 de SEQ ID NO: 80),
 CDR-L1 es: R-A-S-Q-D-I-R-N-Y-L-N (restos 24-34 de SEQ ID NO: 93),
 CDR-L2 es: Y-T-S-K-L-H-S (residuos 50-56 de SEQ ID NO: 93), y
 CDR-L3 es: Q-Q-G-L-T-P-P-L-T (residuos 89-97 de SEQ ID NO: 93); o

(f)

CDR-H1 es: T-S-D-M-G-V-D (residuos 31-37 de SEQ ID NO: 80),
 CDR-H2 es: H-I-W-W-D-D-V-K-R-Y-N-P-A-L-K-S (residuos 52-67 de SEQ ID NO: 80),
 CDR-H3 es: T-V-S-G-Y-I-Y-Y-A-M-D-Y (residuos 100-112 de SEQ ID NO: 80),
 CDR-L1 es: R-A-S-Q-D-I-R-N-Y-L-N (residuos 24-34 de SEQ ID NO: 94),
 CDR-L2 es: Y-T-S-M-K-P-R (residuos 50-56 de SEQ ID NO: 94), y
 CDR-L3 es: Q-Q-G-L-T-P-P-L-T (residuos 89-97 de SEQ ID NO: 94).

La presente solicitud se refiere a diversos aspectos y realizaciones de la descripción. En la medida en que dichos aspectos y realizaciones quedan fuera del alcance de la presente invención definido anteriormente y en las reivindicaciones adjuntas, éstos se presentan con fines comparativos.

Esta descripción se refiere a proteínas de unión a IL-13. Las proteínas de unión de la descripción incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, porciones de unión a antígeno y otras proteínas de unión a antígeno capaces de unirse a la IL-13 humana. Se describen adicionalmente métodos para preparar y utilizar proteínas de unión a IL-13.

Un aspecto de la descripción se refiere a una proteína de unión capaz de unirse a IL-13. En una realización preferida, la proteína de unión se une a la IL-13 humana. Preferiblemente, la proteína de unión es capaz de modular una función biológica de IL-13. Más preferiblemente, la proteína de unión es capaz de neutralizar IL-13.

En un aspecto de la descripción, la proteína de unión es capaz de unirse a IL-13 y prevenir la unión de IL-13 al receptor de IL-13 α 1. En otro aspecto de la descripción, la proteína de unión es capaz de unirse a IL-13 y prevenir la unión de IL-13 al receptor de IL-13 α 2. En una realización preferida, la proteína de unión es capaz de unirse a IL-13 y prevenir la unión de IL-13 tanto al receptor de IL-13 α 1 como a IL-13 α 2.

Una realización de la descripción proporciona un anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo se unen a IL-13 humana e inhiben la unión de dicha IL-13 al receptor de IL-13 α 2 en un análisis de unión al receptor basado en la superficie celular con una CI_{50} seleccionada del grupo que consiste en aproximadamente $1,5 \times 10^{-8}$ a 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} a 1×10^{-9} M, 10^{-9} a 10^{-10} M y 10^{-10} a 10^{-11} M o en un análisis de unión a receptor basado en ELISA con una CI_{50} seleccionada del grupo que consiste en aproximadamente $1,8 \times 10^{-8}$ a 1×10^{-8} M, 1×10^{-8} a 1×10^{-9} M, 10^{-9} a 10^{-10} M y 10^{-10} a 10^{-11} M. Preferiblemente, el anticuerpo se une a la IL-13 humana e inhibe la unión de dicha IL-13 al receptor de IL-13 α 2 en un análisis de unión al receptor basado en la superficie celular con una CI_{50} de $2,7 \times 10^{-9}$ M y en un análisis de unión a receptor basado en ELISA con una CI_{50} de $1,1 \times 10^{-9}$ M. Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se unen a IL-13 humana e inhiben la unión de dicha IL-13 al receptor IL-13 α 2 en un análisis de unión a receptor basado en superficie celular o en un análisis de unión a receptor basado en ELISA de aproximadamente 70-100% a una

concentración de 100 nM. Preferiblemente, el anticuerpo es 13C5.5. Más preferiblemente, el anticuerpo no es BAK502G9, mAb13.2 ni MJ2-7.

En otro aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo se unen a IL-13 humana e inhiben la AHR en aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% en un modelo de asma inducido por IL-13 humana. Preferiblemente, el anticuerpo inhibe la AHR en más de 86% en un modelo de asma inducido por IL-13 humana. En otra realización, el anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se unen a IL-13 humana e inhiben la AHR en aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80% 90% o 100% e inhiben la producción de moco en aproximadamente 40%, 50 %, 60%, 70%, 80% 90% o 100% en un modelo de asma inducido por IL-13 humana. Preferiblemente, el anticuerpo es 13C5.5. Más preferiblemente, el anticuerpo no es BAK502G9, mAb13.2 ni MJ2-7.

En una realización, la proteína de unión de la descripción tiene una constante de velocidad de asociación (k_{on}) para IL-13 de al menos aproximadamente $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; al menos aproximadamente $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; al menos aproximadamente $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; al menos aproximadamente $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; o al menos aproximadamente $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, medida por resonancia de plasmón superficial. Preferiblemente, la proteína de unión de la descripción tiene una constante de velocidad de asociación (k_{on}) para IL-13 entre $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; entre $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; entre $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; o entre $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, medida por resonancia de plasmón superficial.

En otra realización, la proteína de unión de la descripción tiene una constante de velocidad de disociación (k_{off}) para IL-13 de a lo sumo aproximadamente 10^{-3}s^{-1} ; a lo sumo aproximadamente 10^{-4}s^{-1} ; a lo sumo aproximadamente 10^{-5}s^{-1} ; o a lo sumo aproximadamente 10^{-6}s^{-1} , medida por resonancia de plasmón superficial. Preferiblemente, la proteína de unión de la descripción tiene una constante de velocidad de disociación (k_{off}) para IL-13 de 10^{-3}s^{-1} a 10^{-4}s^{-1} ; de 10^{-4}s^{-1} a 10^{-5}s^{-1} ; o de 10^{-5}s^{-1} a 10^{-6}s^{-1} , medida por resonancia de plasmón superficial.

En otra realización, la proteína de unión de la descripción tiene una constante de disociación en equilibrio (K_D) para IL-13 de a lo sumo aproximadamente 10^{-7} M ; a lo sumo aproximadamente 10^{-8} M ; a lo sumo aproximadamente 10^{-9} M ; a lo sumo aproximadamente 10^{-10} M ; a lo sumo aproximadamente 10^{-11} M ; a lo sumo aproximadamente 10^{-12} M ; o a lo sumo 10^{-13} M . Preferiblemente, la proteína de unión de la descripción tiene una constante de disociación en equilibrio (K_D) para IL-13 de 10^{-7} M a 10^{-8} M ; de 10^{-8} M a 10^{-9} M ; de 10^{-9} M a 10^{-10} M ; de 10^{-10} a 10^{-11} M ; de 10^{-11} M a 10^{-12} M ; o de 10^{-12} a 10^{-13} M .

Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se unen a IL-13 con características de unión seleccionadas del grupo que consiste en: a) una constante de velocidad de asociación (k_{on}) entre aproximadamente $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o aproximadamente $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, o b) una constante de velocidad de disociación (k_{off}) de aproximadamente 10^{-4}s^{-1} a 10^{-5}s^{-1} ; o de aproximadamente 10^{-5}s^{-1} a 10^{-6}s^{-1} , medido por resonancia de plasmón superficial; o c) una constante de disociación en equilibrio (K_D) de aproximadamente $1,5 \times 10^{-10}$ a $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ o aproximadamente 10^{-10} a 10^{-11} M . Preferiblemente, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo tienen una constante de velocidad de asociación (k_{on}) para IL-13 seleccionada del grupo que consiste en: $6,68 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $7,86 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $8,35 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $8,69 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $9,15 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $1,26 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $1,7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $2,51 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo tienen una constante de velocidad de disociación (k_{off}) para IL-13 seleccionada del grupo que consiste en: $1,23 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$; $1,76 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$; $4,74 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$; $1,91 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$; $2,14 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$; $3,82 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$; $8,81 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$ y $9,65 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$, medida por resonancia de plasmón superficial. Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo tienen una constante de disociación en equilibrio (K_D) para IL-13 seleccionada del grupo que consiste en: $1,05 \times 10^{-10} \text{ M}$; $7,10 \times 10^{-10} \text{ M}$; $1 \times 10^{-11} \text{ M}$; $2,20 \times 10^{-11} \text{ M}$; $2,72 \times 10^{-11} \text{ M}$; $4,17 \times 10^{-11} \text{ M}$; $5,68 \times 10^{-11} \text{ M}$; $7,01 \times 10^{-11} \text{ M}$; $7,10 \times 10^{-11} \text{ M}$; y $9,79 \times 10^{-11} \text{ M}$.

Un aspecto de la descripción se refiere a proteínas de unión capaces de unirse a un epítipo específico sobre IL-13. Preferiblemente, el epítipo específico comprende la región de la Hélice D C-terminal de la IL-13 humana. Más preferiblemente, el epítipo específico comprende la secuencia de aminoácidos VRDTK IEVAQ FVKDL LL HLK KLFRE GR, que corresponde a los aminoácidos 104-130 de SEQ ID NO. 1. En otro aspecto, el anticuerpo o porción de unión a antígeno se unen a un epítipo que comprende la región de la Hélice D C-terminal y la región de la Hélice A N-terminal de IL-13 humana. Preferiblemente, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo se unen a IL-13 humana de manera que se inhibe la unión de la IL-13 con dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, unidos al epítipo definido por las regiones topográficas Ser26-Thr27-Ala28-Leu29-Arg30-Glu31-Leu32-Ile33-Glu34-Glu35-Leu36-Val37-Asn38 y Lys123-Lys124-Leu125-Phe126-Arg127-Glu-128-Gly129-Arg130 de SEQ ID No. 1 al receptor de IL-13. Preferiblemente, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo se unen a IL-13 humana de manera que se inhibe la unión de la IL-13 con dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, unidos al epítipo definido por las regiones topográficas Arg30-Glu31-Leu32-Ile33-Glu34-Glu35- Leu36-Val37-Asn38 y Lys123-Lys124-Leu125-Phe126-Arg127 de SEQ ID NO. 1 al receptor de IL-13. Preferiblemente, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo se unen a IL-13 humana de manera que se inhibe la unión de la IL-13 con dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, unidos al epítipo definido por las

regiones topográficas Ser26-Thr27-Ala28-Leu29-Arg30-Glu31-Leu32-Ile33-Glu34-Glu35-Leu36-Val37-Asn38 y Lys123-Lys124-Leu125-Phe126-Arg127-Glu-128-Gly129-Arg130 de SEQ ID NO. 1 al receptor de IL-13 α 2. Más preferiblemente, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo se unen a IL-13 humana de manera que se inhibe la unión de la IL-13 con dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, unidos al epítipo definido por las regiones topográficas Ser26-Thr27-Ala28-Leu29-Arg30-Glu31-Leu32-Ile33-Glu34-Glu35-Leu36-Val37-Asn38 y Lys123-Lys124-Leu125-Phe126-Arg127-Glu-128-Gly129-Arg130 de SEQ ID NO. 1 al receptor de IL-13 α 2, siempre que dicho anticuerpo no sea BAK502G9 o MJ2-7. Muy preferiblemente, el anticuerpo es 13C5.5.

En un aspecto, el anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se unen a IL-13 y evitan la unión de IL-13 al receptor de IL-13 α 2 con características de unión seleccionadas del grupo que consiste en la unión a un epítipo en IL-13 incluyendo la Hélice A y D; una constante de velocidad asociación (k_{on}) entre aproximadamente $10^5 M^{-1}s^{-1}$ y $10^6 M^{-1}s^{-1}$ o aproximadamente $10^6 M^{-1}s^{-1}$ y $10^7 M^{-1}s^{-1}$; una constante de velocidad de disociación (k_{off}) de aproximadamente $10^{-4}s^{-1}$ a $10^{-5}s^{-1}$; o de aproximadamente $10^{-5}s^{-1}$ a $10^{-6}s^{-1}$, medida por resonancia de plasmón superficial; y una constante de disociación en equilibrio (K_D) de aproximadamente $1,5 \times 10^{-10}$ a 1×10^{-10} M o aproximadamente 10^{-10} a 10^{-11} M. En otro aspecto, el anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une a la variante de IL-13 y evita la unión de la variante de IL-13 al receptor de IL-13 α 2 con características de unión seleccionadas del grupo que consiste en unión a un epítipo en IL-13 incluyendo la Hélice A y D; una constante de velocidad de asociación (k_{on}) entre aproximadamente $10^5 M^{-1}s^{-1}$ y $10^6 M^{-1}s^{-1}$ o aproximadamente $10^6 M^{-1}s^{-1}$ y $10^7 M^{-1}s^{-1}$; una constante de velocidad de disociación (k_{off}) de aproximadamente $10^{-4}s^{-1}$ a $10^{-5}s^{-1}$; o de aproximadamente $10^{-5}s^{-1}$ a $10^{-6}s^{-1}$, medida por resonancia de plasmón superficial; y una constante de disociación en equilibrio (K_D) de aproximadamente $1,5 \times 10^{-10}$ a 1×10^{-10} M o aproximadamente 10^{-10} a 10^{-11} M.

En un aspecto, la descripción proporciona una proteína de unión capaz de unirse a IL-13, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

CDR-H1. X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇ (SEQ ID NO: 64), en donde;

X₁ es T, D, G, o S;

X₂ es S;

X₃ es D;

X₄ es M, S, Y, L, o H;

X₅ es G, W, Y, A, S, o N;

X₆ es V, I, o M; t

X₇ es D, H, S, Y, N, o G;

CDR-H2. X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-X₁₅-X₁₆-X₁₇ (SEQ ID NO: 65), en donde;

X₁ es M, E, H, R, S, G, o L;

X₂ es I o no está presente;

X₃ es H, Y, A, D, S, o W;

X₄ es P, S, W, o G;

X₅ es S, G, E, o D;

X₆ es D, G, S, E, o N;

X₇ es S, Y o G;

X₈ es E, N, Y, V, o R;

X₉ es T, I, o K;

X₁₀ es R, Y, I, D, o A;

X₁₁ es L, Y, D, o F;

X₁₂ es N, P, S, o D;

X₁₃ es Q, E, D, P, o S;

X₁₄ es K, M, S, T, A, o V;

X₁₅ es F, L, V, o M;

X₁₆ es K, R, o Q; y

X₁₇ es D, G, o S;

CDR-H3. X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄ (SEQ ID NO: 66), en donde;

X₁ es W, T, G, Y, D, o I;

X₂ es R, A, S, G, o V;

X₃ es T, F, Y, o S;

X₄ es S, T, o Y;

X₅ es Y, F, o G;

ES 2 661 032 T3

5 X₆ es F, o Y;
 X₇ es S, Y, I, o F;
 X₈ es D, L, Y, o P;
 X₉ es Y;
 X₁₀ es G;
 X₁₁ es Y, A, P, o E;
 X₁₂ es F, M, S, L, o I;
 X₁₃ es D, V, N, o K; y
 X₁₄ es Y, o F;

10 CDR-L1. X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-X₁₅ X₁₆-X₁₇ (SEQ ID NO: 67), en donde;

15 X₁ es K, o R;
 X₂ es S, o A;
 X₃ es S o T;
 X₉ es Q, K, o I;
 X₅ es N, S, T, G, o E;
 X₆ es L, T, o S;
 X₇ es L, Q, o V;
 20 X₈ es Y, N, H, D, o T;
 X₉ es S, I, o T;
 X₁₀ es S, D, N, H, o Y;
 X₁₁ es N, o G;
 X₁₂ es Q;
 25 X₁₃ es K, F, N, E, o S;
 X₁₄ es N, T, o S;
 X₁₅ es Y, o F;
 X₁₆ es L, A, o M; y
 X₁₇ es A, D, E, H, o N

30 CDR-L2. X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇ (SEQ ID NO: 68), en donde;

35 X₁ es L, S, K, T, W, o Y;
 X₂ es V, T, o A;
 X₃ es S, o N;
 X₄ es N, K, T, M, o R;
 X₅ es R, K, o L;
 X₆ es F, D, E, H, P, o A; y
 X₇ es S, R, o P;

40 y

CDR-L3. X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉ (SEQ ID NO: 69), en donde;

45 X₁ es F, W, Q o A;
 X₂ es Q o L;
 X₃ es H, G, Y, W, o N;
 X₄ es N, S, T, L, o Y;
 X₅ es Y, T, S, E, o H;
 50 X₆ es L, V, F, Y, N, G, P, o D;
 X₇ es P, o H;
 X₈ es L, F, Y, W, o R; y
 X₉ es T, o V.

55 Preferiblemente, el dominio de unión a antígeno comprende al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

residuos 31-35 de SEQ ID NO: 32;	residuos 52-67 de SEQ ID NO: 48;
residuos 50-66 de SEQ ID NO: 32;	residuos 100-112 de SEQ ID NO: 48;
residuos 99-105 de SEQ ID NO: 32;	residuos 24-34 de SEQ ID NO: 49;
residuos 24-39 de SEQ ID NO: 33;	residuos 50-56 de SEQ ID NO: 49;

ES 2 661 032 T3

los residuos 55-61 de SEQ ID NO: 33;	residuos 89-97 de SEQ ID NO: 49;
residuos 94-102 de la SEC ID NO: 33;	residuos 31-37 de SEQ ID NO: 50;
residuos 31-35 de SEQ ID NO: 34;	residuos 52-67 de SEQ ID NO: 50;
los residuos 50-66 de SEQ ID NO: 34;	residuos 100-112 de SEQ ID NO: 50;
residuos 99-105 de SEQ ID NO: 34;	residuos 24-34 de SEQ ID NO: 51;
residuos 24-39 de SEQ ID NO: 35;	residuos 50-56 de SEQ ID NO: 51;
residuos 55-61 de SEQ ID NO: 35;	residuos 89-97 de SEQ ID NO: 51;
residuos 94-102 de SEQ ID NO: 35;	residuos 31-35 de SEQ ID NO: 52;
residuos 31-35 de SEQ ID NO: 36;	los residuos 50-66 de SEQ ID NO: 52;
los residuos 50-66 de SEQ ID NO: 36;	residuos 99-107 de la SEC ID NO: 52;
residuos 99-109 de SEC ID NO: 36;	residuos 23-36 de SEQ ID NO: 53;
residuos 24-39 de SEQ ID NO: 37;	residuos 52-58 de SEQ ID NO: 53;
residuos 55-61 de SEQ ID NO: 37;	residuos 91-99 de SEQ ID NO: 53;
residuos 94-102 de SEC ID NO: 37;	residuos 31-35 de SEQ ID NO: 54;
residuos 31-35 de SEQ ID NO: 38;	residuos 50-65 de SEQ ID NO: 54;
residuos 50-66 de SEQ ID NO: 38;	residuos 98-107 de SEC ID NO: 54;
residuos 99-109 de SEQ ID NO: 38;	residuos 24-38 de SEQ ID NO: 55;
residuos 31-35 de SEQ ID NO: 39;	residuos 54-60 de SEQ ID NO: 55;
residuos 50-66 de SEQ ID NO: 39;	residuos 93-101 de SEC ID NO: 55;
residuos 99-112 de SEQ ID NO: 39;	residuos 31-35 de SEQ ID NO: 56;
residuos 24-39 de SEQ ID NO:40;	residuos 50-65 de SEQ ID NO: 56;
los residuos 55-61 de SEQ ID NO:40;	residuos 98-107 de SEQ ID NO: 56;
residuos 94-102 de SEQ ID NO:40;	residuos 24-38 de SEQ ID NO: 57;
residuos 31-35 de SEQ ID NO: 41;	residuos 54-60 de SEQ ID NO: 57;
residuos 50-66 de SEQ ID NO: 41;	residuos 93-101 de SEQ ID NO: 57;
residuos 99-112 de SEQ ID NO: 41;	residuos 31-35 de SEQ ID NO: 58;
residuos 31-35 de SEQ ID NO: 42;	residuos 50-65 de SEQ ID NO: 58;
residuos 50-66 de SEQ ID NO: 42;	residuos 98-107 de SEQ ID NO: 58;
residuos 99-100 de SEQ ID NO: 42;	residuos 24-38 de SEQ ID NO: 59;
residuos 24-39 de SEQ ID NO:43;	residuos 54-60 de SEQ ID NO: 59;
residuos 55-61 de SEQ ID NO: 43;	residuos 93-101 de SEC ID NO: 59;
residuos 94-102 de SEQ ID NO: 43;	residuos 31-35 de SEQ ID NO: 60;
residuos 31-35 de SEQ ID NO: 44;	residuos 50-65 de SEQ ID NO: 60;
residuos 50-65 de SEQ ID NO: 44;	residuos 98-107 de SEQ ID NO: 60;
residuos 98-106 de SEQ ID NO: 44;	residuos 24-38 de SEQ ID NO: 61;
residuos 24-40 de SEQ ID NO: 45;	residuos 54-60 de SEQ ID NO: 61;
residuos 56-62 de SEQ ID NO: 45;	residuos 93-101 de SEC ID NO: 61;
residuos 95-103 de SEQ ID NO: 45;	residuos 31-35 de SEQ ID NO: 62;
residuos 31-37 de SEQ ID NO: 46;	residuos 50-65 de SEQ ID NO: 62;

ES 2 661 032 T3

residuos 52-67 de SEQ ID NO: 46;	residuos 98-107 de SEQ ID NO: 62;
residuos 100-112 de SEQ ID NO: 46;	residuos 24-38 de SEQ ID NO: 63;
residuos 24-34 de SEQ ID NO:47;	residuos 54-60 de SEQ ID NO: 63;
los residuos 50-56 de SEQ ID NO: 47;	Y
residuos 89-97 de SEQ ID NO: 47;	residuos 93-101 de SEQ ID NO: 63.
residuos 31-37 de SEQ ID NO: 48;	

En una realización preferida, la proteína de unión comprende al menos 3 CDR seleccionadas de un conjunto de CDR de dominio variable que consiste en:

Conjunto de CDR 5C8 VH	
VH 25C8 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO: 32
VH 25C8 CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 32
VH 25C8 CDR-H3	Residuos 99-105 de SEQ ID NO: 32
Conjunto de CDR 25C8 VL	
VL 25C8 CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 33
VL 25C8 CDR-L2	Residuos 55-61 de SEQ ID NO: 33
VL 25C8 CDR-L3	Residuos 94-102 de SEQ ID NO: 33
Conjunto de CDR 9C11 VH	
VH 9C11 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO: 34
VH 9C11 CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 34
VH 9C11 CDR-H3	Residuos 99-105 de SEQ ID NO: 34
Conjunto de CDR 9C11 VL	
VL 9C11 CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 35
VL 9C11 CDR-L2	Residuos 55-61 de SEQ ID NO: 35
VL 9C11 CDR-L3	Residuos 94-102 de SEQ ID NO: 35
Conjunto de CDR 21D9 VH	
VH 21D9 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO: 36
VH 21D9 CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 36
VH 21D9 CDR-H3	Residuos 99-109 de SEQ ID NO: 36
Conjunto de CDR 21D9 VL	
VL 21D9 CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 37
VL 21D9 CDR-L2	Residuos 55-61 de SEQ ID NO: 37
VL 21D9 CDR-L3	Residuos 94-102 de SEQ ID NO: 37
Conjunto de CDR 22D10 VH	
VH 22D10 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO: 38
VH 22D10 CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 38
VH 22D10 CDR-H3	Residuos 99-109 de SEQ ID NO: 38
Conjunto de CDR 22D10 VL	
VL 22D10 CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 37

ES 2 661 032 T3

Conjunto de CDR 22D10 VL	
VL 22D10 CDR-L2	Residuos 55-61 de SEQ ID NO: 37
VL 22D10 CDR-L3	Residuos 94-102 de SEQ ID NO: 37
Conjunto de CDR 5F1 VH	
VH 5F1 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO: 39
VH 5F1 CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 39
VH 5F1 CDR-H3	Residuos 99-112 de SEQ ID NO: 39
Conjunto de CDR 5F1 VL	
VL 5F1 CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 40
VL 5F1 CDR-L2	Residuos 55-61 de SEQ ID NO: 40
VL 5F1 CDR-L3	Residuos 94-102 de SEQ ID NO: 40
VH 5G1 CDR Set	
VH 5G1 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO: 41
VH 5G1 CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 41
VH 5G1 CDR-H3	Residuos 99-112 de SEQ ID NO: 41
VL 5G1 CDR Set	
VL 5G1 CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 40
VL 5G1 CDR-L2	Residuos 55-61 de SEQ ID NO: 40
VL 5G1 CDR-L3	Residuos 94-102 de SEQ ID NO: 40
VH 3H7 CDR Set	
VH 3H7 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO: 42
VH 3H7 CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 42
VH 3H7 CDR-H3	Residuos 99-100 de SEQ ID NO: 42
Conjunto de CDR 3H7 VL	
VL 3H7 CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 43
VL 3H7 CDR-L2	Residuos 55-61 de SEQ ID NO: 43
VL 3H7 CDR-L3	Residuos 94-102 de SEQ ID NO: 43
Conjunto de CDR 14B2 VH	
VH 14B2 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO: 44
VH 14B2 CDR-H2	Residuos 50-65 de SEQ ID NO: 44
VH 14B2 CDR-H3	Residuos 98-106 de SEQ ID NO: 44
Conjunto de CDR 14B2 VL	
VL 14B2 CDR-L1	Residuos 24-40 de SEQ ID NO: 45
VL 14B2 CDR-L2	Residuos 56-62 de SEQ ID NO: 45
VL 14B2 CDR-L3	Residuos 95-103 de SEQ ID NO: 45
Conjunto de CDR 13C5 VH	
VH 13C5 CDR-H1	Residuos 31-37 de SEQ ID NO: 46
VH 13C5 CDR-H2	Residuos 52-67 de SEQ ID NO: 46

ES 2 661 032 T3

Conjunto de CDR 13C5 VH	
VH 13C5 CDR-H3	Residuos 100-112 de SEQ ID NO: 46
Conjunto de CDR 13C5 VL	
VL 13C5 CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID NO: 47
VL 13C5 CDR-L2	Residuos 50-56 de SEQ ID NO: 47
VL 13C5 CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID NO: 47
Conjunto de CDR 29G5 VH	
VH 29G5 CDR-H1	Residuos 31-37 de SEQ ID NO: 48
VH 29G5 CDR-H2	Residuos 52-67 de SEQ ID NO: 48
VH 29G5 CDR-H3	Residuos 100-112 de SEQ ID NO: 48
Conjunto de CDR 29G5 VL	
VL 29G5 CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID NO: 49
VL 29G5 CDR-L2	Residuos 50-56 de SEQ ID NO: 49
VL 29G5 CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID NO: 49
Conjunto de CDR 33C3 VH	
VH 33C3 CDR-H1	Residuos 31-37 de SEQ ID NO: 50
VH 33C3 CDR-H2	Residuos 52-67 de SEQ ID NO: 50
VH 33C3 CDR-H3	Residuos 100-112 de SEQ ID NO: 50
Conjunto de CDR 33C3 VL	
VL 33C3 CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID NO: 51
VL 33C3 CDR-L2	Residuos 50-56 de SEQ ID NO: 51
VL 33C3 CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID NO: 51
Conjunto de CDR 4A8 VH	
VH 4A8 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO: 52
VH 4A8 CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 52
VH 4A8 CDR-H3	Residuos 99-107 de SEQ ID NO: 52
Conjunto de CDR 4A8 VL	
VL 4A8 CDR-L1	Residuos 23-36 de SEQ ID NO: 53
VL 4A8 CDR-L2	Residuos 52-58 de SEQ ID NO: 53
VL 4A8 CDR-L3	Residuos 91-99 de SEQ ID NO: 53
Conjunto de CDR 1B6 VH	
VH 1B6 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO: 54
VH 1B6 CDR-H2	Residuos 50-65 de SEQ ID NO: 54
VH 1B6 CDR-H3	Residuos 98-107 de SEQ ID NO: 54
Conjunto de CDR 1B6 VL	
VL 1B6 CDR-L1	Residuos 24-38 de SEQ ID NO: 55
VL 1B6 CDR-L2	Residuos 54-60 de SEQ ID NO: 55
VL 1B6 CDR-L3	Residuos 93-101 de SEQ ID NO: 55

Conjunto de CDR 3E5 VH	
VH 3E5 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO: 56
VH 3E5 CDR-H2	Residuos 50-65 de SEQ ID NO: 56
VH 3E5 CDR-H3	Residuos 98-107 de SEQ ID NO: 56
Conjunto de CDR 3E5 VL	
VL 3E5 CDR-L1	Residuos 24-38 de SEQ ID NO: 57
VL 3E5 CDR-L2	Residuos 54-60 de SEQ ID NO: 57
VL 3E5 CDR-L3	Residuos 93-101 de SEQ ID NO: 57
Conjunto CDR 6C8 VH	
VH 6C8 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO: 58
VH 6C8 CDR-H2	Residuos 50-65 de SEQ ID NO: 58
VH 6C8 CDR-H3	Residuos 98-107 de SEQ ID NO: 58
Conjunto CDR 6C8 VL	
VL 6C8 CDR-L1	Residuos 24-38 de SEQ ID NO: 59
VL 6C8 CDR-L2	Residuos 54-60 de SEQ ID NO: 59
VL 6C8 CDR-L3	Residuos 93-101 de SEQ ID NO: 59
Conjunto de CDR 5D3 VH	
VH 5D3 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO: 60
VH 5D3 CDR-H2	Residuos 50-65 de SEQ ID NO: 60
VH 5D3 CDR-H3	Residuos 98-107 de SEQ ID NO: 60
Conjunto de CDR 5D3 VL	
VL 5D3 CDR-L1	Residuos 24-38 de SEQ ID NO: 61
VL 5D3 CDR-L2	Residuos 54-60 de SEQ ID NO: 61
VL 5D3 CDR-L3	Residuos 93-101 de SEQ ID NO: 61
Conjunto de CDR 8B6 VH	
VH 8B6 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO: 62
VH 8B6 CDR-H2	Residuos 50-65 de SEQ ID NO: 62
VH 8B6 CDR-H3	Residuos 98-107 de SEQ ID NO: 62
Conjunto de CDR 8B6 VL	
VL 8B6 CDR-L1	Residuos 24-38 de SEQ ID NO: 63
VL 8B6 CDR-L2	Residuos 54-60 de SEQ ID NO: 63
VL 8B6 CDR-L3	Residuos 93-101 de SEQ ID NO: 63

- Preferiblemente, la proteína de unión comprende al menos dos conjuntos de CDR de dominio variable.
- 10 Preferiblemente, al menos dos conjuntos de CDR de dominio variable se seleccionan del grupo que consiste en:
- Conjunto de CDR 25C8 VH y Conjunto de CDR 25C8 VL;
 - Conjunto de CDR 9C11 VH y Conjunto de CDR 9C11 VL;
 - Conjunto de CDR 21D9 VH y Conjunto de CDR 21D9 VL;
 - Conjunto de CDR 22D10 VH y Conjunto de CDR 22D10 VL;
 - 15 Conjunto de CDR 5F1 VH y Conjunto de CDR 5F1 VL;
 - Conjunto de CDR 5G1 VH y Conjunto de CDR 5G1 VL;
 - Conjunto de CDR 3H7 VH y Conjunto de CDR 3H7 VL;

- 5 Conjunto de CDR 14B2 VH y Conjunto de CDR 14B2 VL;
- Conjunto de CDR 13C5 VH y Conjunto de CDR 13C5 VL;
- Conjunto de CDR 29G5 VH y Conjunto de CDR 29G5 VL;
- Conjunto de CDR 33C3 VH y Conjunto de CDR 33C3 VL;
- Conjunto de CDR 4A8 VH y Conjunto de CDR 4A8 VL;
- Conjunto de CDR 1 B6 VH y Conjunto de CDR 1 B6 VL;
- Conjunto de CDR 3E5CDR VH y Conjunto de CDR 3E5 VL;
- Conjunto de CDR 6C8 VH y Conjunto de CDR 6C8 VL;
- 10 Conjunto de CDR 5D3 VH y Conjunto de CDR 5D3 VL; y
- Conjunto de CDR 8B6 VH y Conjunto de CDR 8B6 VL.

En otra realización, la proteína de unión descrita anteriormente comprende adicionalmente un marco aceptor humano. Preferiblemente, el marco aceptor humano comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 26
SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 27
SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 28
SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 29
SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 30
SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 21	Y
SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 31
SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 23	
SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 24	
SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 25	

- 15 En una realización preferida, la proteína de unión es un anticuerpo injertado con CDR o una porción de unión a antígeno del mismo capaces de unirse a IL-13. Preferiblemente, el anticuerpo injertado con CDR o la porción de unión a antígeno del mismo comprenden una o más CDR descritas anteriormente. Preferiblemente, el anticuerpo injertado con CDR o la porción de unión a antígeno del mismo comprenden un marco aceptor humano. Más preferiblemente, el marco aceptor humano es cualquiera de los marcos aceptores humanos descritos anteriormente.

- 20 En una realización preferida, la proteína de unión es un anticuerpo humanizado o una porción de unión a antígeno del mismo capaces de unirse a IL-13. Preferiblemente, el anticuerpo humanizado o la porción de unión a antígeno del mismo comprenden una o más CDR descritas anteriormente incorporadas en un dominio variable de anticuerpo humano de un marco aceptor humano. Preferiblemente, el dominio variable de anticuerpo humano es un dominio variable humano de consenso. Más preferiblemente, el marco aceptor humano comprende al menos una sustitución de aminoácidos de la Región Marco en un residuo clave, en donde el residuo clave se selecciona del grupo que consiste en un residuo adyacente a una CDR; un residuo del sitio de glicosilación; un residuo raro; un residuo capaz de interactuar con IL-13 humana; un residuo capaz de interactuar con una CDR; un residuo canónico; un residuo de contacto entre la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera; un residuo dentro de una zona de Vernier; y un residuo en una región que se solapa entre una CDR1 de cadena pesada variable definida por Chothia y un primer marco de cadena pesada definido por Kabat. Preferiblemente, el marco aceptor humano comprende al menos una sustitución de aminoácido de la Región Marco, en donde la secuencia de aminoácidos del marco es al menos 65% idéntica a la secuencia de dicho marco aceptor humano y comprende al menos 70 residuos de aminoácido idénticos a dicho marco aceptor humano. Preferiblemente, la sustitución de aminoácidos de la Región Marco en un residuo clave se selecciona del grupo que consiste en 2L, 15L, 22L, 41L, 42L, 44L, 49L, 50L, 51L, 62L, 71L, 73L, 10H, 44H, 46H, 48H, 67H, 68H, 70H, 72H, 74H, 76H, 83H, 84H, 86H, 87H, y 97H.

- 35 En una realización preferida, la proteína de unión es un anticuerpo humanizado o una porción de unión a antígeno del mismo capaces de unirse a IL-13. Preferiblemente, el anticuerpo humanizado o porción de unión a antígeno del mismo comprenden una o más CDR descritas anteriormente. Más preferiblemente, el anticuerpo humanizado, o porción de unión a antígeno del mismo, comprenden tres o más CDR descritas anteriormente. Lo más preferiblemente, el anticuerpo humanizado, o porción de unión a antígeno del mismo comprenden seis CDR descritas anteriormente.

45

En otra realización de la descripción, el anticuerpo humanizado o la porción de unión a antígeno del mismo comprenden al menos un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en;

SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 77	SEQ ID NO: 84
SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 78	SEQ ID NO: 85
SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 79	SEQ ID NO: 92
SEQ ID NO: 73	SEQ ID NO: 80	SEQ ID NO: 93
SEQ ID NO: 74	SEQ ID NO: 81	Y
SEQ ID NO: 75	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 94.
SEQ ID NO: 76	SEQ ID NO: 83	

5 Más preferiblemente, el anticuerpo humanizado o la porción de unión a antígeno del mismo comprenden dos dominios variables seleccionados del grupo descrito anteriormente. Más preferiblemente, la proteína de unión comprende dos dominios variables, en donde dichos dos dominios variables tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en;

10 SEQ ID NO: 70 y SEQ ID NO: 71,
 SEQ ID NO: 72 y SEQ ID NO: 73,
 SEQ ID NO: 74 y SEQ ID NO: 75,
 SEQ ID NO: 76 y SEQ ID NO: 77,
 SEQ ID NO: 78 y SEQ ID NO: 79,
 15 SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 81,
 SEQ ID NO: 82 y SEQ ID NO: 83,
 SEQ ID NO: 84 y SEQ ID NO: 85
 SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 92,
 SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 93, y
 20 SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 94.

Una realización de la descripción se proporciona una construcción de anticuerpo que comprende cualquiera de las proteínas de unión descritas anteriormente y un polipéptido conector o una inmunoglobulina. En una realización preferida, la construcción del anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en una molécula de inmunoglobulina, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo injertado con CDR, un anticuerpo humanizado, un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un Fv, un Fv unido por disulfuro, un scFv, un anticuerpo de dominio único, un diacuerpo, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo dual específico y un anticuerpo biespecífico. En una realización preferida, la construcción de anticuerpo comprende un dominio constante de inmunoglobulina de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en un dominio constante de IgM humana, un dominio constante de IgG1 humana, un dominio constante de IgG2 humana, un dominio constante de IgG3 humana, un dominio constante de IgG4 humana, un dominio constante de IgE humana, y un dominio constante de IgA humana. Más preferiblemente, la construcción de anticuerpo comprende SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; y SEQ ID NO: 5. En otra realización, la descripción proporciona un producto conjugado de anticuerpo que comprende una construcción de anticuerpo descrita anteriormente y un agente seleccionado del grupo que consiste en; una molécula de inmunoadherencia, un agente de formación de imágenes, un agente terapéutico y un agente citotóxico. En una realización preferida, el agente de formación de imágenes se selecciona del grupo que consiste en una radiomarca, una enzima, una marcar fluorescente, una marca luminiscente, una marca bioluminiscente, una marca magnética y biotina. Más preferiblemente, el agente de formación de imágenes es una radiomarca seleccionada del grupo que consiste en: ³H, ¹⁴C, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁷⁷Lu, ¹⁶⁶Ho, y ¹⁵³Sm. En una realización preferida, el agente terapéutico o citotóxico se selecciona del grupo que consiste en; un antimetabolito, un agente alquilante, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citocina, un agente antiangiogénico, un agente antimitótico, una antraciclina, una toxina y un agente apoptótico.

En otra realización, la construcción del anticuerpo está glicosilada. Preferiblemente, la glicosilación es un patrón de glicosilación humano.

En otra realización, la proteína de unión, la construcción de anticuerpo o el producto conjugado de anticuerpo descritos anteriormente existen en forma de un cristal. Preferiblemente, el cristal es un cristal de liberación controlada farmacéutico libre de portador. En una realización preferida, la proteína de unión cristalizada, la construcción de anticuerpo cristalizada o el producto conjugado de anticuerpo cristalizado tienen una semivida

mayor in vivo que su equivalente soluble. En otra realización preferida, la proteína de unión cristalizada, la construcción de anticuerpo cristalizada o el producto conjugado de anticuerpo cristalizado conservan la actividad biológica después de la cristalización.

5 Un aspecto de la descripción se refiere a una proteína de unión a DVD que comprende proteínas de unión capaces de unirse a IL-13. Preferiblemente, la proteína de unión a DVD es capaz de unirse a IL-13 y a una segunda diana. La segunda diana se selecciona del grupo que consiste en CSF1 (M-CSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (G-CSF), FGF2, IFN α 1, IFN β 1, IFN γ , histamina y receptores de histamina, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12 α , IL-12 β , IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, KITLG, PDGFB, IL-2R α , IL-4R, IL-5R α , IL-8R α , IL-8R β , IL-12R β 1, IL-12R β 2, IL-13R α 1, IL-13R α 2, IL-18R1, TSLP, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13, CCL 17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL22, CCL24, CX3CL1, CXCL1, CXCL2, CXCL3, XCL1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CX3CR1, GPR2, XCR1, FOS, GATA3, JAK1, JAK3, STAT6, TBX21, TGFB1, TNFSF6, YY1, CYSLTR1, FCER1A, FCER2, LTB4R, TB4R2, LTBR, y Quitinasa. Más preferiblemente, la proteína DVD es capaz de reconocer IL-13 e IL-1 β , IL-13 e IL-9; IL-13 e IL-4; IL-13 e IL-5; IL-13 e IL-25; IL-13 y TARC; IL-13 y MDC; IL-13 y MIF; IL-13 y TGF- β ; Agonista de IL-13 y LHR; IL-13 y CL25; IL-13 y SPRR2a; IL-13 y SPRR2b; o IL-13 y ADAM8. Más preferiblemente, la proteína DVD es capaz de unirse a IL-13 y TNF α .

20 Un aspecto de la descripción se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de la proteína de unión, la construcción de anticuerpo o el producto conjugado de anticuerpo descritos anteriormente. Una realización adicional proporciona un vector que comprende el ácido nucleico aislado descrito anteriormente en donde dicho vector se selecciona del grupo que consiste en pcDNA; pTT (Durocher et al., *Nucleic Acids Research* 2002, Vol. 30, Núm. 2); pTT3 (pTT con sitio de clonación múltiple adicional; pEFBOS (Mizushima, S. y Nagata, S., (1990) *Nucleic acids Research* Vol. 18, No. 17); pBV; pJV; y pBJ.

25 En otro aspecto, una célula anfitriona se transforma con el vector descrito anteriormente. Preferiblemente, la célula anfitriona es una célula procariota. Más preferiblemente, la célula anfitriona es E. Coli. En una realización relacionada, la célula anfitriona es una célula eucariota. Preferiblemente, la célula eucariota se selecciona del grupo que consiste en una célula protista, célula animal, célula vegetal y célula fúngica. Más preferiblemente, la célula anfitriona es una célula de mamífero que incluye, pero no se limita a, CHO y COS; o una célula fúngica tal como *Saccharomyces cerevisiae*; o una célula de insecto tal como Sf9.

35 Otro aspecto de la descripción proporciona un método para producir una proteína de unión que se une a IL-13, que comprende cultivar cualquiera de las células anfitrionas descritas anteriormente en un medio de cultivo en condiciones suficientes para producir una proteína de unión que se une a IL-13. Otra realización proporciona una proteína de unión producida de acuerdo con el método descrito anteriormente.

40 Una realización proporciona una composición para la liberación de una proteína de unión en donde la composición comprende una formulación que a su vez comprende una proteína de unión cristalizada, una construcción de anticuerpo cristalizado o un producto conjugado de anticuerpo cristalizado como se describe anteriormente y un ingrediente; y al menos un portador polimérico. Preferiblemente, el portador polimérico es un polímero seleccionado entre uno o más del grupo que consiste en: poli(ácido acrílico), poli(cianoacrilatos), poli(aminoácidos), poli(anhídridos), poli(depsipéptido), poli(ésteres), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-co-glicólico) o PLGA, poli(b-hidroxitirato), poli(caprolactona), poli(dioxanona); poli(etilenglicol), poli((hidroxipropil)metacrilamida, poli[(organo)fosfaceno], poli(orto-ésteres), poli(alcohol vinílico), poli(vinilpirrolidona), copolímeros de anhídrido maleico-alquil vinil éter, polioles plurónicos, albúmina, alginato, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glicaminoglicanos, polisacáridos sulfatados, mezclas y copolímeros de los mismos. Preferiblemente, el ingrediente se selecciona del grupo que consiste en albúmina, sacarosa, trehalosa, lactitol, gelatina, hidroxipropil- β -ciclodextrina, metoxipolietilenglicol y polietilenglicol. Otra realización proporciona un método para el tratamiento de un mamífero que comprende la etapa de administrar al mamífero una cantidad eficaz de la composición descrita anteriormente.

55 La descripción también proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión, una construcción de anticuerpo o un producto conjugado de anticuerpo como se describe anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización adicional, la composición farmacéutica comprende al menos un agente terapéutico adicional para el tratamiento de un trastorno en el que la actividad de IL-13 es perjudicial. Preferiblemente, el agente adicional se selecciona del grupo que consiste en: agente terapéutico, agente formador de imágenes, agente citotóxico, inhibidores de la angiogénesis (que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-VEGF o trampa de VEGF); inhibidores de quinasas (que incluyen pero no se limitan a inhibidores de KDR y TIE-2); bloqueadores de moléculas de coestimulación (que incluyen, pero no se limitan a, anti-B7.1, anti-B7.2, CTLA4-Ig, anti-CD20); bloqueadores de moléculas de adherencia (que incluyen, pero no se limitan a, Ab anti-LFA-1, Ab anti-LFA-1, Ab anti-E/L-selectina, inhibidores de molécula pequeña); anticuerpo anti-citocina o fragmento funcional del mismo (incluyendo, pero no limitado a, anticuerpos anti-IL-18, anti-TNF, anti-IL-6/receptor de citocina); metotrexato;

ciclosporina; rapamicina; FK506; marca detectable o informador; un antagonista de TNF; un agente antirreumático; un relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano, un antipsoriásico, un corticosteroide, un esteroide anabólico, una eritropoyetina, una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona de crecimiento, un fármaco de reemplazo hormonal, un radiofármaco, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, un medicamento para el asma, un beta-agonista, un esteroide inhalado, una epinefrina o análogo, una citocina, y un antagonista de citocina.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un método para inhibir la actividad de IL-13 humana que comprende poner en contacto IL-13 humana con una proteína de unión descrita anteriormente de manera que se inhiba la actividad de la IL-13 humana. En un aspecto relacionado, se describe en la presente un método para inhibir la actividad de IL-13 humana en un sujeto humano que padece un trastorno en el que la actividad de IL-13 es perjudicial, que comprende administrar al sujeto humano una proteína de unión descrita anteriormente de manera que la actividad de IL-13 en el sujeto humano es inhibida y se logra el tratamiento.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un método para tratar (p.ej., curar, suprimir, mejorar, retrasar o prevenir la aparición de, o prevenir la recurrencia o recaída de) o prevenir un trastorno asociado con IL-13, en un sujeto. El método incluye: administrar al sujeto un agente de unión a IL-13 (particularmente un antagonista), p.ej., un anticuerpo anti-IL-13 o fragmento del mismo como se describe aquí, en una cantidad suficiente para tratar o prevenir el trastorno asociado con IL-13. El antagonista de IL-13, p.ej., el anticuerpo anti-IL-13 o fragmento del mismo, se pueden administrar al sujeto, solos o combinados con otras modalidades terapéuticas como se describe en la presente memoria.

En una realización, el sujeto es un mamífero, p.ej., un ser humano que padece uno o más trastornos asociados con IL-13, que incluyen, p.ej., trastornos respiratorios (p.ej., asma (p.ej., asma alérgica y no alérgica), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y otras afecciones que implican inflamación de las vías respiratorias, eosinofilia, fibrosis y exceso de producción de moco, trastornos atópicos (p.ej., dermatitis atópica y rinitis alérgica), afecciones inflamatorias y/o autoinmunitarias de la piel, órganos gastrointestinales (p.ej., enfermedad inflamatoria intestinal (EII), tal como colitis ulcerosa y/o enfermedad de Crohn), e hígado (p.ej., cirrosis, fibrosis); esclerodermia, tumores o cánceres, p.ej., linfoma de Hodgkin como se describe en la presente memoria. Por consiguiente, la descripción incluye el uso de un agente de unión a IL-13 (tal como un anticuerpo anti-IL-13 o fragmento del mismo descrito en la presente memoria) para un tratamiento descrito en la presente memoria y el uso de un agente de unión a IL-13 (tal como un anticuerpo anti-IL-13 o fragmento del mismo descrito en la presente memoria) para preparar un medicamento para un tratamiento descrito en la presente memoria. Los ejemplos de trastornos asociados con IL-13 incluyen, pero no se limitan a, un trastorno seleccionado entre uno o más de: trastornos respiratorios, p.ej., asma (p.ej., asma alérgica y no alérgica (p.ej., asma debida a infección con, p.ej., virus respiratorio sincitial (RSV), p.ej., en niños más pequeños), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y otras afecciones que implican inflamación de las vías respiratorias, eosinofilia, fibrosis y producción excesiva de moco, p.ej., fibrosis quística y fibrosis pulmonar; trastornos atópicos, p.ej., que resultan de un aumento de sensibilidad a IL-13 (p.ej., dermatitis atópica, urticaria, eczema, rinitis alérgica y enterogastritis alérgica); afecciones inflamatorias y/o autoinmunitarias de la piel (p.ej., dermatitis atópica), órganos gastrointestinales (p.ej., enfermedades inflamatorias intestinales (EII), tales como colitis ulcerativa y/o enfermedad de Crohn), hígado (p.ej., cirrosis, carcinoma hepatocelular), y esclerodermia; tumores o cánceres (p.ej., tumores de tejidos blandos o sólidos), tales como leucemia, glioblastoma y linfoma, p.ej., linfoma de Hodgkin; infecciones virales (p.ej., por HTLV-1); fibrosis de otros órganos, p.ej., fibrosis del hígado (p.ej., fibrosis causada por un virus de hepatitis B y/o C); y supresión de la expresión de respuestas inmunitarias protectoras de tipo 1 (p.ej., durante la vacunación), como se describe en la presente memoria.

En otras realizaciones, esta solicitud proporciona un método para tratar (p.ej., reducir, mejorar) o prevenir uno o más síntomas asociados con un trastorno respiratorio, p.ej., asma (p.ej., asma alérgica y no alérgica); alergias; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); una afección que implica inflamación de las vías respiratorias, eosinofilia, fibrosis y producción excesiva de moco, p.ej., fibrosis quística y fibrosis pulmonar. Por ejemplo, los síntomas del asma incluyen, entre otros, sibilancias, dificultad para respirar, broncoconstricción, hiperreactividad de las vías respiratorias, disminución de la capacidad pulmonar, fibrosis, inflamación de las vías respiratorias y producción de moco. El método comprende administrar al sujeto un antagonista de IL-13, p.ej., un anticuerpo para IL-13 o un fragmento del mismo, en una cantidad suficiente para tratar (p.ej., reducir, mejorar) o prevenir uno o más síntomas. El anticuerpo para IL-13 se puede administrar terapéutica o profilácticamente, o ambas cosas. El antagonista de IL-13, p.ej., el anticuerpo anti-IL-13, o fragmento del mismo, se pueden administrar al sujeto, solos o combinados con otras modalidades terapéuticas como se describe en la presente memoria. Preferiblemente, el sujeto es un mamífero, p.ej., un ser humano que padece un trastorno asociado con IL-13 como se describe en la presente memoria.

En otro aspecto, esta solicitud proporciona un método para detectar la presencia de IL-13 en una muestra in vitro (p.ej., una muestra biológica, tal como suero, plasma, tejido, biopsia). El presente método se puede utilizar para diagnosticar un trastorno, p.ej., un trastorno asociado a células inmunitarias. El método incluye: (i) poner en contacto la muestra o una muestra de control con el anticuerpo anti-IL-13 o fragmento del mismo como se describe en la presente memoria; y (ii) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-IL-13 o fragmento del mismo, y la muestra o la muestra control, en donde un cambio estadísticamente significativo en la formación del complejo en la muestra con respecto a la muestra control es indicativo de la presencia del IL-13 en la muestra.

En otro aspecto más, esta solicitud proporciona un método para detectar la presencia de IL-13 in vivo (p.ej., formación de imágenes in vivo en un sujeto). El presente método se puede utilizar para diagnosticar un trastorno, p.ej., un trastorno asociado a IL-13. El método incluye: (i) administrar el anticuerpo anti-IL-13 o fragmento del mismo como se describe en la presente memoria a un sujeto o sujeto de control en condiciones que permitan la unión del anticuerpo o fragmento a IL-13; y (ii) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo o fragmento e IL-13, en donde un cambio estadísticamente significativo en la formación del complejo en el sujeto en relación con el sujeto de control es indicativo de la presencia de IL-13.

En otro aspecto, las proteínas de unión de la descripción son útiles para tratar un trastorno seleccionado del grupo que consiste en artritis, osteoartritis, artritis crónica juvenil, artritis séptica, artritis de Lyme, artritis psoriásica, artritis reactiva, espondiloartropatía, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, enfermedad inflamatoria intestinal, diabetes mellitus dependiente de insulina, tiroiditis, asma, enfermedades alérgicas, psoriasis, dermatitis escleroderma, enfermedad de injerto contra anfitrión, rechazo de trasplante de órganos, enfermedad inmunitaria aguda o crónica asociada con trasplante de órganos, sarcoidosis, aterosclerosis, coagulación intravascular diseminada, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Grave, síndrome nefrótico, síndrome de fatiga crónica, granulomatosis de Wegener, púrpura de Henoch-Schoenlein, vasculitis microscópica de los riñones, hepatitis crónica activa, uveítis, choque séptico, síndrome de choque tóxico, síndrome de sepsis, caquexia, enfermedades infecciosas, enfermedades parasitarias, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, mielitis transversa aguda, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, apoplejía, cirrosis biliar primaria, anemia hemolítica, tumores malignos, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, enfermedad de Addison, deficiencia poliglandular de tipo I y deficiencia poliglandular de tipo II, síndrome de Schmidt, síndrome de dificultad respiratoria del adulto (agudo), alopecia, alopecia areata, artropatía seronegativa, artropatía, enfermedad de Reiter, artropatía psoriásica, artropatía colítica ulcerativa, sinovitis enteropática, clamidia, artropatía asociada a Yersinia y Salmonella, espondiloartropatía, enfermedad ateromatosa/arteriosclerosis, alergia atópica, enfermedad ampollosa autoinmunitaria, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, penfigoide, enfermedad de IgA lineal, anemia hemolítica autoinmunitaria, anemia hemolítica positiva de Coombs, anemia perniciosa adquirida, anemia perniciosa juvenil, encefalitis miálgica/Enfermedad de Royal Free, candidiasis mucocutánea crónica, arteritis de células gigantes, hepatitis esclerosante primaria, hepatitis autoinmunitaria criptogénica, síndrome de enfermedad de inmunodeficiencia adquirida, enfermedades relacionadas con la inmunodeficiencia adquirida, hepatitis B, hepatitis C, inmunodeficiencia común variada (hipogammaglobulinemia variable común), miocardiopatía dilatada, infertilidad femenina, insuficiencia ovárica, insuficiencia ovárica prematura, enfermedad pulmonar fibrótica, alveolitis fibrosante criptogénica, enfermedad pulmonar intersticial post-inflamatoria, neumonitis intersticial, enfermedad pulmonar intersticial asociada a enfermedad del tejido conectivo, enfermedad pulmonar asociada a enfermedad del tejido conectivo mixta, enfermedad pulmonar intersticial asociada a esclerosis sistémica, enfermedad pulmonar intersticial asociada a artritis reumatoide, enfermedad pulmonar asociada a lupus eritematoso sistémico, enfermedad pulmonar asociada a dermatomiositis/polimiositis, enfermedad pulmonar asociada a enfermedad de Sjögren, enfermedad pulmonar asociada a espondilitis anquilosante, enfermedad pulmonar difusa vasculítica, enfermedad pulmonar asociada a hemosiderosis, enfermedad pulmonar intersticial intermitente inducida por fármaco, fibrosis, fibrosis por radiación, bronquiolitis obliterante, neumonía eosinófila crónica, enfermedad pulmonar infiltrativa linfocítica, enfermedad pulmonar intersticial postinfecciosa, artritis gotosa, hepatitis autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria de tipo 1 (hepatitis autoinmunitaria clásica o lupoide), hepatitis autoinmunitaria de tipo 2 (hepatitis del anticuerpo anti-LKM), hipoglucemia mediada por el sistema inmunitario, resistencia a la insulina tipo B con Acanthosis nigricans, hipoparatiroidismo, enfermedad inmunitaria aguda asociada con trasplante de órganos, enfermedad inmunitaria crónica asociada con trasplante de órganos, osteoartritis, colangitis esclerosante primaria, psoriasis tipo 1, psoriasis tipo 2, leucopenia idiopática, neutropenia autoinmunitaria, enfermedad renal NOS, glomerulonefritis, vasculitis microscópica de los riñones, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso discoide, infertilidad masculina idiopática o NOS, autoinmunidad espermática, esclerosis múltiple (todos los subtipos), oftalmía simpática, hipertensión pulmonar secundaria a enfermedad del tejido conectivo, síndrome de Goodpasture, manifestación pulmonar de poliarteritis nodosa, fiebre reumática aguda, espondilitis reumatoide, enfermedad de Still, esclerosis sistémica, síndrome de Sjögren, enfermedad de Takayasu/arteritis, trombocitopenia autoinmunitaria, trombocitopenia idiopática, enfermedad tiroidea autoinmunitaria, hipertiroidismo, hipertiroidismo, hipotiroidismo autoinmunitario goitroso (enfermedad de Hashimoto), hipotiroidismo autoinmunitario atrófico, mixedema primario, uveítis facogénica, vasculitis primaria, enfermedad hepática aguda por vitiligo, enfermedades hepáticas crónicas, cirrosis alcohólica, lesión hepática inducida por el alcohol, coleostasis, hepatopatía idiosincrásica, hepatitis inducida por fármacos,

esteatohepatitis no alcohólica, alergia y asma, infección por estreptococos del grupo B (GBS), trastornos mentales (p.ej., depresión y esquizofrenia), enfermedades tipo Th2 y tipo Th1, dolor agudo y crónico (diferentes formas de dolor) y cánceres como cáncer de pulmón, mama, estómago, vejiga, colon, páncreas, ovario, próstata y rectal y neoplasias malignas hematopoyéticas (leucemia y linfoma), abetalipoproteinemia, acrocianosis, procesos parasitarios o infecciosos agudos y crónicos, leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA), infección bacteriana aguda o crónica, pancreatitis aguda, insuficiencia renal aguda, adenocarcinomas, latidos ectópicos aéreos, complejo de demencia por SIDA, hepatitis inducida por alcohol, conjuntivitis alérgica, dermatitis alérgica de contacto, rinitis alérgica, rechazo de aloinjertos, deficiencia de alfa-1-antitripsina, esclerosis lateral amiotrófica, anemia, angina de pecho, degeneración de células del cuerno anterior, terapia anti-cd3, síndrome antifosfolipídico, reacciones de hipersensibilidad anti-receptor, aneurismas aórticos y periféricos, disección aórtica, hipertensión arterial, arteriosclerosis, fistula arteriovenosa, ataxia, fibrilación auricular (sostenida o paroxística), aleteo auricular, bloqueo auriculoventricular, linfoma de células B, rechazo de injerto óseo, rechazo de trasplante de médula ósea, bloqueo de rama, linfoma de Burkitt, quemaduras, arritmias cardíacas, síndrome de aturdimiento miocárdico, tumores cardíacos, cardiomiopatía, respuesta de inflamación por derivación cardiopulmonar, rechazo de trasplante de cartilago, degeneraciones corticales cerebelosas, trastornos cerebelosos, taquicardia auricular caótica o multifocal, trastornos asociados a la quimioterapia, leucemia mielocítica crónica (LMC), alcoholismo crónico, patologías inflamatorias crónicas, leucemia linfocítica crónica (LLC), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), intoxicación crónica con salicilato, carcinoma colorrectal, insuficiencia cardíaca congestiva, conjuntivitis, dermatitis de contacto, cor pulmonale, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, sepsis negativa del cultivo, fibrosis quística, trastornos asociados con la terapia con citocinas, demencia pugilística, enfermedades desmielinizantes, fiebre hemorrágica del dengue, dermatitis, afecciones dermatológicas, diabetes, diabetes mellitus, enfermedad aterosclerótica diabética, enfermedad por cuerpos de Lewy difusos, miocardiopatía congestiva dilatada, trastornos de los ganglios basales, síndrome de Down en personas de mediana edad, trastornos del movimiento inducidos por fármacos inducidos por fármacos que bloquean los receptores de dopamina del SNC, sensibilidad a los medicamentos, eccema, encefalomiелitis, endocarditis, endocrinopatía, epiglotitis, infección por virus Epstein-Barr, eritromelalgia, trastornos extrapiramidales y cerebelosos, linfocitosis hematofagocítica familiar, rechazo de implantes de timo fetal, ataxia de Friedreich, trastornos arteriales periféricos funcionales, sepsis fúngica, gangrena gaseosa, úlcera gástrica, nefritis glomerular, rechazo del injerto de cualquier órgano o tejido, sepsis gram negativa, sepsis gram positiva, granulomas debidos a organismos intracelulares, leucemia de células pilosas, enfermedad de Hallerorden-Spatz, tiroiditis de Hashimoto, fiebre del heno, rechazo de trasplante de corazón, hemacromatosis, hemodiálisis, síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombótica, hemorragia, hepatitis (A), arritmias del haz de His, infección por VIH/neuropatía por VIH, enfermedad de Hodgkin, trastornos del movimiento hipercinético, reacciones de hipersensibilidad, neumonitis por hipersensibilidad, hipertensión, trastornos del movimiento hipocinético, evaluación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal, enfermedad de Addison idiopática, fibrosis pulmonar idiopática, citotoxicidad mediada por anticuerpos, astenia, atrofia muscular espinal infantil, inflamación de la aorta, radiación ionizante, iridoclititis/uveítis/neuritis óptica, lesión por isquemia-reperfusión, apoplejía isquémica, artritis reumatoide juvenil, atrofia muscular espinal juvenil, sarcoma de Kaposi, rechazo de trasplante renal, legionella, leishmaniasis, lepra, lesiones del sistema corticoespinal, lipedema, rechazo de trasplante hepático, linfedema, malaria, linfoma maligno, histiocitosis maligna, melanoma maligno, meningitis, meningococemia, síndrome metabólico/idiopático, cefalea migrañosa, trastorno mitocondrial multisistémico, enfermedad mixta del tejido conectivo, gammapatía monoclonal, mieloma múltiple, degeneraciones de sistemas múltiples (Mencel Dejerine-Thomas Shi-Drager y Machado-Joseph), miastenia grave, Mycobacterium avium intracelular, Mycobacterium tuberculosis, síndrome mielodisplásico, infarto de miocardio, trastornos isquémicos miocárdicos, carcinoma nasofaríngeo, enfermedad pulmonar neonatal crónica, nefritis, nefrosis, enfermedades neurodegenerativas, atrofia muscular neurogénica I, fiebre neutropénica, linfoma no Hodgkin, oclusión de la aorta abdominal y sus ramas, trastornos arteriales oclusivos, terapia okt3, orquitis/epididimitis, orquitis/procedimientos de reversión de vasectomía, organomegalia, osteoporosis, rechazo de trasplante de páncreas, carcinoma pancreático, síndrome paraneoplásico/hipercalcemia por neoplasia maligna, rechazo de trasplante paratiroideo, enfermedad inflamatoria pélvica, rinitis perenne, enfermedad pericárdica, enfermedad periférica aterosclerótica, trastornos vasculares periféricos, peritonitis, anemia perniciosa, neumonía por Pneumocystis carinii, neumonía, síndrome POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammapatía monoclonal y síndrome de cambios en la piel), síndrome post-perfusión, síndrome post-bomba, síndrome post-cardiotomía por infarto de miocardio, preeclampsia, parálisis supranuclear progresiva, hipertensión pulmonar primaria, radioterapia, fenómeno y enfermedad de Raynaud, enfermedad de Raynaud, enfermedad de Refsum, taquicardia QRS estrecha regular, hipertensión renovascular, lesión por perfusión, miocardiopatía restrictiva, sarcomas, escleroderma, corea senil, demencia senil de tipo cuerpos de Lewy, artropatías seronegativas, choque, anemia de células falciformes, rechazo de aloinjerto de piel, síndrome de cambios cutáneos, rechazo de trasplante de intestino delgado, tumores sólidos, arritmias específicas, ataxia espinal, degeneraciones espinocerebelosas, miositis estreptocócica, lesiones estructurales del cerebelo, panencefalitis esclerosante subaguda Síncope, sífilis del sistema cardiovascular, anafilaxia sistémica, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, artritis reumatoide juvenil de inicio sistémico, LLA de células T o FAB, telangiectasia, tromboangiitis obliterante, trombocitopenia, toxicidad, trasplantes, traumatismo/hemorragia, reacciones de hipersensibilidad de tipo III, hipersensibilidad de tipo IV, angina

inestable, uremia, urosepsis, urticaria, enfermedades valvulares del corazón, venas varicosas, vasculitis, enfermedades venosas, trombosis venosa, fibrilación ventricular, infecciones virales y fúngicas, encefalitis viral/meningitis aséptica, síndrome hemafagocítico asociado a virus, Síndrome de Wernicke-Korsakoff, enfermedad de Wilson, rechazo de xenoinjertos de cualquier órgano o tejido, síndromes coronarios agudos, polineuritis idiopática aguda, polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria aguda, isquemia aguda, enfermedad de Still del adulto, alopecia areata, anafilaxia, síndrome del anticuerpo antifosfolípido, anemia aplásica, arteriosclerosis, eczema atópico, dermatitis atópica, dermatitis autoinmunitaria, trastorno autoinmunitario asociado con infección por Streptococcus, enteropatía autoinmunitaria, pérdida auditiva autoinmunitaria, síndrome linfoproliferativo autoinmunitario (ALPS), miocarditis autoinmunitaria, insuficiencia ovárica prematura autoinmunitaria, blefaritis, bronquiectasias, penfigoide bulloso, enfermedad cardiovascular, síndrome antifosfolipídico catastrófico, enfermedad celíaca, espondilosis cervical, Isquemia crónica, penfigoide cicatricial, síndrome aislado clínicamente (CIS) con riesgo de esclerosis múltiple, conjuntivitis, trastorno psiquiátrico de inicio en la niñez, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), dacriocistitis, dermatomiositis, retinopatía diabética, diabetes mellitus, hernia de disco, prolapso de disco, Anemia hemolítica inmunitaria inducida por fármacos, endocarditis, endometriosis, endoftalmitis, epiescleritis, eritema multiforme, eritema multiforme mayor, penfigoide gestacional, síndrome de Guillain-Barré (GBS), fiebre del heno, síndrome de Hughes, enfermedad de Parkinson idiopática, neumonía intersticial idiopática, Alergia mediada por IgE, anemia hemolítica inmunitaria, miositis por cuerpos de inclusión, enfermedad inflamatoria ocular infecciosa, enfermedad desmielinizante inflamatoria, enfermedad cardíaca inflamatoria, enfermedad renal inflamatoria, IPF/UIP, iritis, queratitis, queratoconjuntivitis seca, enfermedad de Kussmaul o enfermedad de Kussmaul-Meier, Parálisis de Landry, histiocitosis de células de Langerhans, Livedo reticularis, degeneración macular, poliangiitis microscópica, Morbus Bechterev, trastornos de las neuronas motoras, penfigoide de la membrana mucosa, insuficiencia orgánica múltiple, miastenia grave, síndrome mielodisplásico, miocarditis, trastornos de la raíz nerviosa, neuropatía, Hepatitis no A no B, neuritis óptica, osteólisis, artritis reumatoide juvenil pauciarticular, enfermedad oclusiva de la arteria periférica (EOAP), enfermedad vascular periférica (EVP), enfermedad arterial periférica (EAP), flebitis, poliarteritis nodosa (o periarteritis nodosa), policondritis, polimialgia reumática, poliosis, artritis reumatoide juvenil poliarticular, síndrome de deficiencia poliendocrina, polimiositis, polimialgia reumática (PMR), Síndrome post-bomba, parkinsonismo primario, prostatitis, aplasia pura de glóbulos rojos, insuficiencia suprarrenal primaria, neuromielitis óptica recidivante, reestenosis, cardiopatía reumática, SAPHO (sinovitis, acné, pustulosis, hiperostosis y osteítis), escleroderma, amiloidosis secundaria, choque pulmonar, escleritis, ciática, insuficiencia suprarrenal secundaria, enfermedad del tejido conectivo asociada a silicona, dermatosis de Sneddon-Wilkinson, espondilitis anquilosante, síndrome de Stevens-Johnson (SSJ), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, arteritis temporal, retinitis toxoplásmica, necrólisis epidérmica tóxica, mielitis transversa, TRAPS (Receptor del factor de necrosis tumoral, reacción alérgica de tipo 1, diabetes tipo II, urticaria, neumonía intersticial habitual (PIU), vasculitis, conjuntivitis vernal, retinitis viral, síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada (síndrome VKH), degeneración macular húmeda y curación de heridas.

En otro aspecto, las proteínas de unión de la descripción son útiles para el tratamiento de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma corticosuprarrenal, cáncer anal, cáncer de apéndice, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral, carcinoma de células basales, cáncer de conductos biliares extrahepáticos, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno, glioma de tronco encefálico, tumor cerebral, glioma de tronco encefálico, estrocitoma cerebral/glioma maligno, ependimoma, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, Glioma de la vía visual e hipotalámico, cáncer de mama, adenomas/carcinoides bronquiales, tumor carcinoide, tumor carcinoide, carcinoma gastrointestinal de origen primario desconocido, linfoma del sistema nervioso central, astrocitoma cerebeloso primario, cáncer de cuello uterino, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, cáncer colorrectal, Linfoma de células T cutáneas, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer de esófago, familia de tumores de Ewing, tumor de células germinales extracraneales, tumor de células germinales extragonadales, cáncer de conductos biliares extrahepáticos, cáncer de ojo, retinoblastoma melanoma intraocular, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico (estómago), tumor carcinoide gastrointestinal, tumor del estroma gastrointestinal (GIST), tumor de células germinales extracraneales, tumor de células germinales extragonadales, tumor de células germinales ováricas, tumor trofoblástico gestacional, glioma, glioma del tronco encefálico, glioma astrocitoma cerebral, glioma de la vía visual e hipotalámico infantil, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular (hígado), linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, melanoma intraocular, carcinoma de células de los islotes (páncreas endocrino), sarcoma de Kaposi, cáncer renal (de células renales), cáncer de laringe, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, leucemia de células pilosas, cáncer de labio y cavidad oral, cáncer de hígado, cáncer de pulmón de células no pequeñas, Cáncer de pulmón de células pequeñas, linfoma relacionado con el SIDA, linfoma de Burkitt, linfoma cutáneo de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma del sistema nervioso central primario, macroglobulinemia de Waldenström, histiocitoma fibroso maligno de hueso/osteosarcoma, meduloblastoma, melanoma, melanoma intraocular (ojo), carcinoma de células de Merkel, mesotelioma maligno, cáncer de cuello escamoso metastásico con oclusión primaria, cáncer de boca, síndrome de neoplasia endocrina múltiple, mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, micosis fungoide, síndromes

mielodisplásicos, enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas, leucemia mielógena, leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple, trastornos mieloproliferativos, cáncer de la cavidad nasal y seno paranasal, cáncer de nasofaringe, neuroblastoma, cáncer oral, cáncer de la cavidad oral, cáncer de labio y orofaringe, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de hueso, cáncer de ovario, cáncer epitelial ovárico, tumor de células germinales ováricas, tumor de ovario de bajo potencial maligno, cáncer pancreático, cáncer de células de los islotes, cáncer de los senos paranasales y de la cavidad nasal, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, cáncer de faringe, feocromocitoma, pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, tumor de la pituitaria, neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple, blastoma pleuropulmonar, cáncer de próstata, cáncer de recto, cáncer de células renales (riñón), pelvis renal y uréter, cáncer de células transicionales, retinoblastoma, cáncer de la glándula salival, sarcoma, familia de tumores de Ewing, sarcoma de Kaposi, sarcoma de tejido blando, sarcoma uterino, síndrome de Sézary, cáncer de piel (no melanoma), cáncer de piel (melanoma), carcinoma de piel de células de Merkel, cáncer de intestino delgado, carcinoma de células escamosas, cáncer de cuello escamoso metastásico con tumor primario oculto, cáncer de estómago (gástrico), tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, linfoma de células T cutáneo, cáncer testicular, cáncer de garganta, timoma, Timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer de células transicionales de la pelvis renal y uréter, tumor trofoblástico gestacional, uréter y pelvis renal, cáncer de células transicionales, cáncer de uretra, cáncer de útero, sarcoma uterino endometrial, cáncer de vagina, glioma de la vía visual e hipotalámico, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenström, tumor de Wilms.

En otro aspecto, se describe un método para tratar a un paciente que padece un trastorno en el que la IL-13 humana es perjudicial y comprende la etapa de administrar una cualquiera de las proteínas de unión descritas anteriormente antes, simultáneamente o después de la administración de un segundo agente, como se comentó anteriormente. En una realización preferida, el agente terapéutico adicional que se puede coadministrar y/o coformular con uno o más antagonistas de IL-13 (p.ej., anticuerpos anti-IL-13 o fragmentos de los mismos) incluyen, pero no se limitan a, uno o más de: esteroides inhalados; esteroides orales; beta-agonistas, p.ej., beta-agonistas de acción corta o de acción prolongada; antagonistas de leucotrienos o receptores de leucotrienos; fármacos combinados tales como ADVAIR; inhibidores de IgE, p.ej., anticuerpos anti-IgE (p.ej., XOLAIR); inhibidores de fosfodiesterasa (p.ej., inhibidores de PDE4); xantinas; fármacos anticolinérgicos; agentes estabilizadores de mastocitos tales como cromolina; inhibidores de IL-4; inhibidores de IL-5; inhibidores de eotaxina/CCR3; antagonistas de la histamina o sus receptores, incluidos H1, H2, H3 y H4, y antagonistas de la prostaglandina D o sus receptores (DP1 y CRTH2). Tales combinaciones se pueden utilizar para tratar el asma y otros trastornos respiratorios. Los ejemplos adicionales de agentes terapéuticos que se pueden coadministrar y/o coformular con uno o más anticuerpos anti-IL-13 o fragmentos de los mismos incluyen uno o más de: antagonistas de TNF (p.ej., un fragmento soluble de un receptor de TNF, p.ej., receptor de TNF humano p55 o p75 o derivados de los mismos, p.ej., TNFR-IgG de 75 kD (proteína de fusión del receptor de TNF de 75 kD-IgG, ENBREL)); antagonistas de la enzima TNF, p.ej., inhibidores de la enzima convertidora de TNF (TACE); antagonistas del receptor muscarínico; antagonistas de TGF-beta; interferón gamma; perfenidona; agentes quimioterapéuticos, p.ej., metotrexato, leflunomida, o un sirolimus (rapamicina) o un análogo del mismo, p.ej., CCI-779; inhibidores de COX2 y cPLA2; AINE; inmunomoduladores; inhibidores de p38, inhibidores de TPL-2, MK-2 y NFkB, entre otros. El segundo agente adicional se selecciona del grupo que consiste en budenosida, factor de crecimiento epidérmico, corticosteroides, ciclosporina, sulfasalazina, aminosalicilatos, 6-mercaptopurina, azatioprina, metronidazol, inhibidores de la lipoxigenasa, mesalamina, olsalazina, balsalazida, antioxidantes, inhibidores del tromboxano, antagonistas del receptor de IL-1, anticuerpos monoclonales anti-IL-1β, anticuerpos monoclonales anti-IL-6, factores de crecimiento, inhibidores de elastasa, compuestos de piridinil-imidazol, anticuerpos o agonistas de TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF y PDGF, anticuerpos de CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 o sus ligandos, metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato de mofetilo, leflunomida, AINE, ibuprofeno, corticosteroides, prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, IRAK, NIK, IKK, p38, inhibidores de MAP quinasa, inhibidores de la enzima convertidora de IL-1β e inhibidores, inhibidores de la enzima conversora de TNFα, inhibidores de señalización de células T, inhibidores de metaloproteinasas, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima conversora de angiotensina, receptores solubles de citocinas, receptor p55 de TNF soluble, receptor p75 de TNF soluble, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, citocinas antiinflamatorias, IL-4, IL-10, IL-11 y TGFβ.

En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente se pueden administrar al sujeto mediante al menos un modo seleccionado entre parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intrarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intracelular, intracerebeloso, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocárdico, intraóseo, intrapélvico, intrapericárdico, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretiniano, intraespinal, intrasinovial, intratorácico, intrauterino, intravesical, en bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, y transdérmico.

Un aspecto de la descripción proporciona al menos un anticuerpo antiidiotipo de IL-13 a al menos una proteína de unión a IL-13 de la presente descripción. El anticuerpo antiidiotipo incluye cualquier proteína o molécula que contiene péptido que comprende al menos una porción de una molécula de inmunoglobulina tal como, pero no

limitado a, al menos una región determinante de complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera o una porción de unión al ligando de la misma, una región variable de cadena pesada o cadena ligera, una región constante de cadena pesada o cadena ligera, una región marco, o; cualquier porción de los mismos, que se pueda incorporar a una proteína de unión de la presente descripción.

5

Descripción detallada de la invención

El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones adjuntas. En la medida en que otros aspectos y realizaciones de la descripción quedan fuera del alcance de la presente invención definido en las reivindicaciones adjuntas, estos se presentan con fines comparativos.

10

Esta descripción se refiere a proteínas de unión a IL-13 humana, particularmente anticuerpos anti-IL-13, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que se unen a IL-13. Diversos aspectos de la descripción se refieren a anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, y a composiciones farmacéuticas de los mismos, así como a ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes y células anfitrionas para producir tales anticuerpos y fragmentos. También se describen los métodos de uso de los anticuerpos de la descripción para detectar IL-13 humana, para inhibir la actividad de IL-13 humana, in vitro o in vivo; y para regular la expresión génica.

15

A menos que se defina lo contrario en la presente memoria, los términos científicos y técnicos utilizados en conexión con la presente descripción tendrán los significados que comúnmente comprenden los expertos en la técnica. El significado y alcance de los términos debe ser claro, sin embargo, en el caso de cualquier ambigüedad latente, las definiciones proporcionadas en la presente memoria preceden a cualquier definición de diccionario o extrínseca. Adicionalmente, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos en plural incluirán el singular. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "que incluye", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido", no es limitante. Asimismo, los términos tales como "elemento" o "componente" abarcan tanto elementos como componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad, a menos que se indique específicamente lo contrario.

20

Generalmente, las nomenclaturas utilizadas en conexión con, y los mecanismos de cultivo de células y tejidos, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química e hibridación de proteínas y ácidos nucleicos descritas en la presente memoria son aquellas bien conocidas y utilizadas comúnmente en la técnica. Los métodos y mecanismos de la presente descripción se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y descritos en diversas referencias generales y más específicas que se citan y comentan a lo largo de la presente memoria descriptiva a menos que se indique lo contrario. Las reacciones enzimáticas y los mecanismos de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se realizan comúnmente en la técnica o como se describen en la presente memoria. Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos y mecanismos de laboratorio de la química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritas en la presente memoria son aquellas bien conocidas y utilizadas comúnmente en la técnica. Los mecanismos convencionales se utilizan para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y administración, y tratamiento de pacientes.

30

35

Para que la presente descripción pueda entenderse más fácilmente, los términos seleccionados se definen a continuación.

40

El término "polipéptido" según se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier cadena polimérica de aminoácidos. Los términos "péptido" y "proteína" se utilizan de manera indistinta con el término polipéptido y también se refieren a una cadena polimérica de aminoácidos. El término "polipéptido" abarca proteínas nativas o artificiales, fragmentos de proteína y análogos polipeptídicos de una secuencia de proteína. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico.

45

El término "proteína aislada" o "polipéptido aislado" se refiere a una proteína o polipéptido que, en virtud de su origen o fuente de obtención, no están asociados con los componentes naturalmente asociados que los acompañan en su estado nativo; están sustancialmente libres de otras proteínas de la misma especie; son expresados por una célula de una especie diferente; o no existen en la naturaleza. Por lo tanto, un polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente de la célula de la que se origina de manera natural se "aislará" de sus componentes asociados de forma natural. Una proteína también puede volverse sustancialmente libre de componentes asociados naturalmente por aislamiento, utilizando mecanismos de purificación de proteínas bien conocidos en la técnica.

50

55

60

El término "recuperar" según se utiliza en la presente memoria, se refiere al proceso de convertir una especie química tal como un polipéptido sustancialmente libre de componentes naturalmente asociados por aislamiento, p.ej., utilizando mecanismos de purificación de proteínas bien conocidos en la técnica.

5 Los términos "IL-13 humana" e "IL-13 humana de tipo salvaje" (abreviados en la presente memoria como h IL-13, h IL-13wt), según se utilizan en la presente memoria, incluyen una citocina humana secretada principalmente por células T 2 coadyuvantes. El término incluye una proteína monomérica de polipéptido de 13 kDa. La estructura de la IL-13 humana se ha descrito adicionalmente, por ejemplo, (Moy, Diblasio et al. 2001 J Mol Biol 310 219-30). Se pretende que el término IL-13 humana incluya IL-13 humana recombinante (rh IL-13), que se puede preparar por
10 métodos de expresión recombinantes convencionales. La Tabla 1 muestra la secuencia de aminoácidos de IL-13 humana, SEC ID NO: 1, que es conocida en la técnica.

Tabla 1: Secuencia de IL-13 humana

Proteína	Identificador de secuencia	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
IL-13 humana	SEQ ID NO: 1	MALLLTTVIALTCLGGFASPGPVPSTALREL IEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGMYC AALESLINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSA GQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLLHLKFLFRE GRFN

15 El término "variante de IL-13 humana" (abreviado en la presente memoria como h IL-13v), según se utiliza en la presente memoria, incluye una variante de IL-13 humana en donde el residuo de aminoácido 130 de SEQ ID NO. 1 ha cambiado de Arginina a Glutamina (R130Q).

20 "Actividad biológica" según se utiliza en la presente memoria, se refiere a todas las propiedades biológicas inherentes de la citocina. Las propiedades biológicas de IL-13 incluyen, pero no se limitan a, la unión del receptor de IL-13; (otros ejemplos incluyen el cambio de isotipo de inmunoglobulina a IgE en células B humanas y la supresión de la producción de citocinas inflamatorias).

25 Los términos "unión específica" o "que se une específicamente", según se utilizan en la presente memoria, en referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína o un péptido con una segunda especie química, significan que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (p.ej., un determinante antigénico o epítipo) en la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura proteica específica en lugar de a proteínas en general. Si un anticuerpo es específico para el epítipo "A", la presencia de una molécula que contiene el epítipo A (o A, libre, sin marcar) en una reacción que contiene "A" marcado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcado A unido al anticuerpo.

30 El término "anticuerpo", según se utiliza en la presente memoria, se refiere en general a cualquier molécula de inmunoglobulina (Ig) compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), o cualquier fragmento funcional, mutante, variante o derivación de la misma, que conserva las características esenciales de unión al epítipo de una molécula de Ig. Tales formatos de anticuerpo mutante, variante o derivado son conocidos en la técnica. Las realizaciones no limitantes se describen a continuación.

35 En un anticuerpo completo, cada cadena pesada está compuesta de una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente memoria como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente memoria como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones VH y VL se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino
40 al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (p.ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (p.ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

50 El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), según se utiliza en la presente memoria, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (p.ej., hIL-13). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un

anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo completo. Tales realizaciones de anticuerpos también pueden ser formatos biespecíficos, duales específicos o multiespecíficos; que se unen específicamente a dos o más antígenos diferentes. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546, Winter et al., Publicación PCT WO 90/05144 A1), que comprende un solo dominio variable; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que permite que sean formados como una sola cadena de proteína en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple (scFv); p.ej., Bird et al. (1988) Science 242:423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). También se pretende que tales anticuerpos monocatenarios se incluyan dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. También se incluyen otras formas de anticuerpos monocatenarios, tales como diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena polipeptídica, pero utilizando un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, lo que obliga a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno (véanse p.ej., Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, R.J., et al. (1994) Estructura 2: 1121-1123). Tales porciones de unión a anticuerpo son conocidas en la técnica (Kontermann y Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. Nueva York. 790 pág. (ISBN 3-540-41354-5).

El término "construcción de anticuerpo" según se utiliza en la presente memoria se refiere a un polipéptido que comprende una o más porciones de unión a antígeno de la descripción unidas a un polipéptido conector o un dominio constante de inmunoglobulina. Los polipéptidos conectores comprenden dos o más residuos de aminoácido unidos por enlaces peptídicos y se utilizan para unir una o más porciones de unión a antígeno. Tales polipéptidos conectores son bien conocidos en la técnica (véanse p.ej., Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, R.J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123). Un dominio constante de inmunoglobulina se refiere a un dominio constante de cadena pesada o ligera. Las secuencias de aminoácidos de dominio constante de cadena pesada y cadena ligera de IgG humana son conocidas en la técnica y están representadas en la Tabla 2.

Tabla 2: Secuencia de dominio constante de cadena pesada y dominio constante de cadena ligera de IgG humana

Proteína	Identificador de secuencia	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
Región constante gamma-1 humana	SEQ ID NO: 2	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNNHYT QKSLSLSPGK
Mutante de la región constante gamma-1 de Ig	SEQ ID NO: 3	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNNHYT QKSLSLSPGK
Región constante Kappa de Ig	SEQ ID NO: 4	

Proteína	Identificador de secuencia	Secuencia
		TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
Región constante Lambda de Ig	SEQ ID NO: 5	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAFTVAVKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNK YAASSYLSTLPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS

5 Aún más, un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo puede ser parte de una molécula de inmunoadherencia mayor, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o porción de anticuerpo con una o más proteínas o péptidos. Los ejemplos de tales moléculas de inmunoadherencia incluyen el uso de la región del núcleo de estreptavidina para formar una molécula de scFv tetramérica (Kipriyanov, S.M., et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6: 93-101) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y una etiqueta de polihistidina C-terminal para formar moléculas de scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov, S.M., et al. (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058). Las porciones de anticuerpos, tales como los fragmentos Fab y F(ab')₂, se pueden preparar a partir de anticuerpos completos utilizando técnicas convencionales, tales como la digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. Además, se pueden obtener anticuerpos, porciones de anticuerpos y moléculas de inmunoadherencia utilizando técnicas de ADN recombinante estándar, como se describe en la presente memoria.

15 Se pretende que un "anticuerpo aislado", según se utiliza en la presente memoria, se refiera a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (p.ej., un anticuerpo aislado que se une específicamente a hIL-13 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de hIL-13). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a hIL-13 puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de IL-13 de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

20 Se pretende que el término "anticuerpo humano", según se utiliza en la presente memoria, incluya anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la descripción pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (p.ej., mutaciones introducidas por mutagénesis al azar o específica de sitio in vitro o por mutación somática in vivo), por ejemplo en las CDR y en particular en la CDR3. Sin embargo, no se pretende que el término "anticuerpo humano", según se utiliza en la presente memoria, incluya anticuerpos en los que se han injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, en secuencias marco humanas.

30 Se pretende que el término "anticuerpo humano recombinante", según se utiliza en la presente memoria, incluya todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados utilizando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula anfitriona (descrito más adelante en Sección II C, a continuación), anticuerpos aislados de una biblioteca recombinante de anticuerpos humanos combinatoria (Hoogenboom H.R., (1997) TIB Tech. 15:62-70; Azzazy H., y Highsmith W.E., (2002) Clin. Biochem. 35: 425-445; Gavilondo J.V., y Larrick J.W. (2002) BioTechniques 29: 128-145; Hoogenboom H. y Chames P. (2000) Immunology Today 21: 371-378), anticuerpos aislados de un animal (p. ej., un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véanse, p.ej., Taylor, L. D., et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295; Kellermann S-A., Y Green L.L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13: 593-597; Little M. et al (2000) Immunology Today 21: 364-370) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis in vitro (o, cuando se utiliza un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática in vivo) y por lo tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de, y relacionadas con, secuencias VH y VL de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos in vivo. Una realización proporciona anticuerpos completamente humanos capaces de unirse a IL-13 humana que se pueden generar utilizando mecanismos bien conocidas en la técnica, tales como, pero no

limitados a, el uso de bibliotecas de fagos de Ig humanas tales como las descritas en Jermutus et al., Publicación PCT Núm.WO 2005/007699 A2.

5 El término "anticuerpo quimérico" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de una especie y secuencias de región constante de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de cadena pesada y ligera murinas unidas a regiones constantes humanas.

10 El término "anticuerpo injertado con CDR" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de una especie pero en los que las secuencias de una o más de las regiones CDR de VH y/o VL se reemplazan por secuencias de CDR de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables murinas de cadena pesada y ligera murinas en las que una o más de las CDR murinas (p.ej., CDR3) se han reemplazado por secuencias de CDR humanas.

15 El término "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera de una especie no humana (p.ej., un ratón) pero en los que al menos una parte de la secuencia de VH y/o VL ha sido alterada para que sea más "humana", es decir., más similar a las secuencias variables de la línea germinal humana. Un tipo de anticuerpo humanizado es un anticuerpo injertado con CDR, en el que las secuencias de CDR humanas se introducen en secuencias de VH y VL no humanas para reemplazar las correspondientes secuencias de CDR no humanas. En una realización, se proporcionan anticuerpos anti-IL-13 humana humanizados y porciones de unión a antígeno. Tales anticuerpos se generaron obteniendo anticuerpos monoclonales murinos anti-hIL-13 utilizando la tecnología de hibridoma tradicional seguido de humanización utilizando ingeniería genética in vitro, tal como los descritos en Kasaian et al. Publicación PCT Núm. WO 2005/123126 A2.

25 Los términos "numeración de Kabat", "definiciones de Kabat" y "marcaje de Kabat" se utilizan indistintamente en la presente memoria. Estos términos, que se reconocen en la técnica, se refieren a un sistema de numeración de residuos de aminoácidos que son más variables (es decir, hipervariable) que otros residuos de aminoácidos en las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo (Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190: 382-391 y, Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU., Publicación NIH Núm. 91-3242) Para la región variable de la cadena pesada, la región hipervariable varía desde las posiciones de aminoácidos 31 a 35 para CDR1, las posiciones de aminoácidos 50 a 65 para CDR2, y las posiciones de aminoácidos 95 a 102 para CDR3. Para la región variable de la cadena ligera, la región hipervariable varía desde las posiciones de aminoácidos 24 a 34 para CDR1, las posiciones de aminoácidos 50 a 56 para CDR2, y las posiciones de aminoácidos 89 a 97 para CDR3.

40 Según se utilizan en la presente memoria, los términos "aceptor" y "anticuerpo aceptor" se refieren al anticuerpo o secuencia de ácido nucleico que proporcionan o codifican al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o 100% de las secuencias de aminoácidos de una o más de las regiones marco. En algunas realizaciones, el término "aceptor" se refiere a la secuencia de aminoácidos o ácido nucleico del anticuerpo que proporciona o codifica las regiones constantes. En otra realización más, el término "aceptor" se refiere a la secuencia de aminoácido o ácido nucleico del anticuerpo que proporciona o codifica una o más de las regiones marco y las regiones constantes. En una realización específica, el término "aceptor" se refiere a una secuencia de aminoácidos o ácido nucleico de anticuerpo humano que proporciona o codifica al menos 80%, preferiblemente, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98 %, o 100% de las secuencias de aminoácidos de una o más de las regiones marco. De acuerdo con esta realización, un aceptor puede contener al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, o al menos 10 residuos de aminoácido que no existen en una o más posiciones específicas de un anticuerpo humano. Una región marco aceptora y/o las regiones constantes aceptoras pueden derivar o se pueden obtener de un gen de anticuerpo de línea germinal, un gen de anticuerpo maduro, un anticuerpo funcional (p.ej., anticuerpos bien conocidos en la técnica, anticuerpos en desarrollo, o anticuerpos comercialmente disponibles).

55 Según se utiliza en la presente memoria, el término "CDR" se refiere a la región determinante de complementariedad dentro de las secuencias variables de anticuerpos. Hay tres CDR en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, que se denominan CDR1, CDR2 y CDR3, para cada una de las regiones variables. El término "conjunto de CDR" según se utiliza en la presente memoria se refiere a un grupo de tres CDR que existen en una única región variable capaz de unirse al antígeno. Los límites exactos de estas CDR se han definido de manera diferente de acuerdo con los diferentes sistemas. El sistema descrito por Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) y (1991))) no solo proporciona un sistema inequívoco de numeración de residuos aplicable a cualquier región variable de un anticuerpo, sino que también proporciona límites de residuos precisos que definen las tres CDR. Estas CDR pueden denominarse CDR de Kabat. Chothia y colaboradores (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901 - 917 (1987) y Chothia

et al., Nature 342: 877-883 (1989)) encontraron que ciertas sub-porciones dentro de las CDR de Kabat adoptan conformaciones de la cadena principal del péptido casi idénticas, a pesar de tener una gran diversidad a nivel de la secuencia de aminoácidos. Estas sub-porciones se designaron L1, L2 y L3 o H1, H2 y H3, donde "L" y la "H" designan las regiones de cadena ligera y cadena pesada, respectivamente. Estas regiones se pueden denominar CDR de Chothia, que tienen límites que se solapan con las CDR de Kabat. Otros límites que definen las CDR que se solapan con las CDR de Kabat han sido descritos por Padlan (FASEB J. 9: 133-139 (1995)) y MacCallum (J Mol Biol 262 (5): 732-45 (1996)). Aún otras definiciones de límites de CDR pueden no seguir estrictamente uno de los sistemas anteriores, pero se solaparán con las CDR de Kabat, aunque se pueden acortar o alargar a la luz de predicciones o hallazgos experimentales que los residuos o grupos de residuos particulares o incluso CDR completas no afectan significativamente a la unión al antígeno. Los métodos utilizados en la presente memoria pueden utilizar CDR definidas de acuerdo con cualquiera de estos sistemas, aunque las realizaciones preferidas utilizan CDR definidas por Kabat o Chothia.

Según se utiliza en la presente memoria, el término residuo "canónico" se refiere a un residuo en una CDR o marco que define una estructura de CDR canónica particular como definen Chothia et al. (J. Mol. Biol. 196: 901-907 (1987)); Chothia et al., J. Mol. Biol. 227:799 (1992)). De acuerdo con Chothia et al., las porciones críticas de las CDR de muchos anticuerpos tienen confirmaciones de la cadena principal del péptido casi idénticas a pesar de la gran diversidad a nivel de la secuencia de aminoácidos. Cada estructura canónica especifica principalmente un conjunto de ángulos de torsión de la cadena principal del péptido para un segmento contiguo de residuos de aminoácidos que forman un bucle.

Según se utilizan en la presente memoria, los términos "donante" y "anticuerpo donante" se refieren a un anticuerpo que proporciona una o más CDR. En una realización preferida, el anticuerpo donante es un anticuerpo de una especie diferente del anticuerpo a partir del cual se obtienen o derivan las regiones marco. En el contexto de un anticuerpo humanizado, el término "anticuerpo donante" se refiere a un anticuerpo no humano que proporciona una o más CDR.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "marco" o "secuencia marco" se refiere a las secuencias restantes de una región variable menos las CDR. Debido a que la definición exacta de una secuencia CDR puede ser determinada por diferentes sistemas, el significado de una secuencia marco está sujeto a interpretaciones correspondientemente diferentes. Las seis CDR (CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la cadena ligera y CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la cadena pesada) también dividen las regiones marco de la cadena ligera y la cadena pesada en cuatro subregiones (FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada cadena, en la que la CDR1 se coloca entre FR1 y FR2, la CDR2 entre FR2 y FR3, y la CDR3 entre FR3 y FR4. Sin especificar las subregiones particulares como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región marco, como han mencionado otros, representa los FR combinados dentro de la región variable de una cadena de inmunoglobulina de origen natural individual. Según se utiliza en la presente memoria, un FR representa una de las cuatro sub-regiones, y los FR representan dos o más de las cuatro sub-regiones que constituyen una región marco.

Las secuenciasceptoras de cadenas pesadas y cadenas ligeras humanas son conocidas en la técnica. En una realización de la descripción, las secuenciasceptoras de cadenas pesadas y cadenas ligeras humanas se seleccionan entre las secuencias descritas en la Tabla 3 y la Tabla 4.

Tabla 3: Secuenciasceptoras de cadena pesada

SEQ ID NO.	Región de la proteína	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
6	VH1-18 y JH6 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFT
7	VH1-18 y JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
8	VH1-18 y JH6 FR3	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
9	VH1-18 y JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
6	21/28 y JH4 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFT
10	21/28 y JH4 FR2	WVRQAPGQRLEWMG
11	21/28 y JH4 FR3	RVTITRDTASASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
12	21/28 y JH4 FR4	WGQGTLVTVSS
13	VH2-26 y JH6 FR1	QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSL

SEQ ID NO.	Región de la proteína	Secuencia
14	VH2-26 y JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLAH
15	VH2-26 y JH6 FR3	RLTISKDTSKSKVVLMTNMDPVDATYYCAR
9	VH2-26 y JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
16	M60 y JH4 FR1	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTLYGFSL
17	M60 y JH4 FR2	WIRQPPGKALEWLA
18	M60 y JH4 FR3	RLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCAR
12	M60 y JH4 FR4	WGQGLTVTVSS
		12345678901234567890123456789012
6	VH1-46 y JH6 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYTFT
7	VH1-46 y JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
19	VH1-46 y JH6 FR3	RVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAR
9	VH1-46 y JH6 FR4	WGQGTTVTVSS

Tabla 4: Secuencias aceptoras de cadena ligera

SEQ ID NO.	Región de la proteína	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
20	A20 y JK4 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
21	A20 y JK4 FR2	WYQQKPGKVPKLLYY
22	A20 y JK4 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC
23	A20 y JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
20	III-3R y JK4 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
24	III-3R y JK4 FR2	WYQQKPGKAPKLLYY
25	III-3R y JK4 FR3	GVPSRISGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC
23	III-3R y JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
26	A1 y JK4 FR1	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC
27	A1 y JK4 FR2	WFQQRPGQSPRRLIY
28	A1 y JK4 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
23	A1 y JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
29	01 y JK2 FR1	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISC
30	01 y JK2 FR2	WYLQKPGQSPQLLIY
28	01 y JK2 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
31	01 y JK2 FR4	FGGGTKLEIKR

Según se utiliza en la presente memoria, el término "gen de anticuerpo de la línea germinal" o "fragmento de gen" se refiere a una secuencia de inmunoglobulina codificada por células no linfoides que no han experimentado el proceso de maduración que conduce a una reorganización genética y mutación para la expresión de una inmunoglobulina particular. (Véase, p.ej., Shapiro et al., Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200 (2002); Marchalonis et al., Adv Exp Med Biol. 484: 13-30 (2001)). Una de las ventajas proporcionadas por diversas realizaciones de la presente descripción proviene del reconocimiento de que los genes de anticuerpos de la línea germinal son más propensos que los genes de anticuerpos maduros a conservar las estructuras de secuencias de aminoácidos características de los individuos en la especie, por lo tanto es menos probable que se reconozcan como fuente externa cuando se utilizan terapéuticamente en esa especie.

- Según se utiliza en la presente memoria, el término residuos "clave" se refiere a ciertos residuos dentro de la región variable que tienen más impacto sobre la especificidad de unión y/o la afinidad de un anticuerpo, en particular un anticuerpo humanizado. Un residuo clave incluye, pero no se limita a, uno o más de los siguientes: un residuo que es adyacente a una CDR, un sitio de glicosilación potencial (puede ser un sitio de N- u O-glicosilación), un residuo raro, un residuo capaz de interactuar con el antígeno, un residuo capaz de interactuar con una CDR, un residuo canónico, un residuo de contacto entre la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera, un residuo dentro de la zona Vernier y un residuo en la región que se solapa entre la definición de Chothia de una CDR1 de cadena pesada variable y la definición de Kabat del primer marco de cadena pesada.
- Según se utiliza en la presente memoria, el término "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo o una variante, derivado, análogo o fragmento del mismo que se unen inmunoespecíficamente a un antígeno de interés y que comprenden una región marco (FR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano y una región determinante de la complementariedad (CDR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo no humano. Según se utiliza en la presente memoria, el término "sustancialmente" en el contexto de una CDR se refiere a una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de una CDR de anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables (Fab, Fab', F (ab')₂, FabC, Fv) en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, anticuerpo donante) y todas o sustancialmente todas las regiones marco son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado también comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado contiene tanto la cadena ligera como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4 de la cadena pesada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado solo contiene una cadena ligera humanizada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado solo contiene una cadena pesada humanizada. En realizaciones específicas, un anticuerpo humanizado solo contiene un dominio variable humanizado de una cadena ligera y/o una cadena pesada humanizadas.
- El anticuerpo humanizado se puede seleccionar entre cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo, sin limitación, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y se pueden seleccionar dominios constantes particulares para optimizar las funciones efectoras deseadas utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica.
- No es necesario que las regiones marco y CDR de un anticuerpo humanizado se correspondan exactamente con las secuencias parentales, p.ej., la CDR del anticuerpo donante o el marco consenso pueden mutagenizarse por sustitución, inserción y/o delección de al menos un residuo de aminoácido de modo que el residuo de la CDR o el marco en ese sitio no corresponda ni al anticuerpo donante ni al marco consenso. En una realización preferida, tales mutaciones, sin embargo, no serán extensas. Normalmente, al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, y lo más preferiblemente al menos 95% de los residuos de anticuerpos humanizados corresponderán a los de las secuencias parentales FR y CDR. Según se utiliza en la presente memoria, el término "marco consenso" se refiere a la región marco en la secuencia consenso de inmunoglobulina. Según se utiliza en la presente memoria, el término "secuencia consenso de inmunoglobulina" se refiere a la secuencia formada a partir de los aminoácidos (o nucleótidos) que se producen con mayor frecuencia en una familia de secuencias de inmunoglobulina relacionadas (véase, p.ej. Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania 1987)). En una familia de inmunoglobulinas, cada posición en la secuencia consenso está ocupada por el aminoácido que se encuentra con mayor frecuencia en esa posición en la familia. Si dos aminoácidos se encuentran con la misma frecuencia, cualquiera puede incluirse en la secuencia consenso.
- Según se utiliza en la presente memoria, la zona "Vernier" se refiere a un subconjunto de residuos del marco que pueden ajustar la estructura de CDR y configurar el ajuste al antígeno como describen Foote y Winter (1992, J. Mol. Biol. 224: 487-499). Los residuos de la zona de Vernier forman una capa subyacente a las CDR y pueden tener un impacto sobre la estructura de las CDR y la afinidad del anticuerpo.
- El término "proteína de unión multivalente" se utiliza en esta memoria descriptiva para indicar una proteína de unión que comprende dos o más sitios de unión a antígeno. La proteína de unión multivalente se modifica genéticamente para que tenga los tres o más sitios de unión a antígeno, y generalmente no es un anticuerpo de origen natural. El término "proteína de unión multiespecífica" se refiere a una proteína de unión capaz de unirse a dos o más dianas relacionadas o no relacionadas. Las proteínas de unión de dominio variable dual (DVD), según se utilizan en la presente memoria, son proteínas de unión que comprenden dos o más sitios de unión a antígeno y son proteínas de unión tetravalente o multivalente. Dichos DVD pueden ser monoespecíficos, es decir, capaces de unirse a un antígeno o multiespecíficos, es decir, capaces de unirse a dos o más antígenos. Las proteínas de unión de DVD que

comprenden dos polipéptidos de DVD de cadena pesada y dos polipéptidos de DVD de cadena ligera son referidas como Ig de DVD. Cada mitad de una IgG de DVD comprende un polipéptido de DVD de cadena pesada y un polipéptido de DVD de cadena ligera y dos sitios de unión a antígeno. Cada sitio de unión comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera con un total de 6 CDR implicadas en la unión al antígeno por sitio de unión al antígeno.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "neutralizar" se refiere a la neutralización de la actividad biológica de una citocina cuando una proteína de unión se une específicamente a la citocina. Preferiblemente, una proteína de unión neutralizadora es un anticuerpo neutralizador cuya unión a hIL-13 y/o hIL-13 da como resultado la inhibición de una actividad biológica de hIL-13 y/o hIL-13. Preferiblemente, la proteína de unión neutralizadora se une a hIL-13 y/o hIL-13 y reduce una actividad biológica de IL-13 y/o hIL-13 en al menos aproximadamente 20%, 40%, 60%, 80%, 85% o más. La inhibición de una actividad biológica de hIL-13 y/o hIL-13 por una proteína de unión neutralizadora se puede evaluar midiendo uno o más indicadores de actividad biológica de hIL-13 y/o hIL-13 bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la inhibición de la producción inducida por IL-13 humana de TARC (CCL-17) por células A-549 (véase el Ejemplo 1.1.C).

El término "actividad" incluye actividades tales como la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo por un antígeno, por ejemplo, un anticuerpo anti-hIL-13 que se une a un antígeno de IL-13 y/o la potencia neutralizadora de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-hIL-13 cuya unión a hIL-13 inhibe la actividad biológica de hIL-13. Por ejemplo, la inhibición de la producción de TARC inducida por IL-13 humana (CCL-17) por células A-549 (véase Ejemplo 1.1.C).

El término "epítipo" incluye cualquier determinante polipeptídico capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o receptor de células T. En ciertas realizaciones, los determinantes epitópicos incluyen agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, fosforilo o sulfonilo, y, en ciertas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno que se une a un anticuerpo. En ciertas realizaciones, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce preferentemente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

El término "resonancia de plasmón superficial", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz biosensora, por ejemplo utilizando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ). Para más descripciones, véanse Jönsson, U., et al. (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jönsson, U., et al. (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnsson, B., et al. (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; y Johnsson, B., et al. (1991) *Anal. Biochem.* 198: 268-277.

Se pretende que el término " k_{on} ", según se utiliza en la presente memoria, haga referencia a la constante de velocidad de asociación para la asociación de un anticuerpo al antígeno para formar el complejo anticuerpo/antígeno como se conoce en la técnica.

Se pretende que el término " k_{off} ", según se utiliza en la presente memoria, haga referencia a la constante de velocidad de disociación para la disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno como se conoce en la técnica.

Se pretende que el término " K_D ", según se utiliza en la presente memoria, haga referencia a la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular como se conoce en la técnica.

El término "proteína de unión etiquetada" según se utiliza en la presente memoria, se refiere a una proteína con una marca incorporada que proporciona la identificación de la proteína de unión. Preferiblemente, la marca es una marca detectable, p.ej., la incorporación de un aminoácido radiomarcado o el anclaje a un polipéptido de radicales biotínico que se pueden detectar mediante avidina marcada (p.ej., estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que se puede detectar mediante métodos ópticos o colorimétricos). Los ejemplos de las marcas para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (p.ej., 3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , o ^{153}Sm); marcadores fluorescentes (p.ej., FITC, rodamina, lantánidos, fosforos), marcadores enzimáticos (p.ej., peroxidasa de rábano picante, luciferasa, fosfatasa alcalina); marcadores quimioluminiscentes; grupos biotínico; epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un informador secundario (p.ej., secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas epitópicas); y agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio.

El término "producto conjugado de anticuerpo" se refiere a una proteína de unión, tal como un anticuerpo, unida químicamente a un segundo radical químico, tal como un agente terapéutico o citotóxico. El término "agente" se

utiliza en la presente memoria para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto fabricado a partir de materiales biológicos. Preferiblemente, los agentes terapéuticos o citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, toxina pertussis, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi-antracínodiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puomicina y análogos u homólogos de los mismos.

Los términos "cristal" y "cristalizado", según se utilizan en la presente memoria, se refieren a un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, que existen en forma de un cristal. Los cristales son una forma del estado sólido de la materia, que es distinto de otras formas tales como el estado sólido amorfo o el estado cristalino líquido. Los cristales están compuestos por matrices tridimensionales periódicas, repetitivas de átomos, iones, moléculas (p.ej., proteínas tales como anticuerpos) o conjuntos moleculares (p.ej., complejos antígeno/anticuerpo). Estas matrices tridimensionales están organizadas de acuerdo con relaciones matemáticas específicas que son bien entendidas en el campo. La unidad fundamental, o elemento esencial, que se repite en un cristal se denomina unidad asimétrica. La repetición de la unidad asimétrica en una disposición que se ajusta a una simetría cristalográfica dada, bien definida proporciona la "celda unitaria" del cristal. La repetición de la celda unitaria mediante traslaciones regulares en las tres dimensiones proporciona el cristal. Véanse, Giege, R. y Ducruix, A. Barrett, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, A Practical Approach*, 2ª ed., pág. 20 1-16, Oxford University Press, Nueva York, Nueva York, (1999)."

El término "polinucleótido", referido en la presente memoria, significa una forma polimérica de dos o más nucleótidos, ya sean ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de ADN de hebra sencilla y doble, pero preferiblemente es ADN de doble hebra.

El término "polinucleótido aislado" según se utiliza en la presente memoria significará un polinucleótido (p.ej., de origen genómico, ADNc o sintético, o alguna combinación de los mismos) que, en virtud de su origen, no está asociado con todo o una porción de un polinucleótido con el que el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza; está conectado operativamente a un polinucleótido al que no está unido a la naturaleza; o no existe en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

Se pretende que el término "vector", según se utiliza en la presente memoria, haga referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula anfitriona en la que se introducen (p.ej., vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (p.ej., vectores de mamíferos no episómicos) se pueden integrar en el genoma de una célula anfitriona tras la introducción en la célula anfitriona, y de ese modo replican junto con el genoma del anfitrión. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están conectados operativamente. Tales vectores se denominan en la presente memoria "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante a menudo están en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden utilizarse indistintamente ya que el plásmido es la forma de vector utilizada más comúnmente. Sin embargo, se pretende que la descripción incluya tales otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (p.ej., retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adenoasociados), que cumplen funciones equivalentes.

El término "conectado operativamente" se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista. Una secuencia de control "conectada operativamente" a una secuencia codificante se conecta de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control. Las secuencias "conectadas operativamente" incluyen tanto secuencias de control de expresión que son contiguas al gen de interés como secuencias de control de expresión que actúan en *trans* o a una distancia para controlar el gen de interés. El término "secuencia de control de la expresión", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de las secuencias codificantes a las que están ligadas. Las secuencias de control de expresión incluyen secuencias de inicio, terminación, promotoras y potenciadoras de la transcripción apropiadas; señales de procesamiento de ARN eficaces tales como señales de empalme y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplásmico; secuencias que mejoran la eficacia de la traducción (es decir, secuencia consenso de Kozak); secuencias que mejoran la estabilidad de la proteína; y cuando se desee, secuencias que mejoran la secreción de proteínas. La naturaleza de tales secuencias de control difiere dependiendo del organismo anfitrión; en procariontes, tales secuencias de control generalmente incluyen un promotor, un sitio de unión ribosómico y una secuencia de terminación de la transcripción; en eucariotes, generalmente, tales secuencias de control incluyen promotores y secuencia de terminación de la transcripción. Se

pretende que el término "secuencias de control" incluya componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias compañeras de fusión. Las construcciones de proteínas de la presente invención se pueden expresar y purificar utilizando vectores de expresión y células anfitrionas conocidas en la técnica, que incluyen casetes de expresión, vectores, células anfitrionas recombinantes y métodos para la expresión recombinante y el procesamiento proteolítico de poliproteínas recombinantes y preproteínas de un único marco de lectura abierto (p.ej., documento WO 2007/014162).

"Transformación", según se define en la presente memoria, se refiere a cualquier proceso mediante el cual el ADN exógeno entra en una célula anfitriona. La transformación puede ocurrir en condiciones naturales o artificiales utilizando diversos métodos bien conocidos en la técnica. La transformación se puede basar en cualquier método conocido para la inserción de secuencias de ácido nucleico foráneas en una célula anfitriona procarionta o eucariota. El método se selecciona basándose en la célula anfitriona que se está transformando y puede incluir, pero no se limita a, infección viral, electroporación, lipofección y bombardeo de partículas. Tales células "transformadas" incluyen células transformadas de manera estable en las que el ADN insertado es capaz de replicar como un plásmido que se replica autónomamente o como parte del cromosoma del anfitrión. También incluyen células que expresan transitoriamente el ADN o ARN insertado durante períodos de tiempo limitados.

Se pretende que el término "célula anfitriona recombinante" (o simplemente "célula anfitriona"), según se utiliza en la presente memoria, haga referencia a una célula en la que se ha introducido ADN exógeno. Se debe entender que se pretende que dichos términos hagan referencia no solo a la célula objeto particular, sino a la progenie de dicha célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en generaciones sucesivas debido a la mutación o influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero todavía está incluida dentro del alcance del término "célula anfitriona" según se utiliza en la presente memoria. Preferiblemente, las células anfitrionas incluyen células procariontas y eucariotas seleccionadas entre cualquiera de los Reinos de la vida. Las células eucariotas preferidas incluyen células protistas, fúngicas, vegetales y animales. Más preferiblemente, las células anfitrionas incluyen, pero no se limitan a, la línea de células procariontas de *E. Coli*; líneas celulares de mamífero CHO, HEK 293 y COS; la línea de células de insecto Sf9; y la célula fúngica *Saccharomyces cerevisiae*.

Se pueden utilizar técnicas convencionales para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo y transformación de tejidos (p.ej., electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se pueden realizar de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se realiza comúnmente en la técnica o como se describe en la presente memoria. Las técnicas y procedimientos anteriores se pueden realizar generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase, p.ej., Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)).

"Organismo transgénico", según se conoce en la técnica y según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un organismo que tiene células que contienen un transgén, en donde el transgén introducido en el organismo (o un ancestro del organismo) expresa un polipéptido no expresado naturalmente en el organismo. Un "transgen" es una construcción de ADN, que se integra estable y operativamente en el genoma de una célula a partir del cual se desarrolla un organismo transgénico, dirigiendo la expresión de un producto génico codificado en uno o más tipos de células o tejidos del organismo transgénico.

Los términos "regular" y "modular" se utilizan indistintamente, y, según se utilizan en la presente memoria, se refieren a un cambio o una alteración en la actividad de una molécula de interés (p.ej., la actividad biológica de hIL-13). La modulación puede ser un aumento o una disminución en la magnitud de una determinada actividad o función de la molécula de interés. Las actividades y funciones ilustrativas de una molécula incluyen, pero no se limitan a, características de unión, actividad enzimática, activación del receptor celular y transducción de señal.

Correspondientemente, el término "modulador", según se utiliza en la presente memoria, es un compuesto capaz de cambiar o alterar una actividad o función de una molécula de interés (p.ej., la actividad biológica de hIL-13). Por ejemplo, un modulador puede causar un aumento o una disminución en la magnitud de una determinada actividad o función de una molécula en comparación con la magnitud de la actividad o función observada en ausencia del modulador. En ciertas realizaciones, un modulador es un inhibidor, que disminuye la magnitud de al menos una actividad o función de una molécula. Los inhibidores ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, proteínas, péptidos, anticuerpos, peptidocuerpos, carbohidratos o pequeñas moléculas orgánicas. Los peptidocuerpos se describen, p.ej., en el documento WO01/83525.

El término "agonista", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un modulador que, cuando se pone en contacto con una molécula de interés, provoca un aumento en la magnitud de una determinada actividad o función de la molécula en comparación con la magnitud de la actividad o función observada en la ausencia del agonista. Los

agonistas de interés particulares pueden incluir, pero no se limitan a, polipéptidos de IL-13 o polipéptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos o cualquier otra molécula que se una a hIL-13.

El término "antagonista" o "inhibidor", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un modulador que, cuando se pone en contacto con una molécula de interés, causa una disminución en la magnitud de una determinada actividad o función de la molécula en comparación con la magnitud de la actividad o función observada en ausencia del antagonista. Los antagonistas de interés particulares incluyen aquellos que bloquean o modulan la actividad biológica o inmunológica de hIL-13 y/o hIL-13. Los antagonistas e inhibidores de hIL-13 y/o hIL-13 pueden incluir, pero no se limitan a, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos o cualquier otra molécula que se una a hIL-13 y/o hIL-13.

El término "inhibir la unión al receptor" se refiere a la capacidad de la proteína de unión para evitar la unión de IL-13 a uno o más de sus receptores. Semejante inhibición de la unión al receptor daría como resultado la disminución o la anulación de la actividad biológica mediada por la unión de IL-13 a su receptor o receptores.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de una terapia que es suficiente para reducir o mejorar la gravedad y/o duración de un trastorno o uno o más síntomas del mismo, prevenir el avance de un trastorno, provocar la regresión de un trastorno, prevenir la recurrencia, el desarrollo, el inicio o la progresión de uno o más síntomas asociados con un trastorno, detectar un trastorno o potenciar o mejorar los efectos profilácticos o terapéuticos de otra terapia (p.ej., agente profiláctico o terapéutico).

El término "muestra", según se utiliza en la presente memoria, se utiliza en su sentido más amplio. Una "muestra biológica", según se utiliza en la presente memoria, incluye, pero no se limita a, cualquier cantidad de un ser vivo o un ser anteriormente vivo. Tales seres vivos incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, ratones, ratas, monos, perros, conejos y otros animales. Tales sustancias incluyen, pero no se limitan a, sangre, suero, orina, fluido sinovial, células, órganos, tejidos, médula ósea, nódulos linfáticos y bazo.

I. Anticuerpos que unen IL-13 humana.

Un aspecto de la presente descripción proporciona anticuerpos monoclonales murinos aislados, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que se unen a IL-13 con alta afinidad, una velocidad de disociación lenta y una alta capacidad de neutralización. Un segundo aspecto de la descripción proporciona anticuerpos quiméricos que se unen a IL-13. Un tercer aspecto de la descripción proporciona anticuerpos humanizados, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que se unen a IL-13. Preferiblemente, los anticuerpos, o porciones de los mismos, son anticuerpos aislados. Preferiblemente, los anticuerpos de la descripción son anticuerpos neutralizadores anti-IL-13 humana y/o anti-IL-13 humana.

A. Método de producción de anticuerpos anti -L-13

Los anticuerpos de la presente descripción se pueden preparar mediante cualquiera de una serie de mecanismos conocidos en la técnica.

1. Anticuerpos monoclonales anti-IL-13 que utilizan tecnología de hibridoma

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar utilizando una amplia variedad de mecanismos conocidos en la técnica que incluyen el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes y de presentación en fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir utilizando mecanismos de hibridoma que incluyen los conocidos en la técnica y que ilustran, por ejemplo, Harlow et al., en *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling, et al., En: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681* (Elsevier, N.Y. 1981). El término "anticuerpo monoclonal" según se utiliza en la presente memoria no está limitado a anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridoma. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que deriva de un único clon, que incluye cualquier clon eucariótico, procariótico o de fago, y no al método mediante el cual se produce.

Los métodos para producir y escrutar anticuerpos específicos utilizando la tecnología de hibridoma son rutinarios y bien conocidos en la técnica. En una realización, la presente descripción proporciona métodos para generar anticuerpos monoclonales así como anticuerpos producidos por el método que comprende cultivar una célula de hibridoma que secreta un anticuerpo de la descripción en donde, preferiblemente, el hibridoma se genera fusionando esplenocitos aislados de un ratón inmunizado con un antígeno de la descripción con células de mieloma y a continuación escrutando los hibridomas resultantes de la fusión para determinar clones de hibridoma que secretan un anticuerpo capaz de unirse a un polipéptido de la descripción (véase el Ejemplo 1.2). Brevemente, los ratones se pueden inmunizar con un antígeno de IL-13. En una realización preferida, el antígeno de IL-13 se administra con un

coadyuvante para estimular la respuesta inmunitaria. Tales adyuvantes incluyen coadyuvante de Freund completo o incompleto, RIBI (muramil dipéptidos) o ISCOM (complejos inmunoestimuladores). Tales coadyuvantes pueden proteger al polipéptido contra la dispersión rápida secuestrándolo en un depósito local, o pueden contener sustancias que estimulan al anfitrión para que secreta factores que son quimiotácticos para macrófagos y otros componentes del sistema inmunológico. Preferiblemente, si se administra un polipéptido, el programa de inmunización implicará dos o más administraciones del polipéptido, distribuidas durante varias semanas.

Después de la inmunización de un animal con un antígeno de IL-13, se pueden obtener anticuerpos y/o células productoras de anticuerpos del animal. Se obtiene un suero que contiene anticuerpo anti-IL-13 del animal por sangrado o sacrificio del animal. El suero se puede utilizar tal como se obtiene del animal, se puede obtener una fracción de inmunoglobulina del suero, o se pueden purificar los anticuerpos anti-IL-13 a partir del suero. El suero o las inmunoglobulinas obtenidos de esta manera son policlonales, teniendo así una matriz heterogénea de propiedades.

Una vez que se detecta una respuesta inmunitaria, p.ej., se detectan anticuerpos específicos para el antígeno IL-13 en el suero de ratón, se recoge el bazo de ratón y se aíslan los esplenocitos. Los esplenocitos se fusionan a continuación mediante técnicas bien conocidas con cualquier célula de mieloma adecuada, por ejemplo, células de la línea celular SP20 disponible de la ATCC. Los hibridomas se seleccionan y se clonan por dilución limitada. Los clones de hibridoma se analizan a continuación mediante métodos conocidos en la técnica para células que secretan anticuerpos capaces de unirse a IL-13. El fluido ascítico, que generalmente contiene altos niveles de anticuerpos, se puede generar inmunizando ratones con clones de hibridoma positivos.

En otra realización, los hibridomas inmortalizados que producen anticuerpos se pueden preparar a partir del animal inmunizado. Después de la inmunización, el animal se sacrifica y las células B esplénicas se fusionan a células de mieloma inmortalizadas como es bien conocido en la técnica. Ver, p.ej., Harlow y Lane, más arriba. En una realización preferida, las células de mieloma no secretan polipéptidos de inmunoglobulina (una línea celular no secretora). Después de la fusión y la selección con antibióticos, los hibridomas se escrutan utilizando IL-13, o una porción de la misma, o una célula que expresa IL-13. En una realización preferida, el escrutinio inicial se realiza utilizando un inmunoensayo con enzima ligada (ELISA) o un radioinmunoensayo (RIA), preferiblemente un ELISA. Un ejemplo de escrutinio con ELISA se proporciona en el documento WO 00/37504, incorporado a la presente memoria como referencia.

Los hibridomas productores de anticuerpos anti-IL-13 se seleccionan, se clonan y se escrutan adicionalmente para determinar características deseables, que incluyen crecimiento de hibridoma robusto, alta producción de anticuerpos y características de anticuerpos deseables, como se comenta adicionalmente a continuación. Los hibridomas se pueden cultivar y expandir *en vivo* en animales singénicos, en animales que carecen de un sistema inmunológico, p.ej., ratones carentes de sistema inmunológico, o en cultivo celular *in vitro*. Los métodos para seleccionar, clonar y expandir hibridomas son bien conocidos por los expertos normales en la técnica.

En una realización preferida, los hibridomas son hibridomas de ratón, como se describió anteriormente. En otra realización preferida, los hibridomas se producen en una especie no humana, no de ratón, tales como ratas, ovejas, cerdos, cabras, vacas o caballos. En otra realización, los hibridomas son hibridomas humanos, en los que un mieloma no secretor humano se fusiona con una célula humana que expresa un anticuerpo anti-IL-13.

Los fragmentos de anticuerpo que reconocen epítomos específicos se pueden generar mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')₂ de la invención se pueden producir por escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, utilizando 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 la cadena ligera y el dominio CHI de la cadena pesada.

2. Anticuerpos monoclonales anti-IL-13 utilizando SLAM

En otro aspecto de la descripción, los anticuerpos recombinantes se generan a partir de linfocitos únicos aislados utilizando un procedimiento denominado en la técnica método de anticuerpos de linfocitos seleccionados (SLAM), como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.627.052, en la Publicación PCT WO 92/02551 y Babcock, J.S. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7843-7848. En este método, las células individuales que secretan anticuerpos de interés, p.ej., linfocitos derivados de uno cualquiera de los animales inmunizados descritos en la Sección 1, se escrutan utilizando un análisis de placa hemolítica específica de antígeno, en donde el antígeno IL-13, una subunidad de IL-13, o un fragmento de la misma, se acoplan a glóbulos rojos de oveja utilizando un conector, tal como biotina, y se utiliza para identificar células individuales que secretan anticuerpos con especificidad para IL-13. Tras la identificación de las células secretoras de anticuerpo de interés, se rescatan los ADNc de la región variable de cadena pesada y ligera de las células mediante PCR con transcriptasa inversa y estas regiones variables se pueden expresar a continuación, en el contexto de regiones constantes de inmunoglobulina apropiadas

(p.ej., regiones constantes humanas), en células anfitrionas de mamífero, tales como células COS o CHO. Las células anfitrionas transfectadas con las secuencias de inmunoglobulina amplificadas, derivadas de linfocitos seleccionados *in vivo*, se pueden someter después a un análisis y selección adicionales *in vitro*, por ejemplo, mediante inmunopurificación de las células transfectadas para aislar las células que expresan anticuerpos contra IL-13. Las secuencias de inmunoglobulinas amplificadas se pueden manipular *in vitro*, por ejemplo mediante métodos de maduración de afinidad *in vitro*, como los descritos en la Publicación PCT WO 97/29131 y la Publicación PCT WO 00/56772.

3. Anticuerpos monoclonales anti-IL-13 que utilizan animales transgénicos

En otra realización de la presente descripción, los anticuerpos se producen inmunizando un animal no humano que comprende algo, o todo, el locus de inmunoglobulina humana con un antígeno de IL-13. En una realización preferida, el animal no humano es un ratón transgénico XENOMOUSE, una cepa de ratón modificada genéticamente que comprende grandes fragmentos de los loci de inmunoglobulina humana y tiene una producción de anticuerpos de ratón deficiente. Véanse, p.ej., Green et al. Nature Genetics 7:13-21 (1994)) y Patentes de los Estados Unidos 5.916.771, 5.939.598, 5.985.615, 5.998.209, 6.075.181, 6.091.001, 6.114.598 y 6.130.364. Véanse también los documentos WO 91/10741, publicado el 25 de Julio, 1991, WO 94/02602, publicado el 3 de Febrero, 1994, WO 96/34096 y WO 96/33735, ambos publicados el 31 de Octubre de 1996, WO 98/16654, publicado el 23 de Abril, 1998, WO 98/24893, publicado el 11 de Junio, 1998, WO 98/50433, publicado el 12 de Noviembre, 1998, WO 99/45031, publicado el 10 de Septiembre, 1999, WO 99/53049, publicado el 21 de Octubre, 1999, WO 00 09560, publicado el 24 de Febrero, 2000 y WO 00/037504, publicado el 29 de Junio, 2000. El ratón transgénico XENOMOUSE produce un repertorio humano de tipo adulto de anticuerpos completamente humanos, y genera Mab humanos específicos de antígeno. El ratón transgénico XENOMOUSE contiene aproximadamente 80% del repertorio de anticuerpos humanos a través de la introducción de fragmentos YAC de configuración de línea germinal de fragmentos YAC de configuración de la línea germinal con un tamaño de megabases de los loci de la cadena pesada humana y de los loci de la cadena ligera x. Véase, Mendez et al., Nature Genetics 15:146-156 (1997), Green y Jakobovits J. Exp. Med. 188:483-495 (1998).

4. Anticuerpos monoclonales anti-IL-13 utilizando bibliotecas de anticuerpos recombinantes

También se pueden utilizar métodos *in vitro* para preparar los anticuerpos de la descripción, en donde se escruta una biblioteca de anticuerpos para identificar un anticuerpo que tiene la especificidad de unión deseada. Los métodos para tal escrutinio de anticuerpos recombinantes son bien conocidos en la técnica e incluyen métodos descritos, por ejemplo, por Ladner et al. en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.223.409; Kang et al. en la Publicación PCT Núm. WO 92/18619; Dower et al. en la Publicación PCT Núm. WO 91/17271; Winter et al. en la Publicación PCT Núm. WO 92/20791; Markland et al. en la Publicación PCT Núm. WO 92/15679; Breitling et al. en la Publicación PCT Núm. WO 93/01288; McCafferty et al. en la Publicación PCT Núm. WO 92/01047; Garrard et al. en la Publicación PCT Núm. WO 92/09690; Fuchs et al. (1991) en Bio/Technology 9: 1370-1372; Hay et al. (1992) en Hum Antibody Hybridomas 3: 81-85; Huse et al. (1989) en Science 246: 1275-1281; McCafferty et al., en Nature (1990) 348: 552-554; Griffiths et al. (1993) en EMBO J 12: 725-734; Hawkins et al. (1992) en J Mol Biol 226: 889-896; Clackson et al. en (1991) Nature 352: 624-628; Gram et al. (1992) en PNAS 89: 3576-3580; Garrard et al. (1991) en Bio/Technology 9: 1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) en Nuc Acid Res 19: 4133-4137; y Barbas et al. (1991) en PNAS 88: 7978-7982, publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos 20030186374 y Publicación PCT Núm. WO 97/29131.

La biblioteca de anticuerpos recombinantes puede ser de un sujeto inmunizado con IL-13 o IL-13, o una porción de IL-13 o IL-13. Alternativamente, la biblioteca de anticuerpos recombinantes puede ser de un sujeto no sometido a tratamiento previo, es decir, uno que no ha sido inmunizado con IL-13, tal como una biblioteca de anticuerpos humanos de un sujeto humano que no ha sido inmunizado con IL-13 humana. Los anticuerpos de la descripción se seleccionan escrutando la biblioteca de anticuerpos recombinantes con el péptido que comprende IL-13 humana para seleccionar de ese modo los anticuerpos que reconocen IL-13. Los métodos para llevar a cabo semejante escrutinio y selección son bien conocidos en la técnica, tal como se describe en las referencias en el párrafo anterior. Para seleccionar anticuerpos de la descripción que tengan afinidades de unión particulares para hIL-13, tales como los que se disocian de la IL-13 humana con una constante k_{off} particular, se puede utilizar el método conocido en la técnica de resonancia de plasmón superficial para seleccionar anticuerpos que tienen la constante k_{off} deseada. Para seleccionar anticuerpos de la descripción que tengan una actividad neutralizadora particular para hIL-13, tales como aquellos con una CI_{50} particular, se pueden utilizar métodos convencionales conocidos en la técnica para evaluar la inhibición de la actividad de hIL-13.

En un aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une a la IL-13 humana. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo neutralizador. En diversas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante o un anticuerpo monoclonal.

Por ejemplo, los anticuerpos de la presente descripción también se pueden generar utilizando diversos métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en fagos, los dominios de anticuerpos funcionales se presentan sobre la superficie de partículas de fagos que llevan las secuencias de polinucleótidos que los codifican. En particular, semejante fago se puede utilizar para presentar dominios de unión a antígeno expresados a partir de un repertorio o biblioteca combinatoria de anticuerpos (p.ej., humana o murina). El fago que expresa un dominio de unión a antígeno que se une al antígeno de interés se puede seleccionar o identificar con un antígeno, p.ej., utilizando un antígeno marcado o un antígeno unido o capturado a una superficie sólida o esfera. Los fagos utilizados en estos métodos son típicamente fagos filamentosos que incluyen dominios de unión a fd y M13 expresados a partir de fagos, con dominios de anticuerpo Fab, Fv o Fv estabilizado con disulfuro fusionados de forma recombinante con el gen III del fago o la proteína VIII del gen. Los ejemplos de métodos de presentación en fagos que se pueden utilizar para preparar los anticuerpos de la presente descripción incluyen los descritos por Brinkman et al., en *J. Immunol. Methods* 182: 41-50 (1995); Ames et al., en *J. Immunol. Methods* 184: 177-186 (1995); Kettleborough et al., en *Eur. J. Immunol.* 24:952-958 (1994); Persic et al., en *Gene* 1879-18 (1997); Burton et al., en *Advances in Immunology* 57:191-280 (1994); Solicitud PCT Núm. PCT/GB91/01134; publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y Patentes de los Estados Unidos Núm. 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

Como se describe en las referencias anteriores, después de la selección del fago, las regiones codificantes del anticuerpo del fago se pueden aislar y utilizar para generar anticuerpos completos que incluyen anticuerpos humanos o cualquier otro fragmento de unión al antígeno deseado, y se pueden expresar en cualquier anfitrión deseado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levaduras y bacterias, p.ej., como se describe con detalle a continuación. Por ejemplo, los mecanismos para producir recombinantemente fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ también se pueden emplear utilizando métodos conocidos en la técnica tales como los descritos en la Publicación PCT WO 92/22324; Mullinax et al., *BioTechniques* 12 (6): 864 - 869 (1992); y Sawai et al., *AJRI* 34: 26-34 (1995); y Better et al., *Science* 240: 1041-1043 (1988). Los ejemplos los mecanismos que se pueden utilizar para producir Fv y anticuerpos de cadena sencilla incluyen los descritos en la Patente de los Estados Unidos 4.946.778 y 5.258.498; Huston et al., *Methods in Enzymology* 203:46-88 (1991); Shu et al., *PNAS* 90: 7995-7999 (1993); y Skerra et al., *Science* 240:1038-1040 (1988).

Como alternativa al escrutinio de bibliotecas de anticuerpos recombinantes mediante presentación en fagos, se pueden aplicar otras metodologías conocidas en la técnica para rastrear grandes bibliotecas combinatorias a la identificación de anticuerpos de especificidad dual de la descripción. Un tipo de sistema de expresión alternativo es aquel en el que la biblioteca de anticuerpos recombinantes se expresa como fusiones de ARN-proteína, como se describe en Publicación PCT Núm. WO 98/31700 de Szostak and Roberts, y por Roberts, R.W. y Szostak, J.W. (1997) en *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12297-12302. En este sistema, se crea una fusión covalente entre un ARNm y el péptido o proteína que codifica mediante traducción *in vitro* de ARNm sintéticos que transportan puromicina, un antibiótico aceptor de peptidilo, en su extremo 3'. Por lo tanto, un ARNm específico se puede enriquecer a partir de una mezcla compleja de ARNm (p.ej., una biblioteca combinatoria) basándose en las propiedades del péptido o proteína codificados, p.ej., anticuerpo, o parte del mismo, tal como la unión del anticuerpo, o porción del mismo, al antígeno de especificidad dual. Las secuencias de ácido nucleico que codifican anticuerpos, o porciones de los mismos, recuperados del escrutinio de tales bibliotecas se pueden expresar por medios recombinantes como se describió anteriormente (p.ej., en células anfitrionas de mamíferos) y, además, se pueden someter a una maduración de afinidad adicional mediante rondas adicionales de escrutinio de fusiones de ARNm-péptido en las que se han introducido mutaciones en las secuencias seleccionadas originalmente, o mediante otros métodos de afinidad maduración *in vitro* de anticuerpos recombinantes, como se describió anteriormente.

En otro enfoque, los anticuerpos de la presente descripción también se pueden generar utilizando métodos de presentación en levadura conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en levadura, se utilizan métodos genéticos para trabar los dominios de anticuerpos a la pared celular de levadura y presentarlos sobre la superficie de la levadura. En particular, semejante levadura se puede utilizar para presentar dominios de unión a antígeno expresados a partir de un repertorio o biblioteca combinatoria de anticuerpos (p.ej., humana o murina). Los ejemplos de métodos de presentación en levadura que se pueden utilizar para preparar los anticuerpos de la presente descripción incluyen los descritos por Wittrup, et al. en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.699.658.

B. Producción de anticuerpos para IL-13 recombinante

Los anticuerpos de la presente descripción se pueden producir mediante cualquiera de una serie de mecanismos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la expresión de células anfitrionas, en donde los vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera se transfectan en una célula anfitriona mediante técnicas estándar. Se pretende que las diversas formas del término "transfección" abarquen una amplia variedad de mecanismos utilizados comúnmente para la introducción de ADN exógeno en una célula anfitriona procarionta o eucariota, p.ej.,

electroporación, precipitación con fosfato cálcico, transfección con DEAE-dextrano y similares. Aunque es posible expresar los anticuerpos de la descripción en células anfitrionas procariota o eucariota, es preferible la expresión de anticuerpos en células eucariotas, y muy preferible en células anfitrionas de mamífero, porque tales células eucariotas (y en particular células de mamífero) son más propensas que las células procariotas a ensamblar y secretar un anticuerpo adecuadamente plgado e inmunológicamente activo.

Las células anfitrionas de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la descripción incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (incluidas células CHO dhfr-, descritas por Urlaub y Chasin, (1980) en Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220, utilizadas con un marcador seleccionable DHFR, p.ej., como describe en R.J. Kaufman y P.A. Sharp (1982) en Mol. Biol. 159: 601-621), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos en células anfitrionas de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células anfitrionas durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células anfitrionas o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo al medio de cultivo en el que se cultivan las células anfitrionas. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo utilizando métodos convencionales de purificación de proteínas.

Las células anfitrionas también se pueden utilizar para producir fragmentos funcionales de anticuerpos, tales como fragmentos Fab o moléculas scFv. Se entenderá que las variaciones en el procedimiento anterior están dentro del alcance de la presente descripción. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula anfitriona con ADN que codifica fragmentos funcionales de la cadena ligera y/o la cadena pesada de un anticuerpo de esta descripción. La tecnología de ADN recombinante también se puede utilizar para eliminar una parte, o la totalidad del ADN que codifica una o ambas cadenas ligeras y pesadas que no es necesaria para la unión a los antígenos de interés. Las moléculas expresadas a partir de tales moléculas de ADN truncadas también están incluidas en los anticuerpos de la descripción. Además, se pueden producir anticuerpos bifuncionales en los que una cadena pesada y una ligera son un anticuerpo de la descripción y la otra cadena pesada y ligera son específicas para un antígeno distinto de los antígenos de interés mediante el entrecruzamiento de un anticuerpo de la descripción a un segundo anticuerpo por métodos convencionales de entrecruzamiento químico.

En un sistema preferido para la expresión recombinante de un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la descripción, se introduce un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo en células CHO dhfr- mediante transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de la cadena pesada y ligera del anticuerpo están ligados cada uno operativamente a los elementos reguladores del promotor de CMV/potenciador de AdMLP para conducir a altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también lleva un gen de DHFR, que permite la selección de células CHO que se han transfectado con el vector utilizando la selección/amplificación con metotrexato. Las células anfitrionas transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo y el anticuerpo intacto se recupera del medio de cultivo. Se utilizan las técnicas de biología molecular convencionales para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células anfitrionas, seleccionar transformantes, cultivar las células anfitrionas y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. Además, la descripción proporciona un método para sintetizar un anticuerpo recombinante de la descripción cultivando una célula anfitriona de la descripción en un medio de cultivo adecuado hasta que se sintetiza un anticuerpo recombinante de la descripción. El método puede comprender adicionalmente el aislamiento del anticuerpo recombinante del medio de cultivo.

1. Anticuerpos anti IL-13

La Tabla 5 es una lista de secuencias de aminoácidos de regiones VH y VL de anticuerpos anti-hIL-13 preferidos de la descripción.

ES 2 661 032 T3

Tabla 5 Lista de secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL

SEQ ID No.	Región de la proteína		Secuencia
			123456789012345678901234567890
32	VH 25C8		QVQLQQPGAELVVRPGASVQLSCKASGYTFT SSWIH WVNQRPGQGLEWIG MIHPDSETRL NQKFKD KATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSED SAVYYCAST TATDFDY WGQGTTLTVSS
	VH 25C8 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO: 32	SSWIH
	VH 25C8 CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 32	MIHPDSETRLNQKFKD
	VH 25C8 CDR-H3	Residuos 99-105 de SEQ ID NO: 32	TATDFDY
33	VL 25CB		DVVLQTPLSLPVNIGDQASIS CKSTKSL NSDGFTYLD WYLQKPGQSPQLLI YLVSNRF SGAPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGV YYCF QHNYLPLT FGAGTNLELKR
	VL 25C8 CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 33	KSTKSLNSDGFTYLD
			123456789012345678901234567890
	VL 25C8 CDR-L2	Residuos 55-61 de SEQ ID NO: 33	KVSNRFS
	VL 25C8 CDR-L3	Residuos 94-102 de SEQ ID NO: 33	FQHNYLPLT
34	VH 9C11		QVRLQQPGAELVVRPGASVKLSCKASGYTFT SSWIH WVNQRPGQGLEWIG MIHPDSETRL NQKFKD KATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSED SAVYYCAST TATDFDY WGQGTTLTVSS
	VH 9C11 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO: 34	SSWIH
	VH 9C11 CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 34	MIHPDSETRLNQKFKD
	VH 9C11 CDR-H3	Residuos 99-105 de SEQ ID NO: 34	TATDFDY
35	VL 9C11		DVVLQTPLSLPVNIGDQASIS CRSTQTL NSDGFTYLD WYLQKPGQSPQLLI YLVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGV YYCF QNNYLPLT FGAGTKLELKR
	VL 9C11 CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 35	RSTQTLNSDGFTYLD
	VL 9C11 CDR-L2	Residuos 55-61 de SEQ ID NO: 35	LVSNRFS
	VL 9C11 CDR-L3	Residuos 94-102 de SEQ ID NO: 35	FQNNYLPLT
36	VH 21D9		QVQLQQSGDDLVPKPGASVKLSCKASGYTFT SYWIN WIKRPGQGLEWIG HIAPGSGETYD NEMFKD KAKLTVDTSSNTAYIHLSSLSESD SAVYFCARG SFTFFYAMDY WGQGTSTVTVSS
	VH 21D9 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO: 36	SYWIN
	VH 21D9 CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 36	HIAPGSGETYDNEMFKD
	VH 21D9 CDR-H3	Residuos 99-109 de SEQ ID NO: 36	GSFTFFYAMDY

ES 2 661 032 T3

SEQ ID No.	Región de la proteína		Secuencia
37	VL 21D9		DVLMQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQNIV HSNGKTYLEWYLQRPQGSPKLLIYKVS NRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDLGV YYCFQGSHPVYTFGGG TKLEIKR
	VL 21D9 CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 37	RSSQNIVHSNGKTYLE
	VL 21D9 CDR-L2	Residuos 55-61 de SEQ ID NO: 37	KVS NRFS
	VL 21D9 CDR-L3	Residuos 94-102 de SEQ ID NO: 37	FQGSHPVYT
			123456789012345678901234567890
38	VH 22D10		QVQLQQSGDDLVPKPGASVKLSCKASGYTFT SYWINWIKORPGQGLEWIGHIAPGSGETYD NEMFKDKAKLTVDTSSSTAYIHLSSLSESD SAVYFCARGSFTFFYAMDYWGQGTSTVTVSS
	VH 22D10 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO: 38	SYWIN
	VH 22D10 CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 38	HIAPGSGETYDNEMFKD
	VH 22D10 CDR-H3	Residuos 99-109 de SEQ ID NO: 38	GSFTFFYAMDY
37	VL 22D10		DVLMQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQNIV HSNGKTYLEWYLQRPQGSPKLLIYKVS NRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDLGV YYCFQGSHPVYTFGGG TKLEIKR
	VL 22D10 CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 37	RSSQNIVHSNGKTYLE
	VL 22D10 CDR-L2	Residuos 55-61 de SEQ ID NO: 37	KVS NRFS
	VL 22D10 CDR-L3	Residuos 94-102 de SEQ ID NO: 37	FQGSHPVYT
39	VH 5F1		QVQLQQSGAELARPGTSVKLSCKASGYTFT TYGISWVKQRTGQGLEWIGEIYPGSYNTYY NEKFRGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSED SAVYFCSRWRTSYFSDYGYFDYWGQGTTLT VSS
	VH 5F1 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO: 39	TYGIS
	VH 5F1 CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 39	EIYPGSYNTYYNEKFRG
	VH 5F1 CDR-H3	Residuos 99-112 de SEQ ID NO: 39	WRTSYFSDYGYFDY
40	VL 5F1		DVVMQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLV HSHGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYTVS NRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDLGV YFCSQSTHVPYTFGGG TKLEIKR
	VL 5F1 CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 40	RSSQSLVHSHGNTYLH
	VL 5F1 CDR-L2	Residuos 55-61 de SEQ ID NO: 40	TVS NRFS
	VL 5F1 CDR-L3	Residuos 94-102 de SEQ ID NO: 40	SQSTHVPYT
41	VH 5G1		

ES 2 661 032 T3

SEQ ID No.	Región de la proteína		Secuencia
			QVQLQQSGAELARPGTSVKLSCKASGYTFT TYGVS WVKQRTGQGLEWIGE IYPGN YNTYY NEKFRG KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSED SAVYFCSR WRTSYFSDYGYFDY WGQGTTLT VSS
			123456789012345678901234567890
	VH 5G1 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO: 41	TYGVS
	VH 5G1 CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 41	EIYPGN YNTYY NEKFRG
	VH 5G1 CDR-H3	Residuos 99-112 de SEQ ID NO: 41	WRTSYFSDYGYFDY
40	VL 5G1		DVVMTQTPLSLPVSIGDQASISCR SSQSLV HSHGNTYL HWYLPKPGQSPKLLI YTVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDLGV YFCS QSTHVPYT FGGGTKLEIKR
	VL 5G1 CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 40	RSSQSLVHSHGNTYLH
	VL 5G1 CDR-L2	Residuos 55-61 de SEQ ID NO: 40	TVSNRFS
	VL 5G1 CDR-L3	Residuos 94-102 de SEQ ID NO: 40	SQSTHVPYT
42	VH 3H7		EVQLVESGGGLVPGGSLKLSCAASGFTFS TYAMS WVRQTPEKRLEWVAGI SSGGSYTY PETMKG RFTISRDNARNTLYLQMSLRSED TAIYYCTR GS WGGQTSVTVSS
	VH 3H7 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO: 42	TYAMS
	VH 3H7 CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 42	GISSGGSYTY PETMKG
	VH 3H7 CDR-H3	Residuos 99-100 de SEQ ID NO: 42	GS
43	VL 3H7		DVVLQTPLTSLVTIGQPASISCK SSQSLL DSDGETYLN WLLQRPQSPKRLI YLVSKLD SGVPDRFTGSGSGTDFTLTKISRVEAEDLGV YYC WQGT HFPWT FGGGTKLEIKR
	VL 3H7 CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 43	KSSQSLLDSDGETYLN
	VL 3H7 CDR-L2	Residuos 55-61 de SEQ ID NO: 43	LVS KLDS
	VL 3H7 CDR-L3	Residuos 94-102 de SEQ ID NO: 43	WQGT HFPWT
44	VH 14B2		EVKLVESGGGLVVRPGGSLKLSCAASGFTFS SYAMN WVRQTPEKRLEWVASI SSGGNIYYS DSVKG RFTISRDNARNTLHLQMSLRSEDT AMYCARD GYLYAMDY WGQGTSTVTVSS
	VH 14B2 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO: 44	SYAMN
	VH 14B2 CDR-H2	Residuos 50-65 de SEQ ID NO: 44	SISSGGNIYYS DSVKG
			123456789012345678901234567890
	VH 14B2 CDR-H3	Residuos 98-106 de SEQ ID NO: 44	DGYLYAMDY
45	VL 14B2		

ES 2 661 032 T3

SEQ ID No.	Región de la proteína		Secuencia
			DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQNLL YSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTR ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVKAEDLA VYYCQQYYSYPFTFGSGTKLEIKR
	VL 14B2 CDR-L1	Residuos 24-40 de SEQ ID NO: 45	KSSQNLLYSSNQKNYLA
	VL 14B2 CDR-L2	Residuos 56-62 de SEQ ID NO: 45	WASTRES
	VL 14B2 CDR-L3	Residuos 95-103 de SEQ ID NO: 45	QQYYSYPFT
46	VH 13C5		QVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSL TSDMGVDWIRQPSGKLEWLAHIWDDV YNPALKSRLTISKDTSSSQVFLMLASV DTATYYCARTVSSGYIYYAMDYWGQTS VSS
	VH 13C5 CDR-H1	Residuos 31-37 de SEQ ID NO: 46	TSDMGVD
	VH 13C5 CDR-H2	Residuos 52-67 de SEQ ID NO: 46	HIWWDDVKRYNPALKS
	VH 13C5 CDR-H3	Residuos 100-112 de SEQ ID NO: 46	TVSSGYIYYAMDY
47	VL 13C5		DIQMTQTASSLSASLGDRVTISCRASQDIR NYLNWYQRKPDGTVKLLIFYTSKLHSGVPS RFGSGSGTDYSLTIRNLEQEDIATYFCQQ GNTLPLTFGGGTKLEIKR
	VL 13C5 CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID NO: 47	RASQDIRNYLN
	VL 13C5 CDR-L2	Residuos 50-56 de SEQ ID NO: 47	YTSKLHS
	VL 13C5 CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID NO: 47	QQGNTLPLT
48	VH 29G5		QVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSL TSDMGVDWIRQPSGKLEWLAHIWDDV YNPALKSRLTISKDTSSSQVFLMLASV DTATYYCARIVSSGYIYYALDYWGQTS VSS
	VH 29G5 CDR-H1	Residuos 31-37 de SEQ ID NO: 48	TSDMGVD
	VH 29G5 CDR-H2	Residuos 52-67 de SEQ ID NO: 48	HIWWDDVKRYNPALKS
	VH 29G5 CDR-H3	Residuos 100-112 de SEQ ID NO: 48	IVSSGYIYALDY
			123456789012345678901234567890
49	VL 29G5		DIQMTQTASSLSASLGDRVTISCRASQDIR NYLNWYQRKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPS RFGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQ GNTLPLTFGGGTKLEIKR
	VL 29G5 CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID NO: 49	RASQDIRNYLN
	VL 29G5 CDR-L2	Residuos 50-56 de SEQ ID NO: 49	YTSRLHS
	VL 29G5 CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID NO: 49	QQGNTLPLT
50	VH 33C3		

ES 2 661 032 T3

SEQ ID No.	Región de la proteína		Secuencia
			QVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSL TSDLGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWDDV KRYNPALKSR LTISKDTSSSQVFLMIASVDTA DTATYYCARIGSSGYIYYEMDYWGQTSVT VSS
	VH 33C3 CDR-H1	Residuos 31-37 de SEQ ID NO: 50	TSDLGVG
	VH 33C3 CDR-H2	Residuos 52-67 de SEQ ID NO: 50	HIWDDVKRYNPALKS
	VH 33C3 CDR-H3	Residuos 100-112 de SEQ ID NO:50	IGSSGYIYYEMDY
51	VL 33C3		DIQMTQTSSLSASLGDRVTITCRASQDIR NYLNWY QKPDGTVKLLIYY YTSRLH SGVPS RFSGSGSDYSLTISNLDQEDIATYFCQQ GNTLPLTFGGTRLEIKR
	VL 33C3 CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID NO: 51	RASQDIRNYLN
	VL 33C3 CDR-L2	Residuos 50-56 de SEQ ID NO: 51	YTSRLHS
	VL 33C3 CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID NO: 51	QQGNTLPLT
52	VH 4A8		EVQLQQSGAEFVRPGALVKLSCKASGFNIK DYYMYWVKQRPEQGLEWIGRIDPEN GNTIY DPKFQ GKASITGDTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCARY YAYGPF DYWGQGTTLTVSS
	VH 4A8 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO: 52	DYYMY
	VH 4A8 CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 52	RIDPENGTIYDPKFQ G
	VH 4A8 CDR-H3	Residuos 99-107 de SEQ ID NO: 52	YAYGPF DY
53	VL 4A8		QAVVTQESALTTSPGETVTLT CRSSIG TVT TNNYANWVQEKPDH LFTGLIG STNNR APGV PARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFC ALWYSNHWV FGG TKL TVLG
	VL 4A8 CDR-L1	Residuos 23-36 de SEQ ID NO: 53	RSSIGTVTNNYAN
			123456789012345678901234567890
	VL 4A8 CDR-L2	Residuos 52-58 de SEQ ID NO: 53	STNNRAP
	VL 4A8 CDR-L3	Residuos 91-99 de SEQ ID NO: 53	ALWYSNHWV
54	VH 1B6		QVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLT GYGVN WVRQPPGKLEWLG MIWGDERID YN SALKSR LSITKDNSKSQVFLKMNSLQDDT GRYFCARD GYFPYAM DYWGQTSVTVSS
	VH 1B6 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO: 54	GYGVN
	VH 1B6 CDR-H2	Residuos 50-65 de SEQ ID NO: 54	MIWGDERIDYNSALKS
	VH 1B6 CDR-H3	Residuos 98-107 de SEQ ID NO: 54	DGYFPYAM DY
55	VL 1B6		NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASETVD SYGKSYLHWY QKPGQPPKLLIY LASN LES GVPARFSGSGSRDFTLIIDPVEADDAATY Y CCQNN EGPRTFGG TKLEIKR

ES 2 661 032 T3

SEQ ID No.	Región de la proteína		Secuencia
	VL 1B6 CDR-L1	Residuos 24-38 de SEQ ID NO: 55	RASETVDSYGKSYLH
	VL 1B6 CDR-L2	Residuos 54-60 de SEQ ID NO: 55	LASNLES
	VL 1B6 CDR-L3	Residuos 93-101 de SEQ ID NO: 55	QQNNEGPRT
56	VH 3E5		QVQLKESGPGPLVAPSQSL SITCTVSGFSLT GSSINWVRQPPGKLEWLGMIWGDGRIDYN SVLKSRLSISKDSSKSQVFLKMNSLQADDT ARYYCARD DGYYPYAMVY WGQTSVTVSS
	VH 3E5 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO: 56	GSSIN
	VH 3E5 CDR-H2	Residuos 50-65 de SEQ ID NO: 56	MIWGDGRIDYNSVLKS
	VH 3E5 CDR-H3	Residuos 98-107 de SEQ ID NO: 56	DGYYPYAMVY
57	VL 3E5		NIVLTQSPASLAVSLGQRATIFCRASE SVD SYGNSEFMHWYQQKSGQPPELLIYLASNLES GVPARFSGSGSRDTFTLTIDPVEADDAATF Y QQNNENPRT FGGGTKLEIKR
	VL 3E5 CDR-L1	Residuos 24-38 de SEQ ID NO: 57	RASESVDSYGNSEFMH
	VL 3E5 CDR-L2	Residuos 54-60 de SEQ ID NO: 57	LASNLES
	VL 3E5 CDR-L3	Residuos 93-101 de SEQ ID NO: 57	QQNNENPRT
			123456789012345678901234567890
58	VH 6C8		QVQLKESGPGPLVAPSQSL SITCTVSEFSLT GSSVNWVRQPPGKLEWLGMIWGDGRIDYN SALKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTD ARYYCARD DGYYPYAMNY WGQTSVTVSS
	VH 6C8 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO: 58	GSSVN
	VH 6C8 CDR-H2	Residuos 50-65 de SEQ ID NO: 58	MIWGDGRIDYNSALKS
	VH 6C8 CDR-H3	Residuos 98-107 de SEQ ID NO: 58	DGYYPYAMNY
59	VL 6C8		NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASE SVD SYGNSEFMHWYQQKPGQPPELLIYLASNLES GVPARFSGSGSRADFTLTIDPVEADDAATY Y QQNNENPRT FGGGTKLEIKR
	VL 6C8 CDR-L1	Residuos 24-38 de SEQ ID NO: 59	RASESVDSYGNSEFMH
	VL 6C8 CDR-L2	Residuos 54-60 de SEQ ID NO: 59	LASNLES
	VL 6C8 CDR-L3	Residuos 93-101 de SEQ ID NO: 59	QQNNENPRT
60	VH 5D3		QVQLKESGPGPLVAPSQSL SITCTVSGFSLT GYNINWVRQPPGKLEWLGLIWGDGNTAFN SALKSRLSISKDNSKSQVFLKLNLSLQTD ARYYCARD DGYYPYA IKYWGQTSVTVSS
	VH 5D3 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO: 60	GINECO
	VH 5D3 CDR-H2	Residuos 50-65 de SEQ ID NO: 60	LIWGDGNTAFNSALKS

SEQ ID No.	Región de la proteína		Secuencia
	VH 5D3 CDR-H3	Residuos 98-107 de SEQ ID NO: 60	DGYYPYAIKY
61	VL 5D3		NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASETVD SYGNSFMHWYQQKPGQPPELLIYLASNLES GVPAREFSGSGSRDFTLTIDPVEADDAATY YCQNNEDPRTFGGGTKLEIKR
	VL 5D3 CDR-L1	Residuos 24-38 de SEQ ID NO: 61	RASETVDSYGNSFMH
	VL 5D3 CDR-L2	Residuos 54-60 de SEQ ID NO: 61	LASNLES
	VL 5D3 CDR-L3	Residuos 93-101 de SEQ ID NO: 61	QQNNEDPRT
62	VH 8B6		QVQLKESGPGLVAPVPSQSLTITCTVSGFSLT GHNINWVRQPPGKLEWLGMIWGDGNTDFN SALKSRLSISKDNSKQVFLKLNLSLQTD ARYYCARD DGYYPYAIKFWGQGT SVTVSS
	VH 8B6 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO: 62	GHNIN
			123456789012345678901234567890
	VH 8B6 CDR-H2	Residuos 50-65 de SEQ ID NO: 62	MIWGDGNTDFNSALKS
	VH 8B6 CDR-H3	Residuos 98-107 de SEQ ID NO: 62	DGYYPYAIKF
63	VL 8B6		HIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASETVD SYGSSFLHWYQQKPGQPPELLIYLASKLES GVPAREFSGSGSRDFTLTIDPVEADDAATY YCQNNEGPRTFGGGSKLEIKR
	VL 8B6 CDR-L1	Residuos 24-38 de SEQ ID NO: 63	RASETVDSYGSSFLH
	VL 8B6 CDR-L2	Residuos 54-60 de SEQ ID NO: 63	LASKLES
	VL 8B6 CDR-L3	Residuos 93-101 de SEQ ID NO: 63	QQNEGPRT

5 Las secuencias de CDR de anticuerpo anti-IL-13 aisladas anteriores establecen una nueva familia de proteínas de unión a IL-13, aisladas de acuerdo con esta descripción, y que comprenden polipéptidos que incluyen las secuencias de CDR enumeradas en la Tabla 6 a continuación. Para generar y seleccionar CDR de la descripción que tienen una actividad de unión y/o neutralización de IL-13 preferidas con respecto a hIL-13 y/o hIL-13, se pueden utilizar métodos convencionales conocidos en la técnica para generar proteínas de unión de la presente descripción y evaluar las características de unión y/o neutralización de IL-13 y/o IL-13 de esas proteínas de unión, que incluyen, pero no se limitan a, las específicamente descritas en la presente memoria.

10 Tabla 6: Ligandos de afinidad de CDR para IL-13 consenso (los residuos alternativos se enumeran debajo de cada posición de aminoácido; - indica que el residuo puede estar ausente).

Región CDR	Identificador de SEQ	Consenso													
		Secuencia													
CDR-H1	SEQ ID NO: 64	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇							
		T	S	D	M	G	V	D							
		D			S	W	I	H							
		G			Y	Y	M	S							
		S			L	A		Y							
					H	S		N							
						N		G							

ES 2 661 032 T3

Región CDR	Identificador de SEQ	Consenso																
		Secuencia																
CDR-H2	SEQ ID NO: 65	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	X ₁₉	X ₁₅	X ₁₆	X ₁₇
		M	I	H	P	S	D	S	E	T	R	L	N	Q	K	F	K	D
		E	-	Y	S	G	G	Y	N	I	Y	Y	P	E	M	L	R	G
		H		A	W	S	E	G	Y	K	I	D	S	D	S	V	Q	S
		R		D	G	D	E		V		D	F	D	P	T	M		
		S		S			N		R		A			S	A			
		G		W												V		
		L																
CDR-H3	SEQ ID NO: 66	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	X ₁₄			
		W	R	T	S	Y	F	S	D	Y	G	Y	F	D	Y			
		T	A	F	T	F	Y	Y	L			A	M	V	F			
		G	S	Y	Y	G		I	Y			P	S	N				
		Y	G	S				F	P			E	L	K				
		D	V											I				
		I																
CDR-L1	SEQ ID NO: 67	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	X ₁₄	X ₁₅	X ₁₆	X ₁₇
		K	S	S	Q	N	L	L	Y	S	S	N	Q	K	N	Y	L	A
		R	A	T	K	S	T	Q	N	I	D	G		F	T	F	A	D
					I	T	S	V	H	T	N			N	S		M	E
						G			D		H			E				H
						E			T	Y				S				N
CDR-L2	SEQ ID NO: 68	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇										
		L	V	S	N	R	F	S										
		S	T	N	K	L	D	P										
		K	A		T	K	E	R										
		T			R		H											
		W			M		A											
CDR-L3	SEQ ID NO: 69	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉								
		F	Q	H	N	Y	L	P	L	T								
		W	L	G	S	T	V	H	F	V								
		Q		Y	T	S	F		Y									
		A		W	Y	E	Y		W									
				N	L	H	N		R									
							G											
							D											
					P													

2. Anticuerpos quiméricos anti-IL-13

5 Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones del anticuerpo derivan de diferentes especies animales, tales como anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal

murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica y se discuten en detalle en el Ejemplo 2.1. Véanse, p.ej., Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Gillies et al., (1989) J. Immunol. Methods 125:191-202; Patentes de los Estados Unidos Núm. 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397. Además, se han desarrollado técnicas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855; Neuberger et al., 1984, Nature 312: 604-608; Takeda et al., 1985, Nature 314: 452-454) empalmado genes de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad de antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada.

En una realización, los anticuerpos quiméricos de la descripción se producen reemplazando la región constante de la cadena pesada de los anticuerpos anti-IL-13 humana monoclonales de murino descritos en la sección 1 con una región constante de IgG1 humana. En una realización específica, el anticuerpo quimérico de la descripción comprende una región variable de cadena pesada (V_H) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 42; SEQ ID NO: 46 y una región variable de cadena ligera (V_L) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 43; o SEQ ID NO: 47.

3. Anticuerpos humanizados anti-IL-13

Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de una especie no humana que se unen al antígeno deseado que tiene una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la especie no humanas y las regiones marco de una molécula de inmunoglobulina humana. Se describen secuencias de Ig humanas conocidas, p.ej., www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.edu/about.pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/m-ikeimages.html; www.antibodyresource.com/mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html; www.immunologylink.com/pathbox.wustl.edu/about.hcenter/index.html; www.biotech.ufl.edu/about.hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehime-u.ac.jp/about.yasuhito-Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/lin-ks.html; www.biotech.ufl.edu/about.fccl/protocol.html; www.isac-net.org/sites_geo.html; aximtl.imt.uni-marburg.de/about.rek/AEP-Start.html; baserv.uci.kun.nl/about.jraats/linksl.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/about.martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.unizh.ch/about.honegger/AHOsem-inar/Slide01.html; www.cryst.bbk.ac.uk/about.ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm; www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/h-umanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/abo-ut.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html; www.jerini.de/fr/roducts.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983). Tales secuencias importadas se pueden utilizar para reducir la inmunogenicidad o reducir, potenciar o modificar la unión, la afinidad, la velocidad de asociación, la velocidad de disociación, la avidéz, la especificidad, la semi-vida, o cualquier otra característica adecuada, como se conoce en la técnica.

Los residuos del marco en las regiones marco humanas se pueden sustituir por el residuo correspondiente del anticuerpo donante de la CDR para alterar, preferiblemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones del marco se identifican por métodos bien conocidos en la técnica, p.ej., modelado de las interacciones de la CDR y los residuos del marco para identificar restos del marco importantes para la unión al antígeno y comparación de secuencia para identificar residuos del marco inusuales en posiciones particulares. (Véanse, p.ej., Queen et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.585.089; Riechmann et al., Nature 332: 323 (1988). Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la técnica. Están disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias consenso e importación de manera que se logre la característica de anticuerpo deseada, tal como una mayor afinidad por el antígeno o los antígenos diana. En general, los residuos de CDR están directamente y muy sustancialmente implicados en la influencia de la unión al antígeno. Los anticuerpos se pueden humanizar utilizando una variedad de mecanismos conocidos en la técnica, tales como, entre otros, los descritas por Jones et al., en Nature 321: 522 (1986); Verhoeyen et al., en Science 239: 1534 (1988), Sims et al., en J. Immunol. 151:2296 (1993); Chothia y Lesk, en J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter et al., en Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285

(1992)); Presta et al., en *J. Immunol.* 151:2623 (1993)), Padlan, en *Molecular Immunology* 28 (4/5): 489-498 (1991)); Studnicka et al., en *Protein Engineering* 7(6):805-814 (1994); Roguska. et al., en *PNAS* 91: 969-973 (1994)); Publicación PCT WO 91/09967, documentos PCT US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246, EP 592.106; EP 519.596, EP 239.400, Patentes de los Estados Unidos Núm. 5.565.332, 5.723.323, 5.976.862, 5.824.514, 5.817.483, 5.814.476, 5.763.192, 5.723.323, 5.766.886, 5.714.352, 6.204.023, 6.180.370, 5.693.762, 5.530.101, 5.585.089, 5.225.539; 4.816.567.

C. Producción de anticuerpos y líneas celulares productoras de anticuerpos

Preferiblemente, los anticuerpos anti-IL-13 de la presente descripción exhiben una alta capacidad para reducir o neutralizar la actividad de IL-13, p.ej., según se evalúa mediante uno cualquiera de varios análisis *in vitro* e *in vivo* conocidos en la técnica (p.ej., véase el Ejemplo 1.1.C). Por ejemplo, estos anticuerpos neutralizan la producción de TARC inducida por IL-13 por las células A-549 con valores de CI_{50} en el intervalo de al menos aproximadamente 10^{-8} M, aproximadamente 10^{-9} M, o aproximadamente 10^{-10} M.

En realizaciones preferidas, el anticuerpo aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, se unen a IL-13 humana, en donde el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, se disocian de IL-13 humana con una constante de velocidad k_{off} de aproximadamente $0,1 \text{ s}^{-1}$ o menos, según lo determinado por la resonancia de plasmón superficial, o inhiben la actividad de IL-13 humana y/o IL-13 humana con un CI_{50} de aproximadamente 1×10^{-6} M o menos. Alternativamente, el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, se pueden disociar de IL-13 humana con una constante de velocidad k_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ o menos, según lo determinado por la resonancia de plasmón superficial, o pueden inhibir la actividad de IL-13 humana y/o IL-13 humana con una CI_{50} de aproximadamente 1×10^{-7} M o menos. Alternativamente, el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, se pueden disociar de IL-13 humana con una constante de velocidad k_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o menos, según lo determinado por resonancia de plasmón superficial, o pueden inhibir IL-13 humana y/o IL-13 humana con una CI_{50} de aproximadamente 1×10^{-8} M o menos. Alternativamente, el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, se pueden disociar de IL-13 humana con una constante de velocidad k_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o menos, según lo determinado por la resonancia de plasmón superficial, o pueden inhibir la actividad de IL-13 y/o IL-13 humana con una CI_{50} de aproximadamente 1×10^{-9} M o menos. Alternativamente, el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, se pueden disociar de IL-13 humana con una constante de velocidad k_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o menos, según lo determinado por la resonancia de plasmón superficial, o pueden inhibir la actividad de IL-13 y/o IL-13 humana con una CI_{50} de aproximadamente 1×10^{-10} M o menos. Alternativamente, el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, se pueden disociar de IL-13 humana con una constante de velocidad k_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o menos, según lo determinado por la resonancia de plasmón superficial, o pueden inhibir la actividad de IL-13 y/o IL-13 humana con una CI_{50} de aproximadamente 1×10^{-11} M o menos.

IL-13 ejerce sus acciones uniéndose al receptor de IL-13 (IL-13R) sobre la superficie celular, el heterodímero formado por la cadena IL-13R α 1 (IL-13R α 1) y la cadena IL-4R (IL-4R). IL-13 se une a IL-13R α 1 primero con baja afinidad ($K_D = 2-10 \text{ nM}$) y a continuación recluta IL-4R hacia el complejo, generando un receptor de alta afinidad ($K_D = 0,03-0,4 \text{ nM}$) (Aman, M.J., et al. 1996 *J. Biol. Chem.* 271, 29265-29270; Miloux, et al. 1997 *FEBS Lett.* 401, 163-166; Andrews, et al. 2002 *J. Biol. Chem.* 277, 46073-46078). La heterodimerización de IL-13R causa la activación de las quinasas Janus, TYK2 y JAK1, constitutivamente asociadas con IL-13R α 1 e IL-4R, respectivamente, seguido de la activación del transductor de señal y el activador de la transcripción 6 (STAT6) (Izuhara, K. y Arima, K. 2004 *Drug News Perspect.* 17, 91-98). Existe otra unidad de unión a IL-13, la cadena IL-13R α 2 (IL-13R α 2), que se une a IL-13 con alta afinidad (0,25-1,2 nM) (Caput, et al. 1996 *J. Biol. Chem.* 271, 16921-16926; Donaldson et al., 1998 *J. Immunol.* 161, 2317-2324). No se conoce ninguna otra molécula receptora involucrada en el complejo IL-13 · IL-13R2. Inicialmente se pensó que IL-13R2 actuaba como un receptor "señuelo" que no señalizaba. Sin embargo, posteriormente se descubrió que puede unirse a IL-13 y señaliza a través de la ruta AP-1, lo que lleva a la producción de TNF-beta en ciertos tipos de células, incluidos los macrófagos, lo que a su vez conduce a la fibrosis pulmonar (Fichtner-Feigl, 2006 *Nat Med* 12: 99-106). Por lo tanto, ambas vías IL-13R α 1/IL-4R α e IL-13R α 2 contribuyen a la fisiopatología general del asma y otras afecciones inflamatorias pulmonares. Por lo tanto, un anticuerpo terapéutico anti-IL-13 que bloquea la unión de IL-13 a ambos receptores será más eficaz que aquellos que bloquean solo un receptor.

Los autores de la presente invención han aislado anticuerpos monoclonales que bloquean la unión de IL-13 tanto a IL-13R α 1 como a IL-13R α 2. Tanto el análisis de unión al receptor basado en ELISA como el análisis de unión a IL-13 marcada con 125-I sobre la superficie celular demostraron que 13C5, tanto en versión murina como humanizada (es decir 13C5.5), podían bloquear eficazmente la unión de IL-13 a ambos receptores. Los anticuerpos en el mismo linaje que 13C5, que incluyen 25C8 y 33C3, también pudieron bloquear la unión de IL-13 a ambos receptores. El cartografiado de epítopos de 13C5 indicó que sus sitios de unión incluían la región Hélice D C-terminal de IL-13

humana (residuos VRDTK IEVAQ FVKDL LLHLK KLFRE GR, correspondientes a los aminoácidos 104-130 de SEQ ID NO: 1). Se ha propuesto que la región de la hélice D C-terminal participa en las interacciones con el receptor IL-13 (Zuegg et al. 2001 Immunol Cell Biol. 79: 332-9). La estructura cristalina de la IL-13 humana que forma un complejo con la porción Fab del anticuerpo 13C5.5 indica que 13C5.5 se une a la región de la Hélice D C-terminal así como a la región de la Hélice A N-terminal de la IL-13 humana. Preferiblemente, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo se unen a IL-13 humana de modo que se inhibe la unión de IL-13 con dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, unidos al epítipo definido por las regiones topográficas Ser26-Thr27-Ala28-Leu29-Arg30-Glu31-Leu32-Ile33-Glu34-Glu35-Leu36-Val37-Asn38 y Lys123-Lys124-Leu125-Phe126-Arg127-Glu-128-Gly129-Arg130 de SEQ ID NO: 1 al receptor de IL-13. Preferiblemente, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo se unen a IL-13 humana de manera que se inhibe la unión de IL-13 con dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, unidos al epítipo definido por las regiones topográficas Arg30-Glu31-Leu32-Ile33-Glu34-Glu35-Leu36-Val37-Asn38 y Lys123-Lys124-Leu125-Phe126-Arg127 de SEQ ID NO: 1 al receptor IL-13 α 2.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada, tal como una región constante IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD. Preferiblemente, la región constante de cadena pesada es una región constante de cadena pesada de IgG1 o una región constante de cadena pesada de IgG4. Además, el anticuerpo puede comprender una región constante de cadena ligera, una región constante de cadena ligera kappa o una región constante de cadena ligera lambda. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una región constante de cadena ligera kappa. Alternativamente, la porción de anticuerpo puede ser, por ejemplo, un fragmento Fab o un fragmento Fv de cadena sencilla.

Las sustituciones de residuos de aminoácidos en la porción Fc para alterar la función efectora del anticuerpo son conocidas en la técnica (Winter, et al. Patentes de los Estados Unidos Núm. 5.648.260; 5624821). La porción Fc de un anticuerpo media varias importantes funciones efectoras, p.ej. inducción de citocinas, ADCC, fagocitosis, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y semi-vida/tasa de aclaramiento de anticuerpos y complejos antígeno-anticuerpo. En algunos casos, estas funciones efectoras son deseables para el anticuerpo terapéutico, pero en otros casos pueden ser innecesarias o incluso nocivas, dependiendo de los objetivos terapéuticos. Ciertos isotipos de IgG humana, particularmente IgG1 e IgG3, median ADCC y CDC a través de la unión a Fc γ Rs y a C1q del complemento, respectivamente. Los receptores Fc neonatales (FcRn) son los componentes críticos que determinan la vida media circulante de los anticuerpos. En otra realización más, al menos un residuo de aminoácido se reemplaza en la región constante del anticuerpo, por ejemplo la región Fc del anticuerpo, de manera que las funciones efectoras del anticuerpo se alteran.

Una realización proporciona una proteína de unión marcada en donde un anticuerpo o porción de anticuerpo de la descripción se derivatizan o se unen a otra molécula funcional (p.ej., otro péptido o proteína). Por ejemplo, una proteína de unión marcada de la descripción se puede obtener uniendo funcionalmente un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención (mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más entidades moleculares diferentes, tales como otro anticuerpo (p.ej., un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico y/o una proteína o péptido que pueden mediar la asociación del anticuerpo o porción de anticuerpo con otra molécula (tal como una región central de estreptavidina o una etiqueta de polihistidina).

Los agentes detectables útiles con los que se pueden derivatizar un anticuerpo o porción de anticuerpo de la descripción incluyen compuestos fluorescentes. Los ejemplos de agentes detectables fluorescentes incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina y similares. Un anticuerpo también se puede derivatizar con enzimas detectables, tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa y similares. Cuando un anticuerpo se derivatiza con una enzima detectable, se detecta mediante la adición de reactivos adicionales que la enzima utiliza para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando está presente el agente detectable peroxidasa de rábano picante, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobenzidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es detectable. Un anticuerpo también se puede derivatizar con biotina y se puede detectar a través de la medición indirecta de la unión a avidina o a estreptavidina.

Otra realización de la descripción proporciona una proteína de unión cristalizada. Preferiblemente, la descripción se refiere a cristales de anticuerpos anti-IL-13 completos y fragmentos de los mismos como se describen en la presente memoria, y formulaciones y composiciones que comprenden tales cristales. En una realización, la proteína de unión cristalizada tiene una semi-vida mayor in vivo que la contraparte soluble de la proteína de unión. En otra realización, la proteína de unión conserva la actividad biológica después de la cristalización.

La proteína de unión cristalizada de la descripción se puede producir de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y como se describe en el documento WO 02072636.

Otra realización de la descripción proporciona una proteína de unión glicosilada en donde el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo comprenden uno o más residuos de carbohidrato. La producción de la proteína naciente *in vivo* se puede someter a un procesamiento posterior, conocido como modificación postraduccional. En particular, los residuos de azúcar (glicosilo) se pueden agregar enzimáticamente, un proceso conocido como glicosilación. Las proteínas resultantes que llevan cadenas laterales oligosacáridas unidas covalentemente se conocen como proteínas glicosiladas o glicoproteínas. Los anticuerpos son glicoproteínas con uno o más residuos de carbohidrato en el dominio Fc, así como el dominio variable. Los residuos carbohidratados en el dominio Fc tienen un efecto importante sobre la función efectora del dominio Fc, con un efecto mínimo sobre la unión al antígeno o la semi-vida del anticuerpo (R. Jefferis, *Biotechnol. Prog.* 21 (2005), pág. 11-16). Por el contrario, la glicosilación del dominio variable puede tener un efecto sobre la actividad de unión al antígeno del anticuerpo. La glicosilación en el dominio variable puede tener un efecto negativo sobre la afinidad de unión del anticuerpo, probablemente debido al impedimento estérico (Co, M.S., et al., *Mol. Immunol.* (1993) 30: 1361-1367), o dar como resultado una mayor afinidad por el antígeno (Wallick, S.C., et al., *Exp. Med.* (1988) 168: 1099-1109; Wright, A., et al., *EMBO J.* (1991) 10:2717 2723).

Un aspecto de la presente descripción está dirigido a generar mutantes en el sitio de glicosilación en los que el sitio de glicosilación ligado a O o N de la proteína de unión ha sido mutado. Un experto en la técnica puede generar tales mutantes utilizando tecnologías convencionales bien conocidas. Los mutantes del sitio de glicosilación que conservan la actividad biológica, pero presentan un aumento o disminución de la actividad de unión, son otro objeto de la presente descripción.

En otra realización más, se modifica la glicosilación del anticuerpo o porción de unión a antígeno de la descripción. Por ejemplo, se puede preparar un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación se puede alterar para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tales modificaciones de carbohidratos se pueden lograr, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden realizar una o más sustituciones de aminoácidos que dan como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de la región variable para eliminar de ese modo la glicosilación en ese sitio. Tal aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tal enfoque se describe con más detalle en la Publicación PCT WO2003016466A2 y en las Patentes de los Estados Unidos Núm. 5.714.350 y 6.350.861.

Adicionalmente o alternativamente, se puede preparar un anticuerpo modificado de la descripción que tiene un tipo de glicosilación alterado, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos de fucosilo o un anticuerpo que presenta un aumento de estructuras de GlcNAc bisecantes. Se ha demostrado que tales patrones de glicosilación alterados aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones de carbohidratos se pueden realizar, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula anfitriona con la maquinaria de glicosilación alterada. Las células con la maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la técnica y se pueden utilizar como células anfitrionas en las que se expresan anticuerpos recombinantes de la descripción para producir de este modo un anticuerpo con glicosilación alterada. Véanse, por ejemplo, Shields, R. L. et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 26733-26740; Umana et al. (1999) *Nat. Biotech.* 17: 176-1, así como, la Patente Europea Núm: EP 1.176.195; Publicaciones PCT WO 03/035835; WO 99/54342 80.

La glicosilación de proteínas depende de la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés, así como de la célula anfitriona en la que se expresa la proteína. Diferentes organismos pueden producir diferentes enzimas de glicosilación (p.ej., glicosiltransferasas y glucosidasas), y tener diferentes sustratos (azúcares de nucleótidos) disponibles. Debido a tales factores, el patrón de glicosilación de la proteína y la composición de los residuos de glicosilo pueden diferir dependiendo del sistema del anfitrión en el que se expresa la proteína particular. Los residuos de glicosilo útiles en la invención pueden incluir, pero no se limitan a, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, n-acetilglucosamina y ácido siálico. Preferiblemente, la proteína de unión glicosilada comprende residuos de glicosilo de manera que el patrón de glicosilación es humano.

Los expertos en la técnica saben que la glicosilación de proteínas diferentes puede dar como resultado características proteicas diferentes. Por ejemplo, la eficacia de una proteína terapéutica producida en un microorganismo anfitrión, tal como levadura, y glicosilada utilizando la vía endógena de levadura se puede reducir en comparación con la de la misma proteína expresada en una célula de mamífero, tal como una línea celular CHO. Tales glicoproteínas también pueden ser inmunogénicas en seres humanos y muestran una semi-vida reducida *en vivo* después de la administración. Los receptores específicos en seres humanos y otros animales pueden reconocer residuos específicos de glicosilo y promover el rápido aclaramiento de la proteína del torrente sanguíneo. Otros efectos adversos pueden incluir cambios en el plegamiento, la solubilidad, la susceptibilidad a proteasas, el tráfico, el transporte, la compartimentación, la secreción, el reconocimiento por otras proteínas o factores, la antigenicidad o la alergenicidad de las proteínas. Por consiguiente, un facultativo puede preferir una proteína terapéutica con una composición y un patrón de glicosilación específicos, por ejemplo, composición de glicosilación y patrón idénticos, o

al menos similares, a los producidos en células humanas o en las células específicas de especie del animal sujeto deseado.

5 La expresión de proteínas glicosiladas diferentes de la de una célula anfitriona se puede lograr modificando genéticamente la célula anfitriona para expresar enzimas de glicosilación heterólogas. Utilizando mecanismos conocidos en la técnica, un facultativo puede generar anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos que exhiben glicosilación de proteínas humanas. Por ejemplo, las cepas de levadura han sido genéticamente modificadas para expresar enzimas de glicosilación no naturales de manera que las proteínas glicosiladas (glicoproteínas) producidas en estas cepas de levadura exhiben glicosilación de proteínas idéntica a la de las células animales, especialmente las humanas (Solicitudes de Patente de los Estados Unidos 20040018590 y 20020137134 y publicación PCT WO2005100584 A2).

15 Además de las proteínas de unión, la presente descripción también se dirige a un anticuerpo antiidiotípico (anti-Id) específico para tales proteínas de unión de la descripción. Un anticuerpo anti-Id es un anticuerpo, que reconoce determinantes únicos generalmente asociados con la región de unión a antígeno de otro anticuerpo. El anti-Id se puede preparar inmunizando un animal con la proteína de unión o una región que contiene CDR de la misma. El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante y producirá un anticuerpo anti-Id. El anticuerpo anti-Id también se puede utilizar como un "inmunógeno" para inducir una respuesta inmunitaria en otro animal más, produciendo un denominado anti-anticuerpo anti-Id.

20 Además, un experto en la técnica apreciará que una proteína de interés se puede expresar utilizando una biblioteca de células anfitrionas modificadas genéticamente para expresar diversas enzimas de glicosilación, de manera que las células anfitrionas miembro de la biblioteca produzcan la proteína de interés con patrones de glicosilación variantes. Un facultativo puede seleccionar y aislar la proteína de interés con patrones de glicosilación nuevos particulares. Preferiblemente, la proteína que tiene un nuevo patrón de glicosilación particularmente seleccionado exhibe propiedades biológicas mejoradas o alteradas.

D. Usos de anticuerpos anti-IL-13

30 Dada su capacidad para unirse a la IL-13 humana, los anticuerpos anti-IL-13 humana, o porciones de los mismos, de la descripción se pueden utilizar para detectar IL-13 humana (p.ej., en una muestra biológica, tal como suero o plasma), utilizando un inmunoensayo convencional, tal como un análisis de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica de tejidos. La descripción proporciona un método para detectar IL-13 humana en una muestra biológica que comprende poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la descripción y detectar el anticuerpo (o porción de anticuerpo) unidos a IL-13 humana o anticuerpo (o porción de anticuerpo) no unido, para detectar de ese modo IL-13 humana en la muestra biológica. El anticuerpo está marcado directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o no unido. Las sustancias detectables adecuadas incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamino fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y los ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , o ^{153}Sm .

50 Como alternativa al marcaje del anticuerpo, la IL-13 humana se puede analizar en fluidos biológicos mediante un inmunoensayo competitivo que utiliza patrones de rhIL-13 marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo anti-IL-13 humana no marcado. En este análisis, la muestra biológica, los patrones de rhIL-13 marcados y el anticuerpo anti-IL-13 humana se combinan y se determina la cantidad de patrón de rhIL-13 marcado unido al anticuerpo no marcado. La cantidad de IL-13 humana en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de patrón de rhIL-13 marcado unido al anticuerpo anti-IL-13. De forma similar, la IL-13 humana también se puede analizar en fluidos biológicos mediante un inmunoensayo competitivo que utiliza patrones de rhIL-13 marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo anti-IL-13 humana no marcado.

55 Los anticuerpos y porciones de anticuerpos de la descripción preferiblemente son capaces de neutralizar la actividad de IL-13 humana tanto *in vitro* como *in vivo*. Por consiguiente, tales anticuerpos y porciones de anticuerpos de la descripción se pueden utilizar para inhibir la actividad de hIL-13, p.ej., en un cultivo celular que contiene hIL-13, en sujetos humanos o en otros sujetos mamíferos que tienen IL-13 con la que presenta reacción cruzada un anticuerpo de la descripción. En la presente memoria se describe un método para inhibir la actividad de hIL-13 que comprende poner en contacto hIL-13 con un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención de manera que se inhibe la actividad de hIL-13. Por ejemplo, en un cultivo celular que contiene, o se sospecha que contiene hIL-13, se puede

añadir un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención al medio de cultivo para inhibir la actividad de hIL-13 en el cultivo.

5 También se describe en la presente memoria un método para reducir la actividad de hIL-13 en un sujeto, ventajosamente un sujeto que padece una enfermedad o trastorno en el que la actividad de IL-13 es perjudicial. Se describen métodos para reducir la actividad de IL-13 en un sujeto que padece dicha enfermedad o trastorno, cuyo método comprende administrar al sujeto un anticuerpo o porción de anticuerpo de la descripción de manera que se reduce la actividad de IL-13 en el sujeto. Preferiblemente, la IL-13 es IL-13 humana, y el sujeto es un sujeto humano. Alternativamente, el sujeto puede ser un mamífero que expresa una IL-13 a la que es capaz de unirse un anticuerpo de la descripción. Aún más, el sujeto puede ser un mamífero en el que se ha introducido IL-13 (p.ej., mediante administración de IL-13 o mediante expresión de un transgén de IL-13). Un anticuerpo de la descripción se puede administrar a un sujeto humano con fines terapéuticos. Por otra parte, se puede administrar un anticuerpo de la descripción a un mamífero no humano que expresa una IL-13 con la que el anticuerpo es capaz de unirse con fines veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. Con respecto a este último, tales modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la descripción (p.ej., someter a ensayo dosificaciones y cronologías de administración).

20 Se pretende que según se utiliza en la presente memoria, el término "un trastorno en el que la actividad de IL-13 es perjudicial" incluya enfermedades y otros trastornos en los que se ha demostrado o se sospecha que la presencia de IL-13 en un sujeto que padece el trastorno es responsable de la fisiopatología del trastorno o de un factor que contribuye a un empeoramiento del trastorno. Por consiguiente, un trastorno en el que la actividad de IL-13 es perjudicial es un trastorno en el que se espera que la reducción de la actividad de IL-13 alivie los síntomas y/o la progresión del trastorno. Tales trastornos se pueden evidenciar, por ejemplo, mediante un aumento en la concentración de IL-13 en un fluido biológico de un sujeto que padece el trastorno (p.ej., un aumento en la concentración de IL-13 en suero, plasma, líquido sinovial, etc. del sujeto), que se puede detectar, por ejemplo, utilizando un anticuerpo anti-IL-13 como se describió anteriormente. Los ejemplos no limitantes de trastornos que se pueden tratar con los anticuerpos de la descripción incluyen los trastornos comentados en la sección a continuación relacionada con las composiciones farmacéuticas de los anticuerpos de la descripción.

30 La IL-13 ha sido implicada por tener un papel fundamental en la causa de respuestas patológicas asociadas con el asma. Sin embargo, otros mediadores de vías inmunológicas diferenciales también están implicados en la patogénesis del asma, y el bloqueo de estos mediadores, además de la IL-13, puede ofrecer un beneficio terapéutico adicional. Por lo tanto, las proteínas de unión de la descripción se pueden incorporar en proteínas DVD-Ig en las que el DVD es capaz de unirse a pares diana incluyendo, pero sin limitación, IL-13 y una citocina proinflamatoria, tal como factor de necrosis tumoral- α (TNF- α). El TNF- α puede amplificar la respuesta inflamatoria en el asma y puede estar relacionado con la gravedad de la enfermedad (McDonnell, et al., Progress in Respiratory Research (2001), 31 (New Drugs for Asthma, Allergy and COPD), 247-250). Esto sugiere que el bloqueo de IL-13 y TNF- α puede tener efectos beneficiosos, particularmente en enfermedad grave de las vías respiratorias. En una realización preferida, la DVD-Ig de la invención se une a las dianas IL-13 y TNF α y se utiliza para tratar el asma.

40 En otra realización, las proteínas de unión de la descripción se pueden utilizar para generar moléculas de DVD-Ig que se unen a IL-13 e IL-1beta, IL-13 e IL-9; IL-13 e IL-4; IL-13 e IL-5; IL-13 e IL-25; IL-13 y TARC; IL-13 y MDC; IL-13 y MIF; IL-13 y TGF- β ; IL-13 y agonista de LHR; IL-13 y CL25; IL-13 y SPRR2a; IL-13 y SPRR2b; e IL-13 y ADAM8. La presente descripción también proporciona DVD-Ig capaces de unirse a IL-13 y una o más dianas implicadas en el asma seleccionadas del grupo que consiste en CSF1 (MCSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (GCSF), FGF2, IFNA1, IFNB1, IFNG, histamina y receptores de histamina, IL1A, IL1B, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12A, IL12B, IL14, IL15, IL16, IL17, IL18, IL19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, KITLG, PDGFB, IL2RA, IL4R, IL5RA, IL8RA, IL8RB, IL12RB1, IL12RB2, IL13RA1, IL13RA2, IL18R1, TSLP, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL22, CCL24, CX3CL1, CXCL1, CXCL2, CXCL3, XCL1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CX3CR1, GPR2, XCR1, FOS, GATA3, JAK1, JAK3, STAT6, TBX21, TGFB1, TNFSF6, YY1, CYSLTR1, FCER1A, FCER2, LTB4R, TB4R2, LTBR y quitinasa.

55 D. Composición farmacéutica

La descripción también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la descripción y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos de la descripción se emplean, pero sin limitación, para diagnosticar, detectar o controlar un trastorno, en la prevención, tratamiento, manejo o mejora de un trastorno o uno o más síntomas del mismo, y/o en investigación. En una realización específica, una composición comprende uno o más anticuerpos de la descripción. En otra realización, la composición farmacéutica comprende uno o más anticuerpos de la descripción y uno o más agentes profilácticos o terapéuticos distintos de los anticuerpos de la descripción para

tratar un trastorno en el que la actividad de IL-13 es perjudicial. Preferiblemente, los agentes profilácticos o terapéuticos que se sabe que son útiles o se han utilizado o se utilizan actualmente en la prevención, el tratamiento, el manejo o la mejora de un trastorno o uno o más síntomas del mismo. De acuerdo con estas realizaciones, la composición puede comprender adicionalmente un portador, diluyente o excipiente.

Los anticuerpos y porciones de anticuerpos de la descripción se pueden incorporar a composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a un sujeto. Típicamente, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo o porción de anticuerpo de la descripción y un portador farmacéuticamente aceptable. Según se utiliza en la presente memoria, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción e isotónicos, y similares que son fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden comprender adicionalmente cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian la vida útil o la eficacia del anticuerpo o porción de anticuerpo.

Se conocen diversos suministros de administración y se pueden utilizar para administrar uno o más anticuerpos de la descripción o la combinación de uno o más anticuerpos de la descripción y un agente profiláctico o agente terapéutico útil para prevenir, gestionar, tratar o mejorar un trastorno o uno o más síntomas de los mismos, p.ej., encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, endocitosis mediada por receptores (véase, p.ej., Wu y Wu, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro vector, etc. Los métodos para administrar un agente profiláctico o terapéutico de la descripción incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (p.ej., administración intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), administración epidural, administración intratumoral y administración en la mucosa (p.ej., vías intranasal y oral). Además, se puede emplear la administración pulmonar, p.ej., mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente aerosolizante. Véanse, p.ej., las Patentes de los Estados Unidos Núm. 6.019.968, 5.985.320, 5.985.309, 5.934.272, 5.874.064, 5.855.913, 5.290.540 y 4.880.078; y Publicaciones PCT Núm. WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903. Se pueden administrar un anticuerpo de la descripción, una terapia combinada o una composición de la descripción utilizando la tecnología de suministro de fármaco pulmonar Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, MA). Los agentes profilácticos o terapéuticos de la descripción por vía intramuscular, intravenosa, intratumoral, oral, intranasal, pulmonar o subcutánea. Los agentes profilácticos o terapéuticos se pueden administrar por cualquier ruta conveniente, por ejemplo mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (p.ej., mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

Puede ser deseable administrar los agentes profilácticos o terapéuticos de la descripción localmente en el área que necesita tratamiento; esto se puede lograr, por ejemplo, y no a modo de limitación, mediante infusión local, mediante inyección, o mediante un implante, siendo dicho implante de un material poroso o no poroso, que incluye membranas y matrices, tales como membranas sialásticas, polímeros, matrices fibrosas (p.ej., Tissuel®) o matrices de colágeno. Se puede administrar localmente una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos de los antagonistas de la descripción en el área afectada de un sujeto para prevenir, tratar, manejar y/o mejorar un trastorno o un síntoma del mismo. Se puede administrar una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos de la descripción localmente en el área afectada combinada con una cantidad eficaz de una o más terapias (p.ej., uno o más agentes profilácticos o terapéuticos) distintos de un anticuerpo de la descripción de un sujeto para prevenir, tratar, manejar y/o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo.

En otra realización, el agente profiláctico o terapéutico de la descripción se puede administrar en un sistema de liberación sostenida o de liberación controlada. En una realización, se puede utilizar una bomba para lograr una liberación controlada o sostenida (véanse Langer, más arriba; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). En otra realización, se pueden utilizar materiales poliméricos para lograr la liberación controlada o sostenida de las terapias de la invención (véanse, p.ej., Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974)) Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; véanse también Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 7 1:105; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.679.377; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.916.597; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.912.015; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.989.463; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.128.326; Publicación PCT Núm. WO 99/15154; y Publicación PCT Núm. WO 99/20253. Los ejemplos de

5 polímeros utilizados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, poli(metacrilato de 2-hidroxi-etilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(etileno-co-acetato de vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(acrilamida), poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactidas-co-glicólidos) (PLGA), y poliolefinas. En una realización preferida, el polímero
10 utilizado en una formulación de liberación sostenida es inerte, está libre de impurezas lixiviables, es estable durante el almacenamiento, estéril y biodegradable. En otra realización más, se puede colocar un sistema de liberación controlada o sostenida cerca de la diana profiláctica o terapéutica, requiriendo así solo una fracción de la dosis sistémica (véase, p.ej., Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, más arriba, vol. 2, pág. 115-138 (1984)).

15 Los sistemas de liberación controlada se discuten en la revisión de Langer (1990, *Science* 249: 1527-1533). Se puede utilizar cualquier mecanismo conocido por los expertos en la técnica para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más agentes terapéuticos de la descripción. Véanse, p.ej., Patente de los Estados Unidos Núm. 4.526.938, Publicación PCT WO 91/05548, Publicación PCT WO 96/20698, Ning et al., 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel", *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189, Song et al., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions", *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397, Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application", *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854, y Lam et al., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery", *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759- 760.

20 En una realización específica, cuando la composición de la descripción es un ácido nucleico que codifica un agente profiláctico o terapéutico, el ácido nucleico se puede administrar in vivo para promover la expresión de su agente terapéutico o profiláctico codificado, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo de modo que se vuelva intracelular, p.ej., mediante el uso de un vector retroviral (véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.980.286), o mediante inyección directa, o mediante bombardeo de micropartículas (p.ej., una pistola génica, Biolistic, Dupont), o recubrimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes transfectantes, o administrándolo en conexión con un péptido similar a la homeobox que se sabe que penetra en el núcleo (véase, p.ej., Joliot et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1864-1868).
25 Alternativamente, se puede introducir un ácido nucleico intracelularmente e incorporarlo dentro del ADN de la célula anfitriona para su expresión mediante recombinación homóloga.

30 Una composición farmacéutica de la descripción se formula para que sea compatible con su ruta de administración prevista. Los ejemplos de rutas de administración incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral, p.ej., intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, intranasal (p.ej., inhalación), transdérmica (p.ej., tópica), transmucosa y rectal. En una realización específica, la composición se formula de acuerdo con procedimientos de rutina en forma de una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, oral, intranasal o tópica a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaina para aliviar el dolor en el sitio de la inyección.

35 Si las composiciones de la descripción se van a administrar por vía tópica, las composiciones se pueden formular en forma de una pomada, crema, parche transdérmico, loción, gel, champú, pulverización, aerosol, solución, emulsión u otra forma conocida para un experto en la técnica. Véase, p.ej., , Remington's Pharmaceutical Sciences e Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19ª ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). Para formas de dosificación tópicas no pulverizables, típicamente se emplean formas viscosas a semisólidas o sólidas que comprenden un portador o uno o más excipientes compatibles con la aplicación tópica y que tienen una viscosidad dinámica preferiblemente mayor que el agua. Las formulaciones adecuadas incluyen, sin limitación, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, ungüentos, polvos, linimentos, pomadas y similares, que se esterilizan o mezclan, si se desea, con agentes auxiliares (p.ej., conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, tampones, o sales) para influir sobre diversas propiedades, tales como, por ejemplo, la presión osmótica. Otras formas de dosificación tópica adecuadas incluyen preparaciones de aerosol pulverizables en las que el ingrediente activo, preferiblemente combinado con un portador inerte sólido o líquido, se empaqueta en una mezcla con una sustancia volátil presurizada (p.ej., un propelente gaseoso, tal como freón) o en una botella de compresión. También se
40 pueden añadir hidratantes o humectantes a composiciones farmacéuticas y formas de dosificación si se desea. Los ejemplos de tales ingredientes adicionales son bien conocidos en la técnica.

45 Si el método descrito en la presente memoria comprende la administración intranasal de una composición, la composición se puede formular en forma de aerosol, pulverización, nebulización o en forma de gotas. En particular, los agentes profilácticos o terapéuticos para su uso de acuerdo con la presente descripción se pueden suministrar convenientemente en forma de una presentación para pulverización en aerosol a partir de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado (p.ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano,
50

diclorotetrafluoroetano, carbono dióxido u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos (compuestos, p.ej., de gelatina) para su uso en un inhalador o insuflador que contienen una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Si el método descrito en la presente memoria comprende la administración oral, las composiciones se pueden formular oralmente en forma de comprimidos, cápsulas, sellos, cápsulas de gel, soluciones, suspensiones y similares. Los comprimidos o cápsulas se pueden preparar por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (p.ej., almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (p.ej., lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (p.ej., estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (p.ej., almidón de patata o sal de sodio de glicolato de almidón); o agentes humectantes (p.ej., laurilsulfato de sodio). Los comprimidos se pueden recubrir por métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden adoptar la forma de soluciones, jarabes o suspensiones, o se pueden presentadas en forma de un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales preparaciones líquidas se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (p.ej., jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (p.ej., lecitina o acacia); vehículos no acuosos (p.ej., aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (p.ej., p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tamponadoras, aromatizantes, colorantes y agentes edulcorantes, según corresponda. Las preparaciones para administración oral se pueden formular de forma adecuada para una liberación lenta, liberación controlada o liberación sostenida de uno o varios agentes profilácticos o terapéuticos.

El método descrito en la presente memoria puede comprender la administración pulmonar, p.ej., mediante el uso de un inhalador o nebulizador, de una composición formulada con un agente aerosolizante. Véanse, p.ej., las Patentes de los Estados Unidos Núm. 6.019.968, 5.985.320, 5.985.309, 5.934.272, 5.874.064, 5.855.913, 5.290.540 y 4.880.078; y Publicación PCT Núm. WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903. En una realización específica, se administra un anticuerpo de la descripción, terapia combinada, y/o composición de la descripción utilizando la tecnología de suministro de fármaco pulmonar Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, MA).

El método descrito en la presente memoria puede comprender la administración de una composición formulada para administración parenteral mediante inyección (p.ej., mediante inyección en bolo o infusión continua). Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria (p.ej., en ampollas o en recipientes multidosis) con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado (p.ej., agua estéril libre de pirógenos) antes del uso.

Los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender adicionalmente la administración de composiciones formuladas como preparaciones de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden administrar mediante implantación (p.ej., por vía subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Por lo tanto, por ejemplo, las composiciones se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (p.ej., en forma de una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o en forma de derivados escasamente solubles (p.ej., en forma de una sal escasamente soluble).

Los métodos descritos en la presente memoria abarcan la administración de composiciones formuladas como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con aniones tales como los derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con cationes tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2- etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

Generalmente, los ingredientes de las composiciones se suministran por separado o se mezclan juntos en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en forma de un polvo seco liofilizado o un producto concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente cerrado tal como una ampolla o bolsita que indica la cantidad de agente activo. Cuando el modo de administración es la infusión, la composición se puede dispensar con un frasco de infusión que contiene agua estéril de calidad farmacéutica o solución salina. Cuando el modo de administración es mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de modo que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

En particular, la descripción también proporciona que uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o las composiciones farmacéuticas de la descripción se envasen en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o bolsita que indica la cantidad del agente. En una realización, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas de la descripción se suministran como un polvo liofilizado esterilizado seco o producto concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado y se pueden reconstituir (p.ej., con agua o solución salina) a la concentración apropiada para la administración a un sujeto. Preferiblemente, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos o composiciones farmacéuticas de la descripción se suministran en forma de un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente herméticamente sellado a una dosificación unitaria de al menos 5 mg, más preferiblemente al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg, al menos 75 mg o al menos 100 mg. Los agentes profilácticos o terapéuticos liofilizados o las composiciones farmacéuticas de la descripción deberían almacenarse a entre 2°C y 8°C en su recipiente original y los agentes profilácticos o terapéuticos, o las composiciones farmacéuticas de la invención deberían administrarse en el plazo de 1 semana, preferiblemente en el plazo de 5 días, en el plazo de 72 horas, en el plazo de 48 horas, en el plazo de 24 horas, en el plazo de 12 horas, en el plazo de 6 horas, en el plazo de 5 horas, en el plazo de 3 horas o en el plazo de 1 hora después de la reconstitución. En una realización alternativa, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos o composiciones farmacéuticas de la descripción se suministran en forma líquida en un recipiente sellado herméticamente que indica la cantidad y concentración del agente. Preferiblemente, la forma líquida de la composición administrada se suministra en un recipiente sellado herméticamente al menos 0,25 mg/ml, más preferiblemente al menos 0,5 mg/ml, al menos 1 mg/ml, al menos 2,5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/kg, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml o al menos 100 mg/ml. La forma líquida se debe almacenar entre 2°C y 8°C en su recipiente original.

Los anticuerpos y porciones de anticuerpos de la descripción se pueden incorporar a una composición farmacéutica adecuada para administración parenteral. Preferiblemente, el anticuerpo o porciones de anticuerpo se prepararán en forma de una solución inyectable que contiene 0,1-250 mg/ml de anticuerpo. La solución inyectable puede estar compuesta de una forma de dosificación líquida o liofilizada en un vial de sílex o ámbar, ampolla o jeringa precargada. El tampón puede ser L-histidina (1-50 mM), óptimamente 5-10 mM, a pH 5,0 a 7,0 (óptimamente pH 6,0). Otros tampones adecuados incluyen, pero no se limitan a, succinato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio o fosfato de potasio. Se puede utilizar cloruro de sodio para modificar la toxicidad de la solución a una concentración de 0-300 mM (óptimamente 150 mM para una forma de dosificación líquida). Se pueden incluir crioprotectores para una forma de dosificación liofilizada, principalmente sacarosa al 0-10% (óptimamente 0,5-1,0%). Otros crioprotectores adecuados incluyen trehalosa y lactosa. Se pueden incluir agentes para conferir volumen para una forma de dosificación liofilizada, principalmente manitol al 1-10% (óptimamente 2-4%). Los estabilizadores se pueden utilizar en formas de dosificación tanto líquidas como liofilizadas, principalmente L-metionina 1-50 mM (óptimamente 5-10 mM). Otros agentes de carga adecuados incluyen glicina, arginina, pueden incluirse como 0-0,05% de polisorbato-80 (óptimamente 0,005-0,01%). Los tensioactivos adicionales incluyen, pero no se limitan a, polisorbato 20 y tensioactivos BRIJ. La composición farmacéutica que comprende los anticuerpos y las porciones de anticuerpo de la descripción preparada como una solución inyectable para administración parenteral, puede comprender además un agente útil como adyuvante, tal como los utilizados para aumentar la absorción o dispersión de una proteína terapéutica (p.ej., anticuerpo). Un adyuvante particularmente útil es la hialuronidasa, tal como Hylenex® (hialuronidasa humana recombinante). La adición de hialuronidasa a la solución inyectable mejora la biodisponibilidad en seres humanos después de la administración parenteral, particularmente la administración subcutánea. También permite mayores volúmenes en el sitio de inyección (es decir, más de 1 ml) con menos dolor y malestar, y una incidencia mínima de reacciones en el sitio de inyección. (véanse los documentos WO2004078140, U2006104968).

Las composiciones de esta descripción pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (p.ej., soluciones inyectables y que se pueden administrar mediante infusión), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo de administración y la aplicación terapéutica deseados. Las composiciones preferidas típicas están en forma de soluciones inyectables o que se pueden administrar mediante infusión, tales como composiciones similares a las utilizadas para la inmunización pasiva de seres humanos con otros anticuerpos. El modo de administración preferido es parenteral (p.ej., intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular). En una realización preferida, el anticuerpo se administra por infusión o inyección intravenosa. En otra realización preferida, el anticuerpo se administra por inyección intramuscular o subcutánea.

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo (es decir, anticuerpo o porción de anticuerpo) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según

se requiera, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión alcalino y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos liofilizados estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y el secado por pulverización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente esterilizada filtrada del mismo. La fluidez apropiada de una solución se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de composiciones inyectables se puede conseguir incluyendo, en la composición, un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Los anticuerpos y porciones de anticuerpos de la presente descripción se pueden administrar mediante una diversidad de métodos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, la ruta/modo de administración preferido es la inyección subcutánea, la inyección intravenosa o la infusión. Como apreciará el experto en la materia, la ruta y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. En ciertas realizaciones, el compuesto activo se puede preparar con un portador que protegerá el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etilacetato de vinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres y poli(ácido láctico). Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son conocidos en general por los expertos en la técnica. Véase, p.ej., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo o porción de anticuerpo de la descripción se pueden administrar por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se desea) también se puede encerrar en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, comprimirse en comprimidos o incorporarse directamente a la dieta del sujeto. Para la administración terapéutica oral, los compuestos se pueden incorporar con excipientes y utilizar en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Para administrar un compuesto de la descripción mediante una administración distinta a la parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con, un material para evitar su inactivación.

También se pueden incorporar a las composiciones compuestos activos suplementarios. En ciertas realizaciones, un anticuerpo o porción de anticuerpo de la descripción se co-formulan con y/o se coadministran con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son útiles para tratar trastornos en los que la actividad de IL-13 es perjudicial. Por ejemplo, un anticuerpo anti-hIL-13 o porción de anticuerpo de la descripción se puede coformular y/o coadministrar con uno o más anticuerpos adicionales que se unen a otras dianas (p.ej., anticuerpos que se unen a otras citocinas o que se unen a las moléculas de la superficie celular). Además, uno o más anticuerpos de la descripción se pueden utilizar combinados con dos o más de los agentes terapéuticos anteriores. Tales terapias combinadas pueden utilizar ventajosamente dosis más bajas de los agentes terapéuticos administrados, evitando así posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo para IL-13 o un fragmento del mismo se unen a un vehículo prolongador de la semivida conocido en la técnica. Tales vehículos incluyen, pero no se limitan a, el dominio Fc, polietilenglicol y dextrano. Tales vehículos se describen, p.ej., en la Solicitud de los Estados Unidos Núm. de Serie 09/428.082 y Solicitud PCT publicada Núm. WO 99/25044.

En una realización específica, las secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican un anticuerpo de la descripción u otro agente profiláctico o terapéutico de la descripción se administran para tratar, prevenir, manejar o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo mediante terapia génica. La terapia génica se refiere a la terapia realizada mediante la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. En esta realización de la descripción, los ácidos nucleicos producen su anticuerpo codificado o agente profiláctico o terapéutico de la descripción que media un efecto profiláctico o terapéutico.

Cualquiera de los métodos para la terapia génica disponible en la técnica se puede utilizar de acuerdo con la presente descripción. Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, véanse Goldspiel et al., 1993, *Clinical Pharmacy* 12:488-505; Wu y Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan, *Science* 260:926-932 (1993); y Morgan y Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217; Mayo, 1993, *TIBTECH* 11 (5):155-215. Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que se pueden utilizar son descritos por Ausubel et al. (eds.), en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); y Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990). La descripción detallada de los diversos métodos de la terapia génica se describe en el

documento US20050042664 A1.

En otro aspecto, esta solicitud presenta un método para tratar (p.ej., curar, suprimir, mejorar, retrasar o prevenir la aparición, o prevenir la recurrencia o recaída de) o prevenir un trastorno asociado a IL-13, en un sujeto. El método incluye: administrar al sujeto un agente de unión a IL-13 (particularmente un antagonista), p.ej., un anticuerpo anti-IL-13 o fragmento del mismo como se describe en la presente memoria, en una cantidad suficiente para tratar o prevenir el trastorno asociado con IL-13. El antagonista de IL-13, p.ej., el anticuerpo anti-IL-13 o fragmento del mismo, se pueden administrar al sujeto, solo o combinado con otras modalidades terapéuticas como se describe en la presente memoria.

En una realización, el sujeto es un mamífero, p.ej., un ser humano que padece uno o más trastornos asociados con IL-13, incluyendo, p.ej., trastornos respiratorios (p.ej., asma (p.ej., asma alérgica y no alérgica), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), y otras afecciones que implican inflamación de las vías respiratorias, eosinofilia, fibrosis y exceso de producción de moco, trastornos atópicos (p.ej., dermatitis atópica y rinitis alérgica), afecciones inflamatorias y/o autoinmunitarias de la piel, órganos gastrointestinales (p. enfermedades inflamatorias intestinales (EII), tal como colitis ulcerosa y/o enfermedad de Crohn) e hígado (p.ej., cirrosis, fibrosis), escleroderma, tumores o cánceres, p.ej., linfoma de Hodgkin como se describe en la presente memoria. Por consiguiente, la descripción incluye el uso de un agente de unión a IL-13 (tal como un anticuerpo anti-IL-13 o fragmento del mismo descrito en la presente memoria) para un tratamiento descrito en la presente memoria y el uso de un agente de unión a IL-13 (tal como un anticuerpo anti-IL-13 o fragmento del mismo descrito en la presente memoria) para preparar un medicamento para un tratamiento descrito en la presente memoria.

Los ejemplos de trastornos asociados a IL-13 incluyen, pero no se limitan a, un trastorno elegido entre uno o más de: trastornos respiratorios, p.ej., asma (p.ej., asma alérgica y no alérgica (p.ej., asma debida a infección con, p.ej., virus respiratorio sincitial (RSV), p.ej., en niños pequeños), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y otras afecciones que implican inflamación de las vías respiratorias, eosinofilia, fibrosis y producción excesiva de moco, p.ej., fibrosis quística y fibrosis pulmonar; trastornos atópicos, p.ej., que resultan de un aumento de sensibilidad a IL-13 (p.ej., dermatitis atópica, urticaria, eczema, rinitis alérgica y enterogastritis alérgica); afecciones inflamatorias y/o autoinmunitarias de la piel (p.ej., dermatitis atópica), órganos gastrointestinales (p.ej., enfermedades inflamatorias intestinales (EII), tales como colitis ulcerativa y/o enfermedad de Crohn), hígado (p.ej., cirrosis, carcinoma hepatocelular), y esclerodermia; tumores o cánceres (p.ej., tumores de tejidos blandos o sólidos), tales como leucemia, glioblastoma y linfoma, p.ej., linfoma de Hodgkin; infecciones virales (p.ej., por HTLV-1); fibrosis de otros órganos, p.ej., fibrosis del hígado (p.ej., fibrosis causada por un virus de hepatitis B y/o C); y supresión de la expresión de respuestas inmunitarias de tipo 1 protectoras, (p.ej., durante la vacunación), como se describe en la presente memoria.

En otras realizaciones, esta aplicación proporciona un método para tratar (p.ej., reducir, mejorar) o prevenir uno o más síntomas asociados con un trastorno respiratorio, p.ej., asma (p.ej., asma alérgica y no alérgica); alergias; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); una afección que implica inflamación de las vías respiratorias, eosinofilia, fibrosis y producción excesiva de moco, p.ej., fibrosis quística y fibrosis pulmonar. Por ejemplo, los síntomas del asma incluyen, pero no se limitan a, sibilancias, dificultad para respirar, broncoconstricción, hiperreactividad de las vías respiratorias, disminución de la capacidad pulmonar, fibrosis, inflamación de las vías respiratorias y producción de moco. El método comprende administrar al sujeto un antagonista de IL-13, p.ej., un anticuerpo para IL-13 o un fragmento del mismo, en una cantidad suficiente para tratar (p.ej., reducir, mejorar) o prevenir uno o más síntomas. El anticuerpo para IL-13 se puede administrar terapéutica o profilácticamente, o ambos. El antagonista de IL-13, p.ej., el anticuerpo anti-IL-13, o fragmento del mismo, se puede administrar al sujeto, solo o combinado con otras modalidades terapéuticas como se describe en la presente memoria. Preferiblemente, el sujeto es un mamífero, p.ej., un ser humano que padece un trastorno asociado a IL-13 como se describe en la presente memoria.

En otro aspecto, esta solicitud proporciona un método para detectar la presencia de IL-13 en una muestra in vitro (p.ej., una muestra biológica, tal como suero, plasma, tejido, biopsia). El presente método se puede utilizar para diagnosticar un trastorno, p.ej., un trastorno asociado a células inmunitarias. El método incluye: (i) poner en contacto la muestra o una muestra de control con el anticuerpo anti-IL-13 o fragmento del mismo como se describen en la presente memoria; y (ii) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-IL-13 o fragmento del mismo, y la muestra o la muestra control, en donde un cambio estadísticamente significativo en la formación del complejo en la muestra con respecto a la muestra de control es indicativo de la presencia del IL-13 en la muestra.

En otro aspecto más, esta solicitud proporciona un método para detectar la presencia de IL-13 in vivo (p.ej., en imágenes in vivo en un sujeto). El presente método se puede utilizar para diagnosticar un trastorno, p.ej., un trastorno asociado a IL-13. El método incluye: (i) administrar el anticuerpo anti-IL-13 o fragmento del mismo como se describen en la presente memoria a un sujeto o sujeto de control en condiciones que permitan la unión del

anticuerpo o fragmento a IL-13; y (ii) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo o fragmento e IL-13, en donde un cambio estadísticamente significativo en la formación del complejo en el sujeto con relación al sujeto de control es indicativo de la presencia de IL-13.

5 Los anticuerpos de la descripción, o porciones de unión a antígeno de los mismos se pueden utilizar solos o combinados para tratar tales enfermedades. Se debe entender que los anticuerpos de la descripción o la porción de unión a antígeno de los mismos se pueden utilizar solos o combinados con un agente adicional, p.ej., un agente terapéutico siendo seleccionado dicho agente adicional por el experto en la técnica para su propósito previsto. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico reconocido en la técnica por ser útil para tratar la enfermedad o afección que está siendo tratada por el anticuerpo de la presente descripción. El agente adicional también puede ser un agente que confiere una cualidad beneficiosa a la composición terapéutica, p.ej., un agente que afecta a la viscosidad de la composición.

15 Se debe entender además que las combinaciones que se incluirán en esta descripción son aquellas combinaciones útiles para su propósito previsto. Los agentes expuestos a continuación tienen fines ilustrativos y no están destinados a ser limitantes. Las combinaciones, que son parte de esta descripción, pueden ser los anticuerpos de la presente descripción y al menos un agente adicional seleccionado de las siguientes listas. La combinación también puede incluir más de un agente adicional, p.ej., dos o tres agentes adicionales si la combinación es tal que la composición formada puede realizar su función prevista.

20 La terapia combinada puede incluir uno o más antagonistas de IL-13, p.ej., anticuerpos anti-IL-13 o fragmentos de los mismos, co-formulados con, o coadministrados con, uno o más agentes terapéuticos adicionales, p.ej., uno o más inhibidores de citocinas y factores de crecimiento, inmunosupresores, agentes antiinflamatorios (p.ej., agentes antiinflamatorios sistémicos), agentes antifibróticos, inhibidores metabólicos, inhibidores de enzimas y/o agentes citotóxicos o citostáticos, como se describe en la presente memoria.

Los ejemplos de agentes terapéuticos adicionales preferidos que se pueden coadministrar y/o coformular con uno o más antagonistas de IL-13, p.ej., anticuerpos anti-IL-13 o fragmentos de los mismos, incluyen, pero no se limitan a, uno o más de: esteroides inhalados; beta-agonistas, p.ej., beta-agonistas de acción corta o de acción prolongada; antagonistas de leucotrienos o receptores de leucotrienos; fármacos combinados tales como ADVAIR; Inhibidores de IgE, p.ej., o anticuerpos anti-IgE (p.ej., XOLAIR); inhibidores de fosfodiesterasa (p.ej., inhibidores de PDE4); xantinas; fármacos anticolinérgicos; agentes estabilizadores de mastocitos tales como cromolina; inhibidores de IL-4; inhibidores de IL-5; inhibidores de eotaxina/CCR3; antagonistas de la histamina o sus receptores, incluidos H1, H2, H3 y H4, y antagonistas de la prostaglandina D o sus receptores (DP1 y CRTH2). Tales combinaciones se pueden utilizar para tratar el asma y otros trastornos respiratorios. Otros ejemplos de agentes terapéuticos que se pueden coadministrar y/o coformular con uno o más anticuerpos anti-IL-13 o fragmentos de los mismos incluyen uno o más de: antagonistas de TNF (p.ej., un fragmento soluble de un receptor de TNF, p.ej., receptores de TNF humano p55 o p75 o derivados de los mismos, p.ej., TNFR-IgG de 75 kD (proteína de fusión de receptor de TNF de 75 kD-IgG, ENBREL)); antagonistas de la enzima TNF, p.ej., inhibidores de la enzima convertidora de TNF (TACE); antagonistas del receptor muscarínico; antagonistas de TGF-beta; interferón gamma; perfenidona; agentes quimioterapéuticos, p.ej., metotrexato, leflunomida, o un sirolimus (rapamicina) o un análogo del mismo, p.ej., CCI-779; inhibidores de COX2 y cPLA2; AINE; inmunomoduladores; inhibidores de p38, inhibidores de TPL-2, MK-2 y NFkB, entre otros.

45 Otras combinaciones preferidas son fármacos antiinflamatorios supresores de citocinas (FAISC); anticuerpos o antagonistas de otras citocinas humanas o factores de crecimiento, por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, IL-21, IL-31, interferones, EMAP-II, GM-CSF, FGF, EGF, PDGF y endotelina-1, así como los receptores de estas citocinas y factores de crecimiento. Los anticuerpos de la descripción, o porciones de unión a antígeno de los mismos, se pueden combinar con anticuerpos contra moléculas de la superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86. (B7.2), CD90, CTLA o sus ligandos que incluyen CD154 (gp39 o CD40L).

Las combinaciones preferidas de agentes terapéuticos pueden interferir en diferentes puntos en la cascada inflamatoria; los ejemplos preferidos incluyen antagonistas de TNF como anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos de TNF, D2E7, (Publicación PCT Núm. WO 97/29131), CA2 (Remicade™), CDP 571, y receptores de TNF p55 o p75 solubles, derivados de los mismos, (p75TNFR1gG (Enbrei™) o p55TNFR1gG (Lenercept)), y también inhibidores de la enzima convertidora de TNF (TACE), de manera similar los inhibidores de IL-1 (inhibidores de la enzima convertidora de interleucina-1, IL-1RA, etc.) pueden ser eficaces por la misma razón. Otras combinaciones preferidas incluyen la interleucina 4. Otra combinación preferida son otros participantes importantes de la respuesta asmática que pueden actuar en paralelo, dependiendo de, o en concierto con, la función de IL-13 especialmente preferidos son los antagonistas de IL-9 incluyendo anticuerpos para IL-9. Se ha demostrado que IL-13 e IL-9 tienen funciones solapantes pero distintas y una combinación de antagonistas para ambos puede ser muy

eficaz. Otra combinación preferida son los anticuerpos anti-IL-5. Otras combinaciones preferidas más incluyen antagonistas de quimiocinas que incluyen MCP-1, MCP-4, eotaxinas, RANTES, MDC, CCL-12 y CCL-17 (TARC) y receptores de quimiocinas que incluyen CCR2, CCR3, CCR4 y CXCR4. Sin embargo, las combinaciones pueden incluir antagonistas de los mediadores del asma, incluyendo la quitinasa ácida de mamífero, CRHT2, quimasa, S1P1, S1P2, Tyk2, ROCKII, Stat6, p38, NFkB, fosfodiesterasa 4 (PDE-4), tritasa de mastocitos, NO, adenosina, IKK2, GATA3, ICAM-1, VCAM-1 e ICOS.

Las composiciones farmacéuticas de la descripción pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la descripción. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. El experto en la técnica puede determinar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o porción de anticuerpo y la puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o porción de anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o porción de anticuerpo es superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente, dado que se utiliza una dosis profiláctica en sujetos antes o en una etapa más temprana, de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta óptima deseada (p.ej., una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o se puede reducir o aumentar la dosis proporcionalmente de acuerdo con lo indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma unitaria de dosificación según se utiliza en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos que se vayan a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado asociado con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención está dictada por y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico o profiláctico particular que debe alcanzarse, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de composición de tal compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Un intervalo ilustrativo no limitante para una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención es 0,1-20 mg/kg, más preferiblemente 1-10 mg/kg. Se debe tener en cuenta que los valores de dosificación pueden variar según el tipo y la gravedad de la afección que se vaya a aliviar. Se debe entender además que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos se deben ajustar a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación establecidos en la presente memoria son meramente ilustrativos y no están destinados a limitar el alcance o la práctica de la composición reivindicada.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación y aislamiento de anticuerpos monoclonales contra IL-13 humana

Ejemplo 1.1: Análisis para identificar anticuerpos anti-IL-13 humana

A lo largo del Ejemplo 1, se utilizaron los siguientes análisis para identificar y caracterizar anticuerpos anti IL-13 humana a menos que se indique lo contrario.

Ejemplo 1.1.A: ELISA

Los análisis inmunoabsorbentes ligados a enzimas para detectar anticuerpos que se unen a la IL-13 humana se realizaron de la siguiente manera.

Se recubrieron placas de ELISA (Corning Costar, Acton, MA) con 50 μ L/pocillo de 5 μ g/ml de anti-IgG específico de Fc de ratón de cabra (Pierce Núm. 31170, Rockford, IL) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante la noche a 4 grados Celsius. Las placas se lavaron una vez con PBS que contenía Tween-20 al 0,05%. Las placas se bloquearon mediante la adición de 200 μ L/pocillo de solución de bloqueo diluida al 2% en PBS (BioRad Núm. 170-6404, Hercules, CA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron una vez después de bloquear con PBS que contenía Tween-20 al 0,05%.

Se añadieron 50 μL por pocillo de suero de ratón o sobrenadantes de hibridoma diluidos en PBS que contenían albúmina de suero bovino (BSA) al 0,1% (Sigma, San Luis, MO) a la placa de ELISA preparada como se describió anteriormente y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron tres veces con PBS que contenía Tween-20 al 0,05%. Se añadieron cincuenta microlitros de variante de IL-13 humana purificada recombinante biotinilada (R110Q) diluida a 100 ng/ml en PBS que contenía BSA al 0,1% a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con PBS que contenía Tween-20 al 0,05%. La estreptavidina HRP (Pierce Núm. 21126, Rockland, IL) se diluyó 1:20000 en PBS que contenía BSA al 0,1%; se añadieron 50 μL /pocillo y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con PBS que contenía Tween-20 al 0,05%. Se añadieron cincuenta microlitros de solución de TMB (Sigma Núm. T0440, San Luis, MO) a cada pocillo y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de ácido sulfúrico 1N. Las placas se leyeron espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm.

15 Ejemplo 1.1.B: Determinaciones de afinidad utilizando la tecnología BIACORE

El análisis BIACORE (Biacore, Inc, Piscataway, NJ) determina la afinidad de los anticuerpos con las medidas cinéticas de las constantes de asociación, disociación. La unión de anticuerpos a IL-13 humana purificada recombinante o variante de IL-13 humana purificada recombinante (R110Q) se determinó mediante mediciones basadas en resonancia de plasmón superficial con un aparato Biacore® 3000 (Biacore® AB, Uppsala, Suecia) utilizando HBS-EP de migración (HEPES 10 mM [pH 7,4], NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y tensioactivo P20 al 0,005%) a 25°C. Todos los productos químicos se obtuvieron de Biacore® AB (Uppsala, Suecia) o de otra fuente, como se describe en el texto. Se inmovilizaron directamente aproximadamente 5000 UR de anti-IgG de ratón de cabra, (fcy), anticuerpo policlonal específico de fragmento (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL) diluido en acetato de sodio 10 mM (pH 4,5) a través de un chip biosensor de grado de investigación CM5 utilizando un kit de acoplamiento de amina convencional de acuerdo con las instrucciones y procedimientos del fabricante a 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Los radicales que no habían reaccionado en la superficie del biosensor se bloquearon con etanolamina. Se utilizó una superficie modificada de carboximetil dextrano en la celda de flujo 2 y 4 como superficie de reacción. Se utilizó carboximetil dextrano no modificado sin IgG de cabra anti-ratón en la celda de flujo 1 y 3 como superficie de referencia. Para el análisis cinético, las ecuaciones de velocidad derivadas del modelo de unión Langmuir 1:1 se ajustaron simultáneamente a las fases de asociación y disociación de las ocho inyecciones (utilizando el análisis de ajuste global) con el uso del soporte lógico Biaevaluation 4.0.1. Los anticuerpos purificados se diluyeron en solución salina tamponada con HEPES para la captura a través de superficies de reacción específicas de anti-IgG de ratón de cabra. Los anticuerpos de ratón que se debían capturar como ligando (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) se inyectaron sobre matrices de reacción a una velocidad de flujo de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Las constantes de velocidad de asociación y disociación, k_{on} (unidad $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y k_{off} (unidad s^{-1}) se determinaron bajo un flujo continuo de 25 $\mu\text{l}/\text{min}$. Las constantes de velocidad se obtuvieron realizando mediciones de unión cinética a diez concentraciones diferentes de antígeno que variaban de 10 a 200 nM. La constante de disociación en equilibrio (unidad M) de la reacción entre anticuerpos de ratón e IL-13 humana purificada recombinante o IL-13 humana purificada recombinante se calculó a continuación a partir de las constantes cinéticas de velocidad mediante la siguiente fórmula: $K_{\text{D}} = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$. La unión se registra como una función del tiempo y se calculan las constantes cinéticas de velocidad. En este análisis, se pueden medir las velocidades de asociación tan rápidas como $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y velocidades de disociación tan lentas como 10^{-6}s^{-1} .

45 Ejemplo 1.1.C: Actividad funcional de anticuerpos anti-IL-13 humana

Para examinar la actividad funcional de los anticuerpos anti-IL-13 humana de la invención, los anticuerpos se utilizaron en los siguientes análisis que miden la capacidad de un anticuerpo para inhibir la actividad de IL-13.

Ejemplo 1.1.C 1 Bioanálisis A-549

50 La capacidad de los anticuerpos anti-IL-13 humana para inhibir la producción inducida por IL-13 humana de TARC (CCL-17) por las células A-549 se analizó de la siguiente manera. Las células A-549 se sembraron el primer día en una placa de 96 pocillos (2E5 células/pocillo) en medio de crecimiento RPMI (con FBS al 10%). El día dos, el medio se reemplazó por medio de crecimiento RPMI de nueva aportación que contenía 400 ng/ml de rhTNF (100 μl /pocillo). Mientras tanto, se preincubaron diversas concentraciones de suero de ratón inmunizado, sobrenadante de hibridoma murino o anticuerpos anti-IL-13 humana purificados durante una hora a 37°C con 10 ng/ml de IL-13 o variante de IL-13 humanas recombinantes purificadas en 100 μL de medio completo RPMI en una placa de microtitulación (fondo en U, 96-pocillos, Costar). El anticuerpo más la mezcla de IL-13 humana purificada recombinante se añadió a continuación (100 μl /pocillo) a las células A-549 cargadas con TNF, con un volumen final de 200 μl /pocillo (las concentraciones finales de IL-13 y TNF fueron 5 ng/ml y 200 ng/ml, respectivamente), y se incubaron durante 18 horas a 37°C. Después de la incubación, se extrajeron 150 μL de sobrenadante libre de células de cada pocillo y se

midió el nivel de TARC humana producida utilizando un ELISA para TARC humana (R & D Systems Núm. Cat. DDN00).

5 Las células A-549 también responden a IL-13 de otras especies, incluyendo mono cinomolgo, ratón, rata y oveja, con valores de DE₅₀ similares a los de la IL-13 humana. Por lo tanto, se empleó para el análisis de reactividad cruzada de los mAb anti-hIL-13 a IL-13 de otras especies utilizando el mismo protocolo experimental.

Ejemplo 1.2: Generación de anticuerpos monoclonales contra IL-13 humana

10 Los anticuerpos monoclonales de ratón anti-IL-13 humana se obtuvieron de la siguiente manera:

Ejemplo 1.2.A: Inmunización de ratones con antígeno IL-13 humana

15 Se inyectaron por vía subcutánea 20 µg de variante de IL-13 humana purificada recombinante (Peprotech) mezclada con coadyuvante de Freund completo o coadyuvante Immuneeasy (Qiagen, Valencia, CA) a cinco ratones Balb/C de 6-8 semanas, cinco ratones C57B/6, y cinco ratones AJ el día 1. Los días 24, 38 y 49, se inyectaron subcutáneamente 20 microgramos de variante de IL-13 humana purificada recombinante mezclada con adyuvante de Freund incompleto o coadyuvante Immuneeasy a los mismos ratones. El día 84 o el día 112 o el día 144, a los ratones se les inyectó por vía intravenosa 1 µg de variante de IL-13 humana purificada recombinante.

20 Ejemplo 1.2.B: Generación de Hibridoma

25 Los esplenocitos obtenidos de los ratones inmunizados descritos en el Ejemplo 1.2.A se fusionaron con células SP2/O-Ag-14 a una razón de 5:1 de acuerdo con el método establecido descrito en Kohler, G. y Milstein 1975, Nature, 256:495 para generar hibridomas. Los productos de fusión se sembraron en medios de selección que contenían azaserina e hipoxantina en placas de 96 pocillos a una densidad de 2,5x10⁶ células de bazo por pocillo. Siete a diez días después de la fusión, se observaron colonias de hibridoma macroscópicas. El sobrenadante de cada pocillo que contenía colonias de hibridoma se sometió a ensayo mediante ELISA para determinar la presencia de anticuerpo frente a la variante de IL-13 (como se describe en el Ejemplo 1.1.A). Los sobrenadantes que mostraban actividad específica de la variante de IL-13 se analizaron después para determinar la capacidad de neutralizar la variante de IL-13 y el tipo salvaje de IL-13 en el bioanálisis en A-549 para TARC (como se describe en el Ejemplo 1.1.C).

35 Ejemplo 1.2.C: Identificación y caracterización de anticuerpos monoclonales contra IL-13 humana

40 Los hibridomas que producen anticuerpos que se unían a la variante de IL-13, generados de acuerdo con los Ejemplos 1.2.B y 1.2.C, y capaces de unirse a la variante de IL-13 específicamente y particularmente aquellos con valores de CI₅₀ en el bioanálisis en A-549 de 5 nM o menos de 5 nM se ampliaron y se clonaron mediante dilución limitante.

45 Las células de hibridoma se expandieron en medios que contenían de suero bovino fetal de bajo contenido en IgG al 10% (Hyclone Núm. SH30151, Logan, UT). De promedio, se recogieron, concentraron y purificaron 250 mL de cada sobrenadante de hibridoma (derivado de una población clonal) mediante cromatografía de afinidad de proteína A, como describen Harlow, E. y Lane, D. 1988 en "Antibodies: A Laboratory Manual". La capacidad de los mAb purificados para inhibir la actividad de IL-13 se determinó utilizando el bioanálisis en A-549 como se describe en los Ejemplos 1.1.C. La Tabla 7 muestra los valores de CI₅₀ de los bioanálisis en A-549 para 17 anticuerpos monoclonales.

Tabla 7: Neutralización de IL-13 por mAb anti IL-13 en bioanálisis A-549

Anticuerpo monoclonal murino	Isotipo	CI ₅₀ Promedio (nM) IL-13 Humana de tipo salvaje	CI ₅₀ Promedio (nM) Variante de IL-13 humana	CI ₅₀ Promedio (nM) IL-13 de Cynomolgus
4A8	IgG1λ	ND	2,70E-10	ND
6C8	IgG1κ	7,20E-10	3,40E-10	1,61E-10
5F1	IgG1κ	9,70E-11	9,00E-11	1,88E-09
1B6	IgG1κ	8,40E-10	2,40E-10	5,21E-10
5G1	IgG1κ	7,60E-11	4,80E-11	6,12E-10
29G5	IgG2ak	2,90E-10	2,00E-10	4,39E-09

Anticuerpo monoclonal murino	Isotipo	CI ₅₀ Promedio (nM) IL-13 Humana de tipo salvaje	CI ₅₀ Promedio (nM) Variante de IL-13 humana	CI ₅₀ Promedio (nM) IL-13 de Cynomolgus
33C3	IgG1κ	1,50E-10	1,00E-10	8,47E-10
25C8	IgG1κ	2,30E-10	2,60E-10	1,88E-10
13C5	IgG1κ	1,90E-10	1,70E-10	5,00E-09
3E5	IgG2ακ	1,30E-10	3,00E-10	1,61E-10
3H7	IgG2ακ	N/A	5,80E-10	7,97E-10
5D3	IgG1κ	7,05E-10	2,90E-10	2,91E-10
8B6	IgG1κ	ND	4,80E-10	3,95E-10
21D9	IgG2βκ	6,82E-11	1,36E-10	3,40E-10
14B2	IgG1κ	ND	4,36E-10	N/A
9C11	IgG1κ	1,06E-10	1,70E-10	6,40E-10
22D10	IgG1κ	2,84E-10	5,40E-10	6,11E-09

Las afinidades de unión de los anticuerpos monoclonales a la variante de IL-13 humana purificada recombinante y al tipo salvaje se determinaron utilizando la medición de resonancia de plasmón superficial (Biacore®) como se describe en el Ejemplo 1.1.B. La Tabla 8 muestra la afinidad de los 18 anticuerpos monoclonales descritos anteriormente para IL-13 humana.

5

Tabla 8: Afinidad de los mAb anti IL-13 para IL-13 de tipo salvaje y variante humanas

mAb	IL-13 Humana de tipo salvaje			IL-13 Variante humana		
	k _{on} (1/M • s)	k _{off} (1/s)	K _D (M)	k _{on} (1/M • s)	k _{off} (1/s)	K _D (M)
4A8			8,90E-11			1,57E-10
6C8	1,45E + 06	7,02E-04	4,84E-10	9,78E + 05	3,94E-04	4,03E-10
5F1	7,74E + 05	2,24E-05	2,89E-11	5,02E + 05	1,57E-05	3,14E-11
1B6	9,51E + 05	5,18E-04	5,45E-10	1,06E + 05	2,22E-04	2,10E-10
5G1	6,26E + 05	5,49E-06	8,77E-12	1,57E + 05	2,05E-05	1,30E-10
29G5	8,59E + 05	1,75E-04	2,04E-10	3,16E + 05	1,04E-04	3,29E-10
33C3	2,33E + 06	1,49E-04	6,39E-11	7,70E + 05	9,59E-05	1,24E-10
25C8	3,45E + 05	2,60E-05	7,54E-11	1,34E + 05	8,45E-06	6,31E-11
13C5	1,25E + 06	9,31E-05	7,45E-11	5,74E + 05	4,35E-05	7,59E-11
3E5	1,44E + 06	6,58E-04	4,57E-10	1,85E + 06	4,68E-04	2,53E-10
3H7	NB			2,54E + 05	5,58E-05	2,20E-10
5D3	1,63E + 06	4,83E-04	2,96E-10	1,51E + 06	5,84E-04	3,87E-10
8B6	1,16E + 06	6,07E-04	5,23E-10	9,83E + 05	9,60E-04	9,76E-10
21D9	8,52E + 05	6,58E-05	7,72E-11	8,31E + 05	6,18E-05	7,44E-11
14B2	6,69E + 05	1,84E-04	2,75E-10	8,08E + 05	2,79E-04	3,46E-10
9C11	5,79E + 05	6,50E-05	1,12E-10	6,37E + 05	5,86E-05	9,21E-11
22D10	1,82E + 05	6,50E-05	3,56E-10	2,45E + 05	1,55E-04	6,32E-10

Ejemplo 1.2.C.1: Especificidad de especie de anticuerpos monoclonales murinos anti-IL-13 humana

Para determinar si los 17 anticuerpos monoclonales descritos anteriormente reconocen IL-13 murina, se preparó un ELISA indirecto recubriendo placas de ELISA con 5 µg/ml de anti-gG de ratón de cabra, anticuerpo específico de fragmento Fc (Pierce Núm. 31170, Rockland, IL). Se prepararon los mAb murinos anti-IL-13 humana a diversas concentraciones que variaban de 0,1 a 100 ng/ml en PBS que contenía BSA al 0,1%; se añadieron 50 µl de cada dilución de anticuerpo a la placa de ELISA recubierta y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron 3 veces con PBS que contenía Tween-20 al 0,05%. Se diluyó IL-13 de ratón biotinilada recombinante (R & D Systems) a 0,1 µg/ml en PBS que contenía BSA al 0,1%; Se añadieron 50 µl/pocillo y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron 3 veces con PBS que contenía Tween-20 al 0,05%. La estreptavidina HRP (Pierce Núm. 21126, Rockland, IL) se diluyó 1:20000 en PBS que contenía BSA al 0,1%; se añadieron 50 µl/pocillo y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con PBS que contenía Tween-20 al 0,05%. Se añadieron cincuenta microlitros de solución de TMB (Sigma Núm. T0440, San Luis, MO) a cada pocillo y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de ácido sulfúrico 1N. Las placas se leyeron espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm. Los resultados del ELISA indirecto indicaron que el mAb 3H7 fue capaz de unirse a mL-13. En un bioanálisis posterior, se demostró que 3H7 podría inhibir la producción de TARC estimulada por mL-13 de una manera dependiente de la dosis, con una CI_{50} de 2,4 nM. El análisis Biacore también demostró unión positiva de 3H7 a mL-13, con una K_D de 12 nM. Todos los demás mAb en la tabla 8 no mostraron ninguna unión positiva a IL-13 de ratón.

La potencia de neutralización de los mAb anti-hIL-13 frente a IL-13 de primate no humano (cinomolgo) e IL-13 de oveja también se midieron en el bioanálisis A-548. Para generar IL-13 de cinomolgo y oveja, se obtuvo ADNc para cada proteína mediante PCR en un molde de ADN genómico utilizando cebadores degenerados basados en la secuencia de IL-13 humana. Las proteínas recombinantes de IL-13 de cinomolgo y oveja se expresaron posteriormente en células COS transfectadas transitoriamente. La IL-13 humana de tipo salvaje también se generó en paralelo como control en todos los estudios funcionales. Las células A-549 respondieron tanto a IL-13 de cinomolgo como de oveja con una DE_{50} similar a la de IL-13 humana. La mayoría de los mAb neutralizaron la actividad de IL-13 de cinomolgo, demostrando reactividad cruzada con IL-13 de cinomolgo (Tabla 7). Sin embargo, ninguno de los anticuerpos mostró una neutralización significativa de IL-13 de oveja.

Ejemplo 1.2.C.2: Los anticuerpos monoclonales murinos anti-IL-13 humana bloquean la unión de IL-13 a los receptores de IL-13 (IL-13R α 1 e IL-13R α 2)

La actividad de IL-13 está mediada por un complejo receptor que consiste en las cadenas IL-13R α 1 e IL-4R α . La citocina primero experimenta una interacción de afinidad relativamente baja con IL-13R α 1 en la superficie de las células. El complejo IL-13/IL-13R α 1 recluta a continuación IL-4R α para formar el receptor completo de IL-13, que se une a su ligando (IL-13) con alta afinidad (Zurawski et al. (1993) EMBO J. 12:2663; Zurawski et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:23869). La unión de IL-13 al receptor de alta afinidad envía a continuación señales aguas abajo a través de la cadena de IL-4R α que implica el transductor de señal de la quinasa Janus y el activador de la ruta de transcripción (JAK-STAT), por ejemplo, a través de la fosforilación de STAT6, que se puede verificar como una de las respuestas celulares más tempranas a IL-13 (Murata et al., supra).

Existe otro receptor de unión a IL-13, la cadena IL-13R α 2 (IL-13R α 2), que se une a IL-13 con alta afinidad (0,25-1,2 nM) (Caput, et al. 1996 J. Biol. Chem. 271, 16921-16926; Donaldson et. al. 1998 J. Immunol. 161, 2317-2324). No se conoce ninguna otra molécula receptora involucrada en el complejo IL-13/IL-13R α 2. Inicialmente se pensó que IL-13R α 2 actuaba como un receptor "señuelo" que no señalaba. Sin embargo, posteriormente se descubrió que puede unirse a IL-13 y señaliza a través de la vía AP-1, lo que conduce a la producción de TGF-beta en ciertos tipos celulares, incluidos los macrófagos, lo que a su vez conduce a la fibrosis pulmonar (Fichtner-Feigl. 2006 Nat Med 12:99-106). Por consiguiente, tanto el complejo IL-13R α 1/IL-4R como las vías IL-13R α 2 contribuyen a la fisiopatología general del asma y otras enfermedades mediadas por IL-13. Se utilizaron varios enfoques, tales como mapeo de epítomos, análisis de unión a receptor, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), y análisis adicional BIACORE, para dilucidar la interacción entre los anticuerpos anti-IL-13 de la descripción e IL-13 humana.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales descritos anteriormente son capaces de bloquear la unión de IL-13 a los receptores de IL-13 (IL-13R α 1 e IL-13R α 2), se desarrolló un ELISA de unión a receptor de la siguiente manera. Se recubrieron placas de ELISA de 96 pocillos de alta unión con 4 µg/ml de IL-13R α 1/Fc o IL-13R α 2/Fc recombinante (R&D Systems) en tampón de recubrimiento de 100 µl/pocillo (tampón Carbonato-bicarbonato, Pierce) a 4°C. Después de 16 horas, la solución de recubrimiento se retiró golpeteando el contenido de la placa en el fregadero, y las placas se lavaron y se bloquearon 4 veces con tampón de bloqueo Superblock (240 µl/pocillo) (Pierce). Se añadieron los MAb anti-IL13 (1:4 diluidos seriadamente a partir de 40 µg/ml, 50 µl/pocillo) y Biotina-IL-13 (50 µl/pocillo, concentraciones finales de 5 nM para hIL-13R α 1/Fc, y 0,5 nM para hIL-13R α 2/Fc) y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente (RT). Las placas se lavaron 5 veces con 300 µl de PBST al 0,1%, y a continuación se añadieron 100 µl de MAb anti-biotina de ratón diluido 1:5000 (Jackson Immunosciences) y se

incubaron a RT durante 45 minutos. Las placas se lavaron de nuevo 5 veces con 300 μ l de PBST al 0,1%, seguido de la adición de reactivo de sustrato TMB (100 μ l/pocillo, Pharmingen); desarrollado durante 5 minutos, y se detuvo mediante la adición de 50 μ l de H₂SO₄ 2M (VWR). Las DO a 450 nm se determinaron mediante espectrofotometría.

5 Adicionalmente, las propiedades de bloqueo del receptor de los mAb también se evaluaron mediante análisis de unión al receptor utilizando células COS transfectadas con IL-13R α 2. La IL-13 humana recombinante se marcó con ¹²⁵I (Amersham, Arlington Heights, IL), utilizando el reactivo IODO-GEN (Pierce, Rockford, IL) como se describió previamente (Obiri NI et al., (1995) J Biol Chem. 270:8797-8804). Se estimó que la actividad específica de la IL-13 radiomarcada era de 158 μ Ci/ μ g de proteína. La IL-13 marcada exhibió una bioactividad similar a la IL-13 no marcada, según se evaluó mediante el bioanálisis A-549. Para los experimentos de unión, las células COS se transfectaron transitoriamente con IL-13R α 2 humana mediante Lipofectamine 2000 (Invitrogen), y se incubaron durante 48 horas. Las células COS transfectadas (5 x 10⁵ células en 100 μ l de tampón de unión: RPMI 1640 que contenía albúmina de suero humano al 0,2% y 10 mmoles de HEPES) se incubaron con 1,0 nM ¹²⁵I-IL-13 con o sin 1 μ M de IL-13 sin marcar a 4°C durante 2 horas. La ¹²⁵I-IL-13 celular se separó de la ¹²⁵I-IL-13 mediante centrifugación a través de un gradiente oleoso de ftalato, y se determinó la radioactividad con un contador gamma (Wallac, Gaithersburg, MD). Para el análisis de desplazamiento del anticuerpo, las células COS transfectadas se incubaron con 125I-IL-13 (1,0 nM) con o sin concentraciones crecientes (hasta 50 μ g/ml) de anticuerpos anti-IL-13, como se describió anteriormente. Ambas formas de análisis de unión al receptor demostraron lo siguiente: en primer lugar, 13C5 y 9C11 bloquearon la unión de IL-13 a IL-13R α 1; segundo, 13C5 bloqueó fuertemente la unión de IL-13 a IL-13R α 2 (CI₅₀ ~ 1-3 nM tanto en RBA de superficie celular como ELISA de RB), mientras que 9C11 bloqueó la unión de IL-13R α 2 a IL-13 con una potencia más baja (CI₅₀ > 10 nM); y tercero, 5G1 y 3E5 no pudieron bloquear la unión de IL-13 a IL-13R α 1 o IL-13R α 2. Otros tres anticuerpos anti-IL-13, BAK502G9 (CAT PCT WO 2005/007699), mAb13.2 (Wyeth) PCT WO 2005/123126A2) y MJ2-7 (Wyeth) PCT WO 2006/0073148A1) también se analizaron para determinar su capacidad para bloquear la unión de IL-13 humana a IL-13 Ra2 humana tanto en ELISA de unión al receptor como en RBA de superficie celular. El anticuerpo mAb13.2 no bloqueó la unión de IL-13 a IL-13R α 1 o IL-13R α 2. BAK502G9 y MJ2-7 pudieron bloquear la unión de IL-13 a IL-13R α 1; sin embargo, exhibieron baja potencia para bloquear la unión de IL-13 a IL-13R α 2 con concentraciones de anticuerpo de hasta 50 μ g/ml (330 nM).

La interacción entre IL-13 e IL-13R α 1/ α 2 en presencia de los mAb anti-IL-13 también se analizó mediante BIACORE. Este análisis se realizó en varios formatos. Primero, se unió IL-13R α 1/Fc al chip Biacore y se hizo circular IL-13 sobre el chip, en presencia y en ausencia de los mAb anti-IL-13. Los mAb 13C5 y 9C11, entre otros, pudieron bloquear la unión de IL-13 a IL-13R α 1, mientras que 5G1 y 3E5 fracasaron al inhibir la unión de IL-13 a IL-13R α 1, compatible con los análisis de unión a receptor. En segundo lugar, IL-4R se unió al chip BIACORE y se hizo circular un complejo de IL-13 pre-unido a IL-13R α 1 sobre el chip. En ausencia de los mAb anti-IL-13, se demostró la formación de un complejo trimolecular. Sin embargo, la adición del anticuerpo anti-IL-13 5G1 a la mezcla de IL-13 preconectado a IL-13R α 1 impedía la unión a IL-4R en el chip. Esto indicó que, aunque 5G1 no podría bloquear la unión de IL-13 a IL-13R α 1, podría bloquear la unión de la unión de IL-13 a IL-4R, proporcionando una base mecánica para su actividad neutralizante de IL-13. Estas observaciones se confirmaron adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), donde se observaron complejos hetero-triméricos (mAb-IL-13-IL-13R α 1/Fc) para 5G1, pero no para 13C5. Estudios subsiguientes de mapeo de epítomos utilizando procesamiento de proteinasa del complejo mAb-IL-13 seguido de análisis de espectrometría de masas indicaron lo siguiente: Primero, 5G1 se une a residuos de IL-13 incluyendo el péptido N-terminal de 11-aa (GPVPPSTALRE), cubriendo parte de la región de la Hélice A que se ha demostrado que interactúa con IL-4R (Moy et. al. 2001J Mol Biol. 310:219 y Horita y otros, (2001) J Mol Biol. 310:231); en segundo lugar, el anticuerpo 9C11 interacciona con una región entre la Hélice C y la Hélice D (VSAGQFSSLHVR); y tercero, el anticuerpo 13C5 interacciona con residuos de IL-13 que incluyen una región que cubre la Hélice D (VRDTK IEVAQ FVKDL LLHLK KLFRE GR correspondiente a los aminoácidos 104-130 de SEQ ID NO.1). Se ha demostrado que la Hélice D interactúa con los receptores de IL-13 (Moy et. al. 2001J Mol Biol. 310:219; Horita et al. 2001 J Mol Biol. 310:231; y Madhankumar et al 2002 JBC 277:43194). Dado que 13C5 se une a la variante de IL-13 humana (K_D= 50 pM) mucho más fuertemente que a de IL-13 cinomolgo (K_D= 1800 pM), y la única diferencia de secuencia entre la variante de IL-13 humana y la IL-13 de cinomolgo dentro de esta región potencial del epítipo 13C5 es L en humanos pero V en IL-13 de cinomolgo en la posición 120, los autores de la presente invención generaron un mutante V120L de IL-13 de cinomolgo y sometieron a ensayo si esta mutación tendría un aumento de la afinidad de unión a 13C5 sobre la IL-13 cinomolgo de tipo salvaje. Basándose en los resultados de Biacore y de bioanálisis, la afinidad de unión y la potencia de neutralización de 13C5 para la IL-13 de cinomolgo mutante V120L fueron equivalentes a los del IL-13 de cinomolgo de tipo salvaje, indicando que esta diferencia de V/L en la posición 120 dentro de la región C-terminal no contribuye a la diferencia de afinidad de 13C5 para la variante de IL-13 humana frente a IL-13 de cinomolgo, y que debe haber otros residuos fuera de la región C-terminal que contribuyan a la afinidad de unión diferencial de 13C5 a IL-13 humana y de cinomolgo. Esto es compatible con la observación de que 13C5 no reconoce IL-13 humana desnaturalizada mediante análisis de transferencia Western, lo que indica que el epítipo de unión de 13C5 en IL-13 humana es fuertemente conformacional.

Los estudios de mapeo de unión y epitópicos indicaron que 5G1 no inhibió la interacción de IL-13 con IL-13R α 1 pero interrumpió la interacción de IL-13/IL-13R α 1 con IL-4R α . Se cree que esta alteración interfiere con la formación de un complejo funcional de señalización de IL-13. Estas observaciones proporcionan un modelo teórico para la actividad neutralizante de este anticuerpo en un sistema mediado por IL-13R α 1/IL-4R tal como las células A-549. Por el contrario, 13C5 bloqueó la unión de IL-13 tanto a IL-13R α 1 como a IL-13R α 2. De manera interesante, incluso aunque 9C11 fue capaz de bloquear la unión de IL-13 a IL-13R α 1, solo mostró una inhibición parcial (o de baja potencia) de la unión de IL-13 a IL-13R α 2. Aunque IL-13R α 1 y R α 2 adoptan un pliegue tridimensional y una orientación de unión a IL-13 similares, tienen una baja identidad de secuencia y, por lo tanto, los residuos específicos responsables de la unión de IL-13 pueden variar (Arima 2005 JBC 280:24915; y Madhankumar et al. 2002 JBC 277:43194). En consecuencia, los residuos específicos en IL-13 para su unión a IL-13R α 1 e IL-13R α 2 pueden diferir, lo que podría explicar las propiedades diferenciales de bloqueo de receptor de 9C11.

Los análisis de unión al receptor, el mapeo de epítomos, Biacore y el bioanálisis descritos anteriormente indican colectivamente que un anticuerpo neutralizante anti-IL-13 puede inhibir la actividad asociada a IL-13 a través de los siguientes mecanismos:

1) Inhibe la unión de IL-13 tanto a IL-13R α 1 como a IL-13R α 2 al interactuar con IL-13 en la región implicada en la unión del receptor tanto a IL-13R α 1 como a IL-13R α 2. Un ejemplo de dicho anticuerpo es 13C5. Tales anticuerpos inhibirán la señalización de IL-13 a través del complejo IL-13R α 1/IL-4R e IL-13R α 2.

2) No inhibe la unión de IL-13 a IL-13R α 1 o IL-13R α 2. Sin embargo, el anticuerpo inhibe la interacción con el receptor de IL-4, por lo tanto, inhibe la señalización de IL-13 a través del complejo IL-13R α 1/IL-4R. Tal anticuerpo puede no inhibir la señalización de IL-13R α 2. Los ejemplos de tales anticuerpos son 5G1 y mAb13.2 (Wyeth PCT WO 2005/123126).

3) Inhibe la unión de IL-13 a IL-13R α 1 pero no inhibe eficazmente la unión de IL-13 a IL-13R α 2. Esto podría ocurrir por las siguientes razones: a) epítopo: una región que participa en la unión de IL-13R α 1 pero no en la unión de IL-13R α 2 o que no está tan fuertemente implicada en la unión de IL-13R α 2. Un ejemplo es 9C11; b) afinidad: dado que IL-13R α 2 tiene una afinidad mucho más alta que IL-13R α 1 por IL-13, un anticuerpo de baja afinidad puede bloquear la unión de IL-13 a IL-13R α 1 pero no a IL-13R α 2 a concentraciones fisiológicas de un anticuerpo terapéutico. Un ejemplo es BAK502G9, que muestra una afinidad 2,11nM por la IL-13 humana recombinante de tipo salvaje evaluada por Biacore (CAT PCT WO 2005/007699). Otro ejemplo es MJ2-7, que muestra una afinidad de 1,4 nM por la IL-13 humana recombinante salvaje y una afinidad más alta (43 pM) por la IL-13 de mono evaluada por Biacore (Wyeth PCT WO 2006/0073148A1). Debido a la diferencia de afinidad, este mAb puede inhibir eficazmente la unión de IL-13 de mono a IL-13R α 2; sin embargo, inhibe la unión de IL-13 humana al mismo receptor con mucha menos potencia.

Los mAb BAK502G9 y MJ2-7 tienen epítomos similares (CAT PCT WO 2005/007699 y Wyeth PCT WO 2006/0073148A1) y compiten por la unión a IL-13 según se evaluó mediante el ELISA competitivo. Brevemente, BAK502G9 se inmovilizó en una placa de ELISA seguido de lavado y bloqueo. A continuación, se añadió IL-13 humana biotinilada (10 ng/ml) a la placa en presencia de diversas concentraciones de MJ2-7 (0,2 ng/ml a 20 μ g/ml), seguido de lavado y detección utilizando anticuerpo anti-biotina conjugado con HRP.. Este estudio demostró que MJ2-7 competía de forma dependiente de la dosis con BAK502G9 por la unión a IL-13 humana. Una IgG de control negativo no mostró competición con BAK502G9.

Ejemplo 1.2.D Determinación de la secuencia de aminoácidos de la región variable para cada mAb anti-IL-13 murino

Para cada determinación de secuencia de aminoácidos, se aislaron mediante centrifugación aproximadamente 10×10^6 las células de hibridoma y se procesaron para aislar el ARN total con Trizol (Gibco BRL/Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN total se sometió a la síntesis de ADN de la primera hebra utilizando el sistema de síntesis SuperScript First-Strand (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizó Oligo(dT) para cebar la síntesis de la primera hebra para seleccionar ARN poli(A)⁺. El producto de ADNc de la primera cadena se amplificó a continuación mediante PCR con cebadores diseñados para la amplificación de regiones variables de inmunoglobulina murinas (Ig-Primer Sets, Novagen, Madison, WI). Los productos de PCR se resolvieron en un gel de agarosa, se escindieron, se purificaron, y a continuación se subclonaron con el kit TOPO Cloning en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se transformaron en *E. coli* químicamente competentes TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se realizó PCR de colonias sobre los transformantes para identificar los clones que contenían el inserto. El ADN del plásmido se aisló a partir de clones que contenían el inserto utilizando un kit QIAprep Miniprep (Qiagen, Valencia, CA). Los insertos en los plásmidos se secuenciaron en ambas cadenas para determinar las secuencias de ADN variables de la cadena ligera o variable de cadena pesada utilizando cebadores M13 directos y M13 inversos (Fermentas Life Sciences, Hanover MD). Las

secuencias de cadenas ligeras variables y pesadas variables de los 17 anticuerpos monoclonales descritos en el Ejemplo 1.2.C se describen en la Tabla 5.

Ejemplo 2: Anticuerpos anti-IL-13 recombinantes humanos

Ejemplo 2.1: Construcción y expresión de anticuerpos anti IL-13 humana recombinantes quiméricos

El ADN que codifica la región constante de cadena pesada de anticuerpos monoclonales murinos anti-IL-13 humana 5G1, 13C5, 9C11, 21D9 y 3H7 fue reemplazado por un fragmento de ADNc que codificaba la región constante de IgG1 humana que contenía 2 mutaciones de aminoácidos de región de bisagra por recombinación homóloga en bacterias. Estas mutaciones son un cambio de leucina a alanina en la posición 234 (numeración UE) y un cambio de leucina a alanina en la posición 235 (Lund et al., 1991, J. Immunol., 147:2657) La región constante de cadena ligera de cada uno de estos anticuerpos se reemplazó por una región constante kappa humana. Los anticuerpos quiméricos completos se expresaron transitoriamente en células COS mediante co-transfección de ADNc de cadena pesada y ligera quiméricos ligados al plásmido de expresión pBOS (Mizushima y Nagata, Nucleic Acids Research 1990, Vol 18, pág. 5322). Los sobrenadantes celulares que contenían anticuerpo quimérico recombinante se purificaron mediante cromatografía de Proteína A Sefarosa y el anticuerpo unido se eluyó mediante la adición de tampón ácido. Los anticuerpos se neutralizaron y se sometieron a diálisis en PBS.

Los anticuerpos monoclonales anti-IL-13 humana quiméricos purificados se analizaron a continuación para determinar su capacidad para inhibir la producción de TARC inducida por IL-13 por las células A-549 como se describe en los Ejemplos 1.1.C 2 y 1.1.C3. La Tabla 12 muestra valores de CI_{50} de los bioanálisis en A-549 para tres anticuerpos quiméricos.

Tabla 9 Neutralización de rhIL-13 wt por Anticuerpos Quiméricos anti-IL-13 en un bioanálisis en A-549

Quimérico	Promedio CI_{50} (M)
5G1-Quim	4,10E-11
13C5-Quim	1,91E-10
9C11-Quim	1,23E-10

Ejemplo 2.2: Construcción y expresión de anticuerpos anti-IL-13 humana humanizados

Ejemplo 2.2.1: Selección de marcos de anticuerpos humanos

Cada secuencia de gen de la cadena pesada variable y ligera variable murina (como se describe en la Tabla 3) se alineó por separado frente a 44 secuencias de la cadena pesada variable de la línea germinal o 46 secuencias de la cadena ligera variable de la línea germinal de la inmunoglobulina humana (obtenidas del sitio web NCBI Ig Blast <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/retrieveig.html>.) utilizando el soporte lógico Vector NTI.

La humanización se basó en la homología de secuencia de aminoácidos, el análisis de agrupamiento de CDR, la frecuencia de uso entre anticuerpos humanos expresados, y la información disponible sobre las estructuras cristalinas de anticuerpos humanos. Teniendo en cuenta los posibles efectos sobre la unión del anticuerpo, el emparejamiento de VH-VL y otros factores, los residuos murinos se mutaron a residuos humanos en los que los residuos de marcos murino y humano fueron diferentes, con algunas excepciones. Se diseñaron estrategias de humanización adicionales basadas en un análisis de secuencias de anticuerpos de la línea germinal humana, o un subgrupo de las mismas, que poseían un alto grado de homología; es decir, similitud de secuencia, con la secuencia de aminoácidos real de las regiones variables de anticuerpo murino.

Se utilizó modelado de homología para identificar residuos únicos de las secuencias de anticuerpos murinos que se predice que son críticos para la estructura del sitio de combinación del anticuerpo (las CDR). El modelado de homología es un método computacional mediante el cual se generan coordenadas tridimensionales aproximadas para una proteína. La fuente de las coordenadas iniciales y la orientación para su posterior refinamiento es una segunda proteína, la proteína de referencia, para la cual se conocen las coordenadas tridimensionales y cuya secuencia se relaciona con la secuencia de la primera proteína. La relación entre las secuencias de las dos proteínas se utiliza para generar una correspondencia entre la proteína de referencia y la proteína para la que se desean las coordenadas, la proteína diana. Las secuencias primarias de las proteínas de referencia y diana se alinean con las coordenadas de partes idénticas de las dos proteínas transferidas directamente de la proteína de referencia a la proteína diana. Las coordenadas para porciones no emparejadas de las dos proteínas, p.ej. a partir

de mutaciones, inserciones o deleciones de residuos, se construyen a partir de moldes estructurales genéricos y energía refinada para asegurar la compatibilidad con las coordenadas del modelo ya transferido. Esta estructura de proteína computacional puede ser refinada o empleada directamente en estudios de modelado. Debe quedar claro a partir de esta descripción que la calidad de la estructura del modelo está determinada por la precisión de la afirmación de que las proteínas de referencia y diana están relacionadas y la precisión con la que se construye el alineamiento de la secuencia.

Para las secuencias murinas 5G1, 13C5 y 9C11, se utilizó una combinación de búsqueda de BLAST e inspección visual para identificar estructuras de referencia adecuadas. La identidad de secuencia del 25% entre las secuencias de aminoácidos de referencia y diana se considera el mínimo necesario para intentar un ejercicio de modelado de homología. Las alineaciones de secuencia se construyeron manualmente y las coordenadas del modelo se generaron con el programa Chacal (véase Petrey, D., Xiang, Z., Tang, CL, Xie, L., Gimpelev, M., Mitros, T., Soto, CS, Goldsmith-Fischman, S., Kernysky, A., Schlessinger, A., et al. 2003. Using multiple structure alignments, fast model building, and energetic analysis in fold recognition and homology modeling. *Proteins* 53 (Supl. 6): 430-435).

Las secuencias primarias de las regiones marco murinas y humanas de los anticuerpos seleccionados comparten identidad significativa. Las posiciones residuales que difieren son candidatas para la inclusión del residuo murino en la secuencia humanizada con el fin de retener la potencia de unión observada del anticuerpo murino. Se construyó manualmente una lista de residuos de marco que difieren entre las secuencias humana y murina.

La probabilidad de que un determinado residuo del marco afecte a las propiedades de unión del anticuerpo depende de su proximidad a los residuos de CDR. Por lo tanto, utilizando las estructuras modelo, los residuos que difieren entre las secuencias murinas y humanas se clasificaron según su distancia de cualquier átomo en las CDR. Los residuos que cayeron dentro de 4,5 Å de cualquier átomo de CDR se identificaron como los más importantes y se recomendaron que fueran candidatos para la retención del residuo murino en el anticuerpo humanizado (es decir, retromutación).

Para la humanización de las regiones variables de 5G1, se siguió el enfoque general proporcionado en la presente invención. Primero, se construyó un modelo molecular de las regiones variables 5G1 con la ayuda de los programas informáticos ABMOD y ENCAD (Levitt, M., *J. Mol. Biol.* 168: 595-620 (1983)). A continuación, en base a una búsqueda de homología frente a secuencias de segmentos V y J humanos, el segmento VH 21/28 (Dersimonian, H., et al., *J. Immunol.* 139: 2496-2501 (1987)) y el segmento J JH4 (Ravetch, J.V., et al., *Cell* 27: 583-591 (1981)) se seleccionaron para proporcionar los marcos para la región variable de la cadena pesada de Hu5G1. Para la región variable de la cadena ligera de 5G1, se utilizaron el segmento VL HF-21/28 (Chastagner, P., et al., *Gene* 101: 305-306 (1991)) y el J segmento JK4 (Hieter, P.A., et al., *J. Biol. Chem.* 257: 1516-1522 (1982)). La identidad de los aminoácidos del marco entre VH de 5G1 y el aceptor humano 21/28 y los segmentos JH4 fue de 72%, mientras que la identidad entre VL de 5G1 y los segmentos humanos aceptables HF21/28 y JK4 fue de 83%. En las posiciones marco en las que el modelo informático sugería un contacto significativo con las CDR, los aminoácidos de las regiones V de ratón se sustituyeron por los aminoácidos originales de la estructura humana. Esto se hizo en los residuos 48, 67, 68, 70, 72, 74 y 97 de la cadena pesada. Para la cadena ligera, se realizó la sustitución en el residuo 50. Los restos del marco que aparecieron solo raramente en sus respectivas posiciones en los correspondientes subgrupos de la región V humana se reemplazaron por aminoácidos consenso humanos en esas posiciones. Esto se hizo en los residuos 44 y 76 de la cadena pesada, y en los residuos 2, 15, 41, 42, 44 y 51 de la cadena ligera.

Para la humanización de las regiones variables de 13C5, se siguió el enfoque general proporcionado en la presente descripción. Primero, se construyó un modelo molecular de las regiones variables de 13C5 con la ayuda de los programas informáticos ABMOD y ENCAD (Levitt, M., *J. Mol. Biol.* 168: 595-620 (1983)). A continuación, en base a una búsqueda de homología frente a secuencias de segmentos V y J humanos, el segmento VH M60 (Schroeder, Jr., H.W. y Wang, J.Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6146-6150 (1990)) y el segmento J JH4 (Ravetch, J.V., et al., *Cell* 27: 583-591 (1981)) se seleccionaron para proporcionar los marcos para la región variable de la cadena pesada de Hu13C5. Para la región variable de la cadena ligera de Hu13C5, se utilizaron el segmento III-3R de VL (Manheimer-Lory, A., et al., *J. Exp. Med.* 174: 1639-1652 (1991)) y el J segmento JK4 (Hieter, P.A., et al., *J. Biol. Chem.* 257: 1516-1522 (1982)). La identidad de los aminoácidos del marco entre VH de 13C5 y los segmentos aceptores humanos M60 y JH4 fue de 74%, mientras que la identidad entre VL de 13C5 y los segmentos aceptores humanos III-3R y JK4 fue de 75%.

En las posiciones del marco en las que el modelo informático sugería un contacto significativo con las CDR, los aminoácidos de las regiones V de ratón se sustituyeron por los aminoácidos originales de la estructura humana. Esto se hizo en los residuos 22, 49 y 71 para la cadena ligera. Los residuos del marco que aparecieron solo raramente en sus posiciones respectivas en los subgrupos correspondientes de la región V humana fueron reemplazados por

aminoácidos de consenso humano en esas posiciones. Esto se hizo en los residuos 10, 46, 83, 84, 86 y 87 de la cadena pesada, y en los residuos 62 y 73 de la cadena ligera.

Las secuencias de aminoácidos de VL y VH de los mAb humanizados se muestran en la Tabla 10.

5

Tabla 10: Lista de secuencias de aminoácidos de los mAb humanizados

SEQ ID NO.	Región de la proteína	Secuencia
		123456789012345678901234567890
70	VH 5G1.1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT TYGVS WVRQAPGQGLEWIG E IY PGNYNTYY NEKFRG KATMTTDTSTSTAYMELRSLRSDD TAVYYCSR WRTSYFSDYGYFDY WGQGTVT VSS
71	VL 5G1.1	DVVMTQSPVLPVTLGQPASISCRSS QSLV HSHGNTYL HWYQQRPGQSPRLLI YTVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEA EDVGV YYCS QSTHVPYTF GGG TKVEIKR
72	VH 5G1.2	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT TYGVS WVRQAPGQGLEWIG E IY PGNYNTYY NEKFRG KATLTADKSTSTAYMELSSLRSD TAVYFCSR WRTSYFSDYGYFDY WGQGTVT VSS
73	VL 5G1.2	DVVMTQSPVLPVTLGQPASISCRSS QSLV HSHGNTYL HWYQQRPGQSPRLLI YTVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEA EDVGV YFCS QSTHVPYTF GGG TKVEIKR
74	VH 5G1.3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT TYGVS WVRQAPGQGLEWIG E IY PGNYNTYY NEKFRG KATLTADKSTSTAYMELSSLRSE TAVYYCSR WRTSYFSDYGYFDY WGQGLVT VSS
75	VL 5G1.3	DIVMTQSPVLPVTPGQPASISCRSS QSLV HSHGNTYL HWYQKPGQSPKLLI YTVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEA EDVGV YYCS QSTHVPYTF GGG TKVEIKR
76	VH 13C5.1	EVTLKESGPVLVKPTETTLTCTFSGFSL TSDMGVD WIRQPPGKALEWLA HIWDDV KR YNPALK SRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPV DTATYYCART VSSGYIYYAMDY WGQGTVT VSS
77	VL 13C5.1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS QDIR NYLNWY QRKPGKVVKLLI YTSKLH SGVPS RFGSGSGTDFTLTISSLPEDVATYYC QQ GNTLPLTF GGG TKVEIKR

ES 2 661 032 T3

SEQ ID NO.	Región de la proteína	Secuencia
78	VH 13C5.2	<p>EVTLKESGPVLVKPTETTLTCTFSGFSL TSDMGVDWIRQPPGKALEWLAHIWDDV YNPALKSRLTISKDTSKQVVLMTNMDPV DTATYYCARTVSSGYIYYAMDYWGQTTVT VSS</p>
		123456789012345678901234567890
79	VL 13C5.2	<p>DIQMTQTPSSLSASVGRVTISCRASQDIR NYLNWYQRKPGKVVKLLIFYTSKLHSGVPS RFGSGSGTDYTLTISLQPEDVATYFCQQ GNTLPLTFGGGTKVEIKR</p>
80	VH 13C5.5	<p>EVTLRESGPGLVKPTQTLTCTLYGFSL TSDMGVDWIRQPPGKLEWLAHIWDDV YNPALKSRLTISKDTSKNQVVLKLTSDPV DTATYYCARTVSSGYIYYAMDYWGQTLVT VSS</p>
81	VL 13C5.5	<p>DIQMTQSPSSLSASVGRVTISCRASQDIR NYLNWYQQKPGKAPKLLIFYTSKLHSGVPS RFGSGSGTDYTLTISLQPEDVATYFCQQ GNTLPLTFGGGTKVEIK</p>
82	VH 9C11.1	<p>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT SSWIHWVRQAPGQGLEWIGMIHPSDSE NQKFKDRATMTVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCASTATDFDYWGQTTVTVSS</p>
83	VL 9C11.1	<p>DVVLQTPLSLPVTGPGEPAISCRSTQTL NSDGFYLDWYLQKPGQSPQLLIYLVSNRF SGVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGV YYCFQNNYLPITFGAGTKLEIKR</p>
84	VH 9C11.2	<p>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT SSWIHWVNQAPGQGLEWIGMIHPSDSE NQKFKDKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCASTATDFDYWGQTTVTVSS</p>
85	VL 9C11.2	<p>DVVLQTPLSLPVTGPGEPAISCRSTQTL NSDGFYLDWYLQKPGQSPQLLIYLVSNRF SGVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGV YYCFQNNYLPITFGAGTKLEIKR</p>
90	VH 5G1.5	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT TYGVSWVRQAPGQGLEWIGEIYPGNYNTY NEKFRGKATLTADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCSRWRISYFSDYGYFDYWGQTLVT VSS</p>

SEQ ID NO.	Región de la proteína	Secuencia
91	VL 5G1.5	DIVMTQSP LS LPVTPGQPASISCRSSQSLV HSHGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYTVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCSQSTHVPYTFGGGTKVEIK
80	VH 13C5.5L2E	EVTLR ES GPGLVKPTQTLTTLCTLYGFSLS TSDMGVDWIRQPPGKGLEWLAHIWDDV KR YNPALKSRLTISKDTSKNQVVLKLTSDVPV DTATYYCARTVSSGYIYYAMDYWGQGLT VT VSS
92	VL 13C5.5L2E	DIQMTQSPSSLSASVGD RVT ISCRASQDIR NYLNWYQQKPGKAPKLLIF YTS MKPRGVPS RFGSGSGTDYTLTIS SL QPED IAT YYCQQ GNTLPLTFGGGTKVEIK
80	VH 13C5.5L3F	EVTLR ES GPGLVKPTQTLTTLCTLYGFSLS TSDMGVDWIRQPPGKGLEWLAHIWDDV KR YNPALKSRLTISKDTSKNQVVLKLTSDVPV DTATYYCARTVSSGYIYYAMDYWGQGLT VT VSS
93	VL 13C5.5L3F	DIQMTQSPSSLSASVGD RVT ISCRASQDIR NYLNWYQQKPGKAPKLLIF YTS KLHSGVPS RFGSGSGTDYTLTIS SL QPED IAT YYCQQ GLTPPLTFGGGTKVEIK
		123456789012345678901234567890
80	VH 13C5.5L23EL3F	EVTLR ES GPGLVKPTQTLTTLCTLYGFSLS TSDMGVDWIRQPPGKGLEWLAHIWDDV KR YNPALKSRLTISKDTSKNQVVLKLTSDVPV DTATYYCARTVSSGYIYYAMDYWGQGLT VT VSS
94	VL 13C5.5L2EL3F	DIQMTQSPSSLSASVGD RVT ISCRASQDIR NYLNWYQQKPGKAPKLLIF YTS MKPRGVPS RFGSGSGTDYTLTIS SL QPED IAT YYCQQ GLTPPLTFGGGTKVEIK

Ejemplo 2.2.2: Construcción de anticuerpos humanizados

5 Los anticuerpos humanizados construidos *in silico* descritos anteriormente fueron construidos *de novo* utilizando oligonucleótidos. Para cada ADNc de la región variable, se diseñaron 6 oligonucleótidos de 60-80 nucleótidos cada uno para solaparse entre sí mediante 20 nucleótidos en el extremo 5' y/o 3' de cada oligonucleótido. En una reacción de reasociación, los 6 oligos se combinaron, se hirieron y se reasociaron en presencia de dNTP. A continuación se añadió ADN polimerasa I, fragmento grande (Klenow) (New England Biolabs Núm. M0210, Beverley, MA) para rellenar los espacios de aproximadamente 40 pb entre los oligonucleótidos solapantes. Después se realizó la PCR para amplificar el gen completo de la región variable utilizando dos cebadores más externos que contenían secuencias sobresalientes complementarias al sitio de clonación múltiple en un vector pBOS modificado (Mizushima,

10

S. y Nagata, S., (1990) Nucleic acids Research Vol 18, No. 17)). Los productos de PCR derivados de cada conjunto de ADNc se separaron en un gel de agarosa y la banda correspondiente al tamaño de ADNc de la región variable pronosticada se escindió y se purificó. La región pesada variable se insertó en el marco en un fragmento de ADNc que codificaba la región constante de IgG1 humana que contenía 2 mutaciones de aminoácidos de la región de bisagra mediante recombinación homóloga en bacterias. Estas mutaciones son un cambio de leucina a alanina en la posición 234 (numeración de la UE) y un cambio de leucina a alanina en la posición 235 (Lund et al., 1991, J. Immunol., 147:2657). La región de la cadena ligera variable se insertó en el marco con la región constante kappa humana mediante recombinación homóloga. Se aislaron las colonias bacterianas y se extrajo ADN plásmido; los insertos de ADNc se secuenciaron en su totalidad. Las cadenas pesadas y ligeras humanizadas correctas correspondientes a cada anticuerpo se cotransfectaron a células COS para producir transitoriamente anticuerpos anti-IL-13 humana humanizados completos. Para 13C5, los vectores pBOS que contenían el ADNc injertado de cadena pesada de 13C5 y el ADNc injertado de cadena ligera de 13C5 se co-transfectaron a células COS. Los sobrenadantes celulares que contenían anticuerpo quimérico recombinante se purificaron mediante cromatografía en Proteína A Separosa y el anticuerpo unido se eluyó mediante la adición de tampón ácido. Los anticuerpos se neutralizaron y se sometieron a diálisis en PBS. En la Tabla 10 se describen diversos anticuerpos humanizados.

La capacidad de los anticuerpos humanizados purificados para inhibir la actividad de IL-13 se determinó utilizando el bioanálisis en A-549 como se describe en los Ejemplos 1.1.C. Las afinidades de unión de los anticuerpos humanizados a IL-13 humana recombinante se determinaron utilizando la medición de resonancia de plasmón superficial (Biacore®) como se describe en el Ejemplo 1.1.B. La Tabla 11 muestra los valores CI_{50} de los bioanálisis en A-549 y la afinidad de los primeros seis anticuerpos humanizados descritos en la Tabla 10 para IL-13wt humana y variante.

Tabla 11: Potencia de neutralización y afinidad de los mAb anti IL-13 humanizados.

mAb	Potencia (CI_{50}), M		Afinidad por hIL-13wt		
	hIL-13wt	hIL-13v	k_{on} (1/M • s)	k_{off} (1/s)	K_D (M)
5G1-Quim	7,69E-11	6,92E-11	9,15E + 05	3,82E-05	4,17E-11
5G1.1	2,90E-11	7,41E-11	7,86E + 05	2,14E-05	2,72E-11
5G1.2	2,95E-11	5,53E-11	8,35E + 05	8,81E-05	1,05E-10
5G1.5	1,14E-10	6,55E-11	8,69E + 05	1,91E-05	2,20E-11
13C5-Quim	1,07E-10	3,70E-11	1,70E + 06	9,65E-05	5,68E-11
13C5.1	8,68E-10	3,69E-10	6,68E + 05	4,74E-04	7,10E-10
13C5.2	1,93E-10	1,30E-10	1,26E + 06	1,23E-04	9,79E-11
13C5.5	1,24E-10	6,90E-11	2,51E + 06	1,76E-04	7,01E-11

Las secuencias de CDR del anticuerpo 13C5.5 humanizado se mutaron adicionalmente utilizando mecanismos conocidos en la técnica, y se generaron tres anticuerpos humanizados adicionales. La capacidad de estos anticuerpos humanizados adicionales para inhibir la actividad de IL-13 humana, de cinomolgo y de rhesus se determinó utilizando el bioanálisis en A-549 como se describe en los Ejemplos 1.1.C. Las afinidades de unión de los anticuerpos humanizados adicionales por IL-13 recombinante humana, de cinomolgo y de rhesus se determinaron utilizando la medición de resonancia de plasmón superficial (Biacore®) como se describe en el Ejemplo 1.1.B. Además de unirse e inhibir la IL-13 humana, estos tres anticuerpos adicionales mostraron una afinidad mejorada por IL-13 de cinomolgo y rhesus. La Tabla 12 muestra valores de CI_{50} de los bioanálisis en A-549, y la Tabla 13 muestra la afinidad de los anticuerpos humanizados adicionales frente a IL-13 humana, de cinomolgo y de rhesus.

Tabla 12: Potencia de neutralización de los mAb anti IL-13 humanizados adicionales

mAb	Potencia (IC_{50} , nM)		
	IL-13 humana	IL-13 de Cinomolgo	IL-13 de Rhesus
13C5.5L2E	0,18	1,20	0,40
13C5.5L3F	0,15	0,46	0,14
13C5.5L2EL3F	0,12	0,48	0,26

Tabla 13: Afinidad de unión de los mAb anti IL-13 humanizados adicionales

mAb	Afinidad (K_{re} , nM)		
	IL-13 humana	IL-13 de Cinomolgo	IL-13 de Rhesus
13C5.5L2E	0,12	0,52	0,29
13C5.5L3F	0,24	0,19	0,11
13C5.5L2EL3F	0,25	0,32	0,13

Ejemplo 2.2.3: Caracterización de anticuerpos anti IL-13 humanizados

5 Los autores de la presente invención han aislado anticuerpos monoclonales que bloquean la unión de IL-13 a IL-13R α 1 y a IL-13R α 2. Tanto el análisis de unión al receptor basado en ELISA como el análisis de unión a IL-13 marcado con 125-I en la superficie celular demostraron que 13C5, tanto versión murina como humanizada (es decir 13C5.5), podían bloquear eficazmente la unión de IL-13 a ambos receptores. Los anticuerpos en el mismo linaje que 13C5, que incluyen 25C8 y 33C3, también pudieron bloquear la unión de IL-13 a ambos receptores.

10 Ejemplo 2.2.3.a: Anticuerpos anti-IL-13 humanizados bloquean la unión de IL-13 al receptor IL-13

15 Para determinar la capacidad del anticuerpo 13C5.5 humanizado para bloquear la unión de IL-13 a los receptores de IL-13 (IL-13R α 1 e IL-13R α 2), se utilizó un análisis de unión al receptor basado en ELISA. Se recubrieron placas de ELISA de 96 pocillos de alta unión con 4 μ g/ml de IL-13Ra1/Fc humano recombinante o IL-13Ra2/Fc (R & D Systems) en tampón de recubrimiento de 100 μ l/pocillo (tampón Carbonato-bicarbonato, Pierce) a 4°C. Después de 20 16 horas, la solución de revestimiento se eliminó golpeando el contenido de la placa en el fregadero, y las placas se lavaron y se bloquearon 4 veces con tampón de bloqueo Superblock (240 μ l/pocillo) (Pierce). El mAb anti-IL-13 humanizado 13c5.5 y los mAb de control (diluidos seriadamente 1:4 a partir de 40 μ g/ml, 50 μ l/pocillo) y Biotina-IL-13 (50 μ l/pocillo, concentraciones finales de 5 nM para hIL-13Ra1/Fc, y 0,5 nM para hIL-13Ra2/Fc) se añadieron y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente (RT). Las placas se lavaron 5 veces con 300 μ l de PBST al 0,1%, y a continuación se añadieron 100 μ l de MAb anti-biotina de ratón diluido 1:5000 (Jackson Immunosciences) y se incubaron a RT durante 45 minutos. Las placas se lavaron de nuevo 5 veces con 300 μ l de PBST al 0,1%, seguido de la adición de reactivo sustrato TMB (100 μ l/pocillo, Pharmingen); se desarrollaron durante 5 minutos, y se detuvieron mediante la adición de 50 μ l de H₂SO₄ 2M (VWR). Las DO a 450 nm se determinaron mediante espectrofotometría. Los resultados se muestran en la Tabla 14.

Adicionalmente, las propiedades de bloqueo del receptor de los mAb humanizados también se evaluaron mediante un análisis de unión al receptor basado en la superficie celular utilizando células COS transfectadas con IL-13R α 2. La IL-13 humana recombinante se marcó con ¹²⁵I (Amersham, Arlington Heights, IL), utilizando el reactivo IODO-GEN (Pierce, Rockford, IL) como se describió previamente (Obiri NI et al., (1995) J Biol Chem. 270:8797-8804). La actividad específica de la IL-13 radiomarcada se estimó en 158 μ Ci/ μ g de proteína. La IL-13 marcada exhibió una bioactividad similar a la IL-13 no marcada, según se evaluó mediante el bioanálisis en A-549. Para los experimentos de unión, las células COS se transfectaron transitoriamente con IL-13Ra2 humana con Lipofectamine 2000 (Invitrogen), y se incubaron durante 48 horas. Se incubaron células COS transfectadas (5 x 10⁵ células en 100 μ l de tampón de unión: RPMI 1640 que contenía albúmina de suero humano al 0,2% y 10 mmoles de HEPES) con ¹²⁵I-IL-13 1,0 nM con o sin IL-13 1 μ M sin marcar a 4°C durante 2 horas. La ¹²⁵I-IL-13 unida a la célula se separó de la ¹²⁵I-IL-13 no unida mediante centrifugación a través de un gradiente oleoso de ftalato, y se determinó la radioactividad con un contador gamma (Wallac, Gaithersburg, MD). Para el análisis de desplazamiento del anticuerpo, las células COS transfectadas se incubaron con 125I-IL-13 (1,0 nM) con o sin concentraciones crecientes (hasta 50 μ g/ml) de anticuerpo 13C5.5 anti-IL-13 humanizado, como se describió anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14: Potencia de los mAb en el bloqueo de la unión de IL-13 (wt) humana a IL-13R α 2 humana en análisis de unión a receptores basados en ELISA y basados en la superficie celular

mAb	Potencia (CI ₅₀ , nM)	
	Superficie celular	ELISA
13C5.5	2,7	1,1
BAK502G9	75,8	34,3
5G1.5	B.P.	B.P.
mAb13.2	B.P.	B.P.

mAb	Potencia (CI ₅₀ , nM)	
	Superficie celular	ELISA
MJ2-7	17,6	19,0

B.P. Bloqueo parcial que no alcanza el 50% de inhibición.

La Tabla 15 muestra la afinidad de unión del anticuerpo 13C5.5 humanizado y otros anticuerpos anti-IL-13.

Tabla 15: Afinidad de unión de mAb anti-IL-13 evaluada por Biacore

mAb	Afinidad (K _D , nM)	
	IL-13 wt humana	Variante de IL-13 humana
13C5.5	0,07	0,05
BAK502G9	2,10	0,17
mAb13.2	0,11	0,20
MJ2-7	1,14	0,79

5 En ensayos de unión al receptor tanto basados en la superficie celular como basados en ELISA, 13C5.5 exhibe una alta potencia en el bloqueo de la unión de IL-13 humana a IL-13Rα2 humano, con una CI₅₀ entre 1 y 3 nM. Si bien tanto BAK502G9 como MJ2-7 también pudieron reducir la señal de unión, sus potencias fueron mucho más bajas que las de 13C5.5 (véase la Tabla 14), al menos parcialmente debido a su menor afinidad por IL-13 de tipo salvaje humana (véase la Tabla 15). El mAb13.2 no fue capaz de inhibir la unión de IL-13 a IL-13Rα2, acorde con su epítipo. Además, 13C5.5 podría alcanzar 100% de inhibición en ambos análisis a una concentración de 100 nM (o 15 ug/ml). A la misma concentración, BAK502G9 y MJ2-7 exhibieron solo 40% y 70% de inhibición, respectivamente, en el análisis de unión al receptor basado en la superficie celular, y ambos exhibieron solo 60% de inhibición en el análisis de unión al receptor basado en ELISA.

15 Para un mAb terapéutico con semivida en suero entre 10 y 20 días en el hombre, la concentración sérica está normalmente entre 5-15 ug/ml, con un régimen de dosificación semanal o quincenal IV o SC de 3 mpk o menos. En base a este cálculo, 13C5.5 es actualmente el único mAb anti-IL-13 que es capaz de bloquear completamente (100%) la unión de IL-13 humana a IL-13Rα2 in vivo como un mAb terapéutico, a una concentración sérica de 100 nM (o 15ug/ml), bajo un régimen de dosificación convencional de un anticuerpo monoclonal.

Ejemplo 2.2.3.b: Unión de anticuerpos anti IL-13 al epítipo específico en IL-13

25 Los epítipos en IL-13 humana que se unen a los mAb anti-IL-13 13C5, 13C5.5, 9C11 y 5G1 se mapearon utilizando una técnica de escisión de epítipo, seguido de análisis de péptidos con espectrometría de masas (MS). En la escisión del epítipo, la proteína se unió primero a un mAb inmovilizado y a continuación se digirió con enzimas proteolíticas. Las regiones del epítipo en la proteína se determinaron utilizando MS y MS/MS para identificar péptidos que contenían epítipos. Se suspendieron esferas de Sefarosa activada con CNBr (Amersham Biosciences, 10 mg/reacción) en 500 µl de HCl 0,1 M y se equilibraron durante 15 minutos. Las esferas se transfirieron a columnas de reacción compactas (USB Corporation) y se lavaron con HCl 0,1 M seguido de tampón de acoplamiento de NaHCO₃ 0,1 M. El mAb (100 µg) se añadió a la suspensión y se incubó durante 2 horas con rotación lenta a temperatura ambiente. Las esferas con el mAb unido covalentemente se lavaron con tampón Tris-HCl 0,1 M ~ pH 8,0. El bloqueo de los grupos sin reaccionar en las esferas de Sefarosa CNBr se llevó a cabo mediante incubación durante 2 h con un tampón Tris-HCl 0,1 M ~ pH 8,0. El mAb no acoplado se eliminó mediante lavado secuencial con dos tampones de pH diferente; 1) acetato de Na 0,1 M, NaCl 0,5 M ~ pH 4,0 tampón y, 2) Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,5 M ~ pH 8,0 tampón. Las esferas se equilibraron en PBS ~ NaCl 0,14 M, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 4,3 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, pH 7,2 y se incubaron durante 2 ha temperatura ambiente, con y sin IL-13. Después de lavar las esferas con PBS ~ pH 7,2, se retiró una alícuota de la suspensión para el análisis MALDI-TOF.

40 La proteína unida por afinidad se digirió con diferentes proteasas (razón enzima:sustrato 1:100-1:20) durante 12 h. Las proteasas utilizadas incluyeron: tripsina, GluC, quimotripsina, carboxipeptidasa Y y aminopeptidasa M. Después de la proteólisis, las esferas se lavaron con 500 µl de tampón de digestión. Los últimos 100 µL de solución de lavado se guardaron como control. Se añadieron aproximadamente 100 ul de TFA al 2% a las esferas y se recogieron. Ambas soluciones de control y de lavado con ácido se concentraron primero a aproximadamente 20 uL bajo vacío. 45 Los péptidos se desalinizaron con pipetas Ziptip C18. Las muestras se analizaron mediante MS MALDI-ToF.

utilizando una estación de trabajo Voyager DE o Voyager DE-Pro. El análisis mediante nano-ESI-LC-MS/MS se realizó en un sistema de HPLC capilar Agilent 1100 interconectado a un sistema Sciex Q-Star Pulsar i MS.

5 Al estudiar los epítomos de 13C5, dos proteasas utilizadas en etapas sucesivas proporcionaron los mejores resultados. Con la quimotripsina, se detectó un péptido principal que consistía en los residuos de aminoácidos 100-130 de SEQ ID NO. 1, lo que indica que puede contener el epítomo o los epítomos. También se detectaron pequeñas cantidades de péptidos de los residuos de aminoácidos 103-130 y 104-130 de SEQ ID NO. 1. Se utilizó aminopeptidasa M después de la digestión con quimotripsina. El péptido principal detectado fue el aminoácido 104-130 de SEQ ID NO. 1, sugiriendo que los 4 residuos de aminoácidos N-terminales (80-83) no eran parte del epítomo.
10 La digestión adicional con carboxipeptidasa Y dio como resultado la pérdida de afinidad. No se observó péptido después de la digestión y el lavado. Todas las secuencias peptídicas se confirmaron utilizando nano-ESI-LC-MS/MS.

15 El mapeo de epítomos de 13C5 y 13C5.5 indicó que su sitio o sitios de unión incluían la región de Hélice D C-terminal de IL-13 humana (residuos VRDTK IEVAQ FVKDL LL HLK KLFRE GR, correspondiente a los aminoácidos 104-130 de SEQ ID NO. 1). Se ha propuesto que la región D de la hélice C-terminal participa en las interacciones con el receptor de IL-13 (Zuegg et al. 2001 Immunol Cell Biol. 79:332-9).

Ejemplo 2.3: Cristalización de anti-IL-13 formando complejo con IL-13.

20 La porción Fab de 13C5.5 se complejó con IL-13 humana y los cristales del complejo se generaron de la siguiente manera.

Ejemplo 2.3.1: Preparación y purificación del fragmento Fab 13C5.5.

25 Para preparar el fragmento 13C5.5 Fab, se concentró primero IgG 13C5.5 en tampón PBS 0,15 M a 2 mg/ml utilizando un dispositivo de filtro centrífugo Ultracoree-15 Biomax de corte de peso molecular de 10 kDa (MWCO) (Millipore). La suspensión de gel de papaína (Pierce) se prelavó y se cargó en 2-3X con Tampón A (Na₂HPO₄, 20 mM, EDTA 10 mM, cisteína 20 mM) a una razón en volumen de 1:1. El anticuerpo concentrado se mezcló a continuación con una suspensión espesa de gel de papaína al 50% y se incubó a 37°C durante 24 horas con sacudimiento vigoroso. La mezcla de anticuerpo/suspensión se centrifugó (Beckman 6KR) y el sobrenadante se cargó en una Superdex 75 preequilibrada con PBS. Se eluyó un pico principal y se reunieron las proteínas. Se preparó una columna de afinidad Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia) de Proteína A de 25 ml lavando con 100 ml de PBS. Los fragmentos de anticuerpo reunidos se aplicaron a la columna de afinidad (velocidad de flujo de 2 ml/min). Se recogieron fracciones que contenían los fragmentos Fab 13C5.5 (verificado por absorbancia UV a 280 nm) en el flujo continuo. Las fracciones que contenían una concentración de fragmento Fab 13C5.5 mayor que 0,3 mg/ml (determinada por absorbancia UV a 280 nm) se agruparon y congelaron a -80°C. La pureza de la muestra se evaluó con SDS-PAGE.
30
35

40 Ejemplo 2.3.2: Preparación del complejo Fab IL-13/13C5.5.

45 La IL-13 humana recombinante se expresó en un sistema de expresión de mamífero y posteriormente se purificó utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica. La proteína recombinante IL-13 humana y la proteína Fab 13C5.5 se mezclaron a una razón molar de 1:1 y se incubaron durante 1 hora a 4°C. La muestra de complejo se cargó en una columna Superdex 200 equilibrada previamente (Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM) a 0,5 ml/min. El complejo se mezcló y se concentró a 24 mg/ml utilizando un dispositivo de filtro centrífugo Ultracoree-15 Biomax de corte de peso molecular de 10 kDa (MWCO) (Millipore) y se congeló a -80°C. La pureza de la muestra se evaluó con SDS-PAGE.

50 Ejemplo 2.3.3: Cristalización del complejo Fab IL-13/13C5.5

La provisión de partida de complejo IL-13/13C5.5 congelado (-24 mg/ml) se descongeló en hielo. El complejo (1,0 µL) se mezcló con 1,0 µL de solución de reservorio (sulfato de amonio 1,75 M, MES 100 mM, pH 6,5, CaCl₂ 10 mM). La gota resultante se mezcló en un pocillo de gota sentada (placa de gota sentada CrysChem) sobre el reservorio a aproximadamente 18°C. Aparecieron cristales de tipo rombo en el plazo de una semana.
55

Ejemplo 2.3.4: Crioprotección y Enfriamiento Ultrarrápido de Cristales Complejos de Fab IL-13/13C5.5

60 Los cristales del complejo Fab IL-13/13C5.5 se recogieron utilizando un lazo de fibra en las aguas madre + glicerol al 20%. Posteriormente, los cristales se sometieron a enfriamiento ultrarrápido sumergiéndolos en nitrógeno líquido.

Ejemplo 2.3.5: Recopilación de Datos de Difracción de Rayos X del Complejo Fab IL-13/13C5.5

Los datos de difracción de rayos X de los cristales de Fab IL-13/13C5.5 se recogieron en el haz de luz IMCA en Advanced Photon Source en Argonne, IL. Los cristales se mantuvieron a una temperatura de $-173,15^{\circ}\text{C}$ con un refrigerador Oxford Cryosystems Cryostream durante la recopilación de datos. Se recolectó un total de 180 cuadros en un rango de oscilación de $1,0^{\circ}$. Los datos se procesaron con el conjunto de programas HKL2000 (Otwinowski y Minor, 1997). Después de determinar la orientación del cristal, los datos se integraron con DENZO y se ajustaron y se fusionaron con SCALEPACK, y se colocaron en una escala absoluta y se redujeron a amplitudes de factor de estructura con TRUNCATE (French y Wilson, 1978). Cinco por ciento de las reflexiones únicas se asignaron, de forma aleatoria, al conjunto "libre", para el cálculo del factor R libre (R_{free}) (Brünger, 1992); 95% restante de las reflexiones constituía el conjunto "funcional", para el cálculo del factor R (R). Los datos de difracción de rayos X se resumen en la Tabla 16. Las siguientes listas indexan para la forma cristalina: (1) Fab IL-13/13C5.5: grupo espacial P2(1)2(1)2(1), a = 163,578 Å, b = 163,318 Å, c = 228,627 Å, $\alpha = 90,0^{\circ}$, $\beta = 90,0^{\circ}$, $\gamma = 90,0^{\circ}$. La Tabla 17 enumera las estadísticas de difracción de rayos para el conjunto de datos.

Tabla 16: Resumen de la información de la célula unitaria cristalográfica del complejo Fab IL-13/13C5.5

Cristal	Grupo espacial	a	b	c
		(Å)	(Å)	(Å)
1	P2 (1) 2 (1) 2 (1)	163,578	163,318	228,627

Tabla 17: Resumen de Estadísticas de Datos de Difracción de Rayos X para el Complejo Fab IL-13/13C5.5.

Cristal	Grupo espacial	Resolución (Å)	Reflexiones únicas	R _{sym} (%)*	Cobertura (%)*	Multiplicidad *
1	P2(1)2(1)2(1)	47,1-2,60	188.937	0,085 (0,562)	100,0 (100,0)	7,3 (7,3)

* Envoltura de mayor resolución entre paréntesis.

Ejemplo 2.3.6: Solución de Reemplazo Molecular y Refinamiento de la Estructura Cristalina del Complejo Fab IL-13/13C5.5

Se determinó una solución de reemplazo molecular de máxima verosimilitud utilizando el programa PHASER (Read, 2001). Se resolvieron un total de seis monómeros de 13C5.5 con una resolución de 3,0 Å en el grupo espacial P2(1)2(1)2(1). El modelo de búsqueda fue la estructura cristalina de Fab referida previamente (entrada 1BJ1 del Banco de Datos de Proteínas, Muller et al., 1998). Las coordenadas se generaron en base a la solución de reemplazo molecular.

El refinamiento de la estructura cristalina del complejo Fab IL-13/13C5.5 comenzó con las coordenadas de la solución de reemplazo molecular, descritas anteriormente, en el grupo espacial P2(1)2(1)2(1). El refinamiento comenzó a utilizar el refinamiento del cuerpo rígido mediante el programa REFMAC disponible en el conjunto de programas CCP4 (Murshudov et al., 1997, Collaborative Computational Project, 1994), lo que dio como resultado las siguientes estadísticas a 2,6 Å: R de 40,00% (R_{free} 39,00%). Se observó la densidad de electrones de IL-13 de novo. La construcción manual de seis monómeros de IL-13 fue guiada por la estructura de RMN IL-13 pública 1IJZ (Moy et al., 2001) utilizando el programa O de gráficos moleculares (Jones et al., 1991) y el examen de mapas de densidad de electrones 2Fo-Fc y Fo-Fc. El programa de refinamiento REFMAC (Murshudov et al., 1997) se utilizó para rondas iterativas de refinamiento restringido, dando como resultado las siguientes estadísticas: R de 25,8% (R_{free} 30,5%). Los resultados se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18: Resumen de las Estadísticas de Refinamiento Cristalográfico de Complejo Fab IL-13/13C5.5.

Cristal	Resolución	R _{free}	R
	(Å)	(%)	(%)
1	10,0-1,50	30,5	25,8

Ejemplo 2.3.6: Estructura del Complejo Fab IL-13/13C5.5

Se observan contactos extensos entre IL-13 humana y múltiples CDR 13C5.5. El área de superficie oculta en la interfase anticuerpo-antígeno es de $1415,50 \text{ \AA}^2$. Los contactos están compuestos de enlaces de hidrógeno críticos e interacciones hidrófobas que estabilizan la interfase. Los dos segmentos de secuencia mínima que comprenden la mayoría de los contactos de la interfase se encuentran en las hélices A y D de IL-13 (para la estructura de IL-13, véase la Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 2003-0013851 A1 incorporada a la presente memoria

como referencia). Estos contactos activan las CDR L1 y L3, y H2 y H3. En base a lo anterior, el rango de unión del epítipo 13C5.5 comprende la región topográfica definida por Ser26-Asn38, Lys123-Arg130 de SEQ ID NO. 1. Más preferiblemente, el rango de unión del epítipo 13C5.5 comprende la región topográfica definida por Arg30-Asn38, Lys123-Arg127 de SEQ ID NO. 1.

5

Ejemplo 2.4: Eficacia in vivo de anticuerpos IL-13 humanizados

La eficacia in vivo de los anticuerpos anti-hIL-13 se evaluó de la siguiente manera.

10 Ejemplo 2.4.1: Eficacia in vivo de los anticuerpos para IL-13 humanizados en el modelo de asma inducido por IL-13 humana.

La eficacia de los anticuerpos anti-hIL-13 5G1, 13C5 y 13C5.5 se sometió a ensayo en un modelo de asma inducido por IL-13 humana en ratones. Los ratones se expusieron a IL-13 humana recombinante a una dosis de 1 µg en 50 µl de PBS estéril, administrados a la tráquea con un microaspirador utilizando un laringoscopio de roedor para visualizar la abertura traqueal. Se administró un total de 2 dosis de IL-13 los días 1 y 2 del estudio y se midieron la hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR; Hoymann, H.G.; J Pharmacol Toxicol Methods. 2007 enero-febrero; 55(1):16-26), así como la moco, la quitinasa ácida de mamíferos (AMCasa, Donnelly LE, Barnes PJ., 1: Trends Pharmacol Sci. 2004 Oct; 25 (10):509-11) y la quimiocina regulada por el timo y la activación (TARC; Bisset LR, Schmid-Grendelmeier P., Curr Opin Pulm Med. 2005 ene; 11(1):35-42) en el fluido de lavado broncoalveolar 24 horas después de la sensibilización final. Las dosis de anticuerpo de 100, 300 y 1000 µg se administraron mediante inyección intraperitoneal 1 día antes de la primera sensibilización con IL-13 y los resultados se resumen en la Tabla 19. El anticuerpo 5G1, que no bloquea la unión de IL-13 a IL-13Rα1 o a IL-13Rα2, no fue capaz de neutralizar la bioactividad de IL-13 en este modelo in vivo detectándose niveles comparables de AHR, AMCasa y Muc5ac en animales tratados con 5G1 en comparación con animales de control tratados con PBS. Por el contrario, el anticuerpo 13C5 que bloquea la unión a los receptores α1 y α2 fue eficaz para reducir todos los parámetros. El tratamiento con IL-13 aumentó la resistencia de las vías respiratorias de 3,6 cm H₂O/ml/seg a 5,7 cm H₂O/ml/seg. El tratamiento con 13C5 (1000 µg) redujo la resistencia de las vías respiratorias a 4,3 cm H₂O/ml/seg. La hipersecreción de moco medida por los niveles de muc5ac disminuyó de 356,5 unidades a un máximo de 211 U con un tratamiento de anticuerpos correspondiente a una reducción de 40%. De forma similar, los niveles de AMCasa se redujeron de 202 U a 68 U, lo que corresponde a una reducción de 66% observándose una reducción comparable en los niveles de TARC (n = 10, p <0,05, todas las dosis). El anticuerpo humanizado recombinante 13C5.5 demostró resultados similares en este modelo. La IL-13 indujo un aumento en la resistencia de las vías respiratorias después de la sensibilización con 30 µg/ml de metacolina de 3,9 a 5,5 cm H₂O/ml/seg. El anticuerpo 13C5.5 inhibió la resistencia de las vías respiratorias a 4,1, 4,45 y 4,3 cm H₂O/ml/seg a dosis de 100, 300 y 1000 µg, respectivamente. La hipersecreción de moco medida por los niveles de muc5ac se redujo de 247 U inducidos por tratamiento con IL-13 a 154, 30,2 y 11,1 U a dosis de 100, 300 y 1000 µg de tratamiento con anticuerpo, respectivamente. Esto representa una inhibición de 38, 88 y 96% de la producción de moco con este anticuerpo. El tratamiento con IL-13 indujo actividad AMCasa de 130 U que se redujo a 113, 98 y 55 U mediante tratamiento con anticuerpos (dosis de 100, 300 y 1000 µg) que representaban una inhibición de 14, 24 y 68%. Estos datos demuestran que 13C5 y el anticuerpo humanizado recombinante 13C5.5 que bloquean la unión de IL-13 a IL-13Rα1 y α2 pueden neutralizar las respuestas inducidas por IL-13 de producción de AHR, moco y de AMCasa en el pulmón, mientras que los anticuerpos que no bloquean la unión de IL-13 a los receptores α1 y α2 no son eficaces para bloquear todas estas respuestas biológicas.

Tabla 19: Eficacia de los anticuerpos anti-IL-13 humana en el modelo de asma inducido por IL-13.

Anticuerpo	Dosis	AHR		Moco		AMCasa		TARC	
		Resistencia (ETM)	% de Inhibición	Unidades Muc5ac (ETM)	% de Inhibición	unidades arbitrarias (ETM)	% de Inhibición	pg/ml (ETM)	% de Inhibición
5G1	0	5,7 (0,38)	-0-	258 (37,2)	-0-	314,9 (26,1)	-0-	63,2 (14)	-0-
	100			315 (61)	-0-	225,2 (17,1)	9	111 (34,5)	-0-
	300			367,2 (63,2)	-0-	277(21,3)	12	94,1 (24,2)	-0-
	1000	5,3 (0,35)	7	345,9 (61,6)	-0-	255,1 (18,6)	19	90,2 (17,1)	-0-

Anticuerpo	Dosis	AHR		Moco		AMCasa		TARC	
		Resistencia (ETM)	% de Inhibición	Unidades Muc5ac (ETM)	% de Inhibición	unidades arbitrarias (ETM)	% de Inhibición	pg/ml (ETM)	% de Inhibición
13C5	0	5,7 (0,38)		356,5 (15,8)	-0-	202,2 (18,8)	-0-	91,7 (41,7)	-0-
	100			246 (30,6)	31	146,6 (17,9)**	28	36 (10,3)	61
	300			243,2 (36,7)	32	97,2 (10,8)**	52	23,3 (4,1)	75
	1000	4,3 (0,77)*		211,6 (28)***	41	68,3 (9,2)***	66	34,4 (12,1)	62
13C5,5	0	5,54 (0,53)	-0-	247,1 (96,4)	-0-	130,4 (20,6)	-0-	NT	
	100	4,16 (0,29)*	89	153,8 (67,6)	38	113,4 (18)	13	NT	
	300	4,45 (0,41)*	70	30,2 (15,2)**	88	98,9 (10,6)	24	NT	
	1000	4,3 (0,27)*	79	11,1 (5,8)***	96	55,5 (6,4)***	57	NT	

* p <0.05, Prueba T de Student

** p <0.05, ANOVA, de Bonferroni

*** p <0.01, ANOVA, de Bonferroni

En otro estudio, se comparó la eficacia de los anticuerpos anti-hIL-13 BAK502G9, MJ2-7 y 13C5.5 en el modelo de asma inducido por IL-13 humana en ratones. Los ratones se expusieron a IL-13 humana recombinante a una dosis de 1 µg en 50 µl de PBS estéril, administrados por vía intranasal bajo sedación ligera. Se administró un total de 2 dosis de IL-13 los días 1 y 2 del estudio y se midió la hiperreactividad de las vías respiratorias, así como el moco y la AMCasa, en el fluido de lavado broncoalveolar 24 horas después de la sensibilización final. Las dosis de anticuerpo de 1000 µg se administraron por inyección intraperitoneal 1 día antes de la primera sensibilización con IL-13. Los resultados del estudio se resumen en la Tabla 20. El anticuerpo 13C5.5, que bloquea la unión de IL-13 a ambos receptores IL-13 α1 y α2, fue eficaz para reducir significativamente todos los parámetros. El tratamiento con IL-13 aumentó la resistencia de las vías respiratorias después de la sensibilización con metacolina 30 mg/ml de 4,2 cm H₂O/ml/seg a 7,2 cm H₂O/ml/seg. El tratamiento con 13C5.5 (1000 µg) redujo la resistencia de las vías respiratorias en 86,8% a 4,6 cm H₂O/ml/seg. La hipersecreción de moco medida por los niveles de muc5ac disminuyó de 768,2 unidades a 412,9 U con el tratamiento de anticuerpos correspondiente a una reducción de 58,8%. De forma similar, los niveles de AMCasa se redujeron de 316,5 U a 147 U, lo que corresponde a una reducción de 52% (n = 10, p <0,001). Ambos anticuerpos BAK502G9 y MJ2-7, que inhiben la unión de IL-13 a IL-13Rα1 pero no inhiben eficazmente la unión de IL-13 a IL-13Rα2, demostraron una capacidad comparable para neutralizar la AHR inducida por IL-13 en este modelo. Los anticuerpos BAK502G9 y MJ2-7 solo inhibieron la resistencia de las vías respiratorias de 7,2 a 5,96 cm H₂O/ml/seg y 5,93 cm H₂O/ml/seg respectivamente, lo que representa una reducción del 42% y 41,5% en AHR. La hipersecreción de moco medida por los niveles de muc5ac se redujo de 768,2 U inducida por tratamiento con IL-13 a 627,8 y 380 U a dosis de 1000 µg de anticuerpo correspondientes a una inhibición del 23% y 64% por BAK502G9 o los anticuerpos MJ2-7 respectivamente. El anticuerpo BAK502G9 fue menos eficaz para inhibir la AMCasa en comparación con los anticuerpos 13C5.5 o MJ2-7. El tratamiento con IL-13 indujo una actividad de AMCasa de 316,5 U que se redujo a 279 y 169 U mediante el tratamiento con anticuerpo BAK502G9 o MJ2-7 (dosis de 1000 µg) que representa una inhibición de 8% y de 45%, respectivamente. Estos datos demuestran que el anticuerpo 13C5.5 humanizado recombinante que bloquea la unión de IL-13 a IL-13Rα1 y α2 es más eficaz para neutralizar las respuestas inducidas por IL-13 de producción de AHR, moco y AMCasa en el pulmón, mientras que los anticuerpos que bloquean la unión de IL-13 al receptor IL-13 α2 con menor afinidad no es tan eficaz para bloquear estas respuestas biológicas que contribuyen a la patogénesis del asma.

Tabla 20: Comparación de los anticuerpos 13C5.5, BAK502G9 y MJ2-7 en el modelo de asma inducido por IL-13.

Anticuerpo	Dosis (µg)	AHR		Moco		AMCasa	
		Resistencia (ETM)	% de Inhibición	Unidades Muc5ac (ETM)	% de Inhibición	unidades arbitrarias (ETM)	% de Inhibición
PBS	0	7,2(0,77)	-0-	768,2(108)	-0-	316,5(43)	-0-
13C5.5	1000	4,6(0,3)	86,8	412,9(77,3)	46	147(27)	54
BAK502G9	1000	5,9(0,38)	41,7	627,8(59,7)	18	279,4(28,5)	12
MJ2-7	1000	5,9 (0,67)	42,5	380(48,5)	50,5	169(20)	47

Ejemplo 2.4.2: Eficacia in vivo de los anticuerpos contra IL-13 en un modelo de ratón con asma inducido por OVA

5 Para determinar si las propiedades de bloqueo del receptor (particularmente con respecto a IL-13Rα2) afectan la eficacia in vivo de los mAb en modelos de asma de ratón, se generó un panel de anticuerpos anti-IL-13 de ratón de rata que mostraban diferentes propiedades de bloqueo del receptor, según se determina mediante ELISA de unión a receptor utilizando las proteínas mIL-13Rα1/Fc y mIL-13Rα2/Fc (R & D Systems) (véase la Tabla 21). Puesto que el mAb anti-hIL-13 3H7 reacciona de forma cruzada con IL-13 de ratón, sus propiedades anti-mIL-13 también se incluyen en la Tabla 21. Las afinidades de unión de los anticuerpos para IL-13 de ratón se midieron utilizando un análisis BIACORE contra IL-13 de ratón recombinante (R & D Systems), y las potencias (CI50) de los anticuerpos contra IL-13 de ratón se determinaron mediante bioanálisis de A-549 frente a IL-13 de ratón recombinante. Las secuencias de dominio variable de 51D9 y 48D3 se muestran en la Tabla 22.

Tabla 21. Caracterización de anticuerpos monoclonales anti-mIL-13

Clon	Isotipo	K _D (M)	CI ₅₀ (M)	Bloquea la unión de IL-13 de ratón a	
				mIL-13Rα1	mIL-13Rα2
3H7	IgG1 de ratón	1,12E-08	2,43E-9	Sí	Sí
51D9	IgG1k de rata	1,45E-10	3,43E-10	Sí	Sí
48D3	IgG1k de rata	1,05E-10	4,91E-11	Sí	No
53F5	IgG1k de rata	2,82E-10	2,89E-10	No	No
74H2	IgG2ak de rata	3,92E-10	9,76E-10	No	No
25C7	IgG2aλ de rata	4,22E-10	6,09E-10	Sí	Sí
54D1	IgG1k de rata	3,40E-11	2,40E-11	Sí	Sí

Tabla 22. Lista de secuencias de aminoácidos de regiones VH y VL de mAb anti-mIL-13 de rata

SEQ ID NO.	Región de la proteína	Secuencia
		123456789012345678901234567890
86	VH 51D9	<p>QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKASGYTFT DYAMHWVKQAPGKGLKMAWINTYTGKPTY ADDFKGRFVFSLEASASTATLQISNLKNE TATYFCARAGRTEGTHYAMDAWGQGTSVT VSS</p>
87	VL 51D9	<p>DIVLTQSPVLAIVSLGQRATISCRASQSVSI SSSDLMHWYQRRPGHQPKLLIYRTSNLVSG IPARFSGSGSGTDFTLTIDPVQADDIAAYY CQGRESPWTFGGGTKLELKR</p>
88	VH 48D3	

SEQ ID NO.	Región de la proteína	Secuencia
		EVQLVESGGDLVQPGRSLKLSAASGFTFS DYYMAWVRQAPT KGLEWVAS ISNDGISTYY RDSVKGRFT ISREKAKSSLYLQMDLSRSED TATYYCTT WNWVFGFFDY WVGQVMVTVSA
89	VL 48D3	DIVLTQSPALAVSLGQRATISCRASQSVTI SRYNRMHWYQQR PGQP PKLLIYRSSYLASG IPARFSGSGSGTDFTLTIYPVQADDIATYY CQQNRESPWTF GGG TKLELNR

5 Para el estudio de eficacia *in vivo* en un modelo de asma murina, se adquirieron animales (ratones hembra Balb/c de Taconic, alojados en Abbott Bioresearch Center, y se utilizaron a las 8-12 semanas de edad. Todos los protocolos fueron aprobados por el IACUC. Los ratones se sensibilizaron a OVA (Sigma, la endotoxina se eliminó de la ovoalbúmina utilizando DetoxiGel (Pierce) de acuerdo con el protocolo del fabricante y el material final contenía menos de 0,1 UE/mg de proteína) el día 0 y 7 con una inyección intraperitoneal de 8 ug de OVA en 2 mg de alumbre (Pierce). Los días 14 y 16, los animales recibieron una sensibilización intranasal de 0,3 mg de OVA en 50 ml de PBS estéril. Los anticuerpos 51D9 y 48D3 (purificados del sobrenadante de clones de hibridoma 51D9 y 48D3 de acuerdo con procedimientos convencionales, que contenían menos de 0,1 UE/mg de proteína y negativos para patógenos de roedores mediante prueba de PCR) se administraron el día 13 como una única inyección intraperitoneal en PBS estéril. Se administró dexametasona (Sigma) por vía oral una vez al día los días 13-17 a una dosis de 3 mg/kg. Todos los criterios de valoración se analizaron el día 17, 24 horas después de la segunda sensibilización con OVA. La hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR) se evaluó utilizando pletismografía de cuerpo entero. Brevemente, se indujo un plano quirúrgico de anestesia con una inyección intraperitoneal de ketamina y xilazina. Se insertó una cánula traqueal quirúrgicamente entre el 3^{er} y 4^o anillos traqueales. La respiración espontánea se previno mediante inyección intravenosa en la yugular de bromuro de pancuronio y los animales se colocaron en un pletismógrafo de cuerpo entero (Buxco) y se ventilaron mecánicamente con 0,2 ml de aire ambiental a 150 respiraciones por minuto con un ventilador de volumen controlado (Harvard Apparatus). La presión en el pulmón y el flujo dentro del pletismógrafo se midieron utilizando transductores y la resistencia pulmonar se calculó como presión/flujo utilizando el soporte lógico Biosystem Xa. También se midió la resistencia basal, como la resistencia después de la sensibilización con metacolina (3, 10 y 30 mg/ml) que se suministró con un nebulizador ultrasónico en línea. Una vez completada la prueba de función pulmonar, los pulmones se lavaron 4 veces con 0,5 ml de PBS estéril. El fluido de lavado se analizó para TARC, AMCasa y producto infiltrado celular. El suero se recogió para la cuantificación de los niveles de anticuerpos al final del estudio.

Los niveles de TARC murina se determinaron mediante ELISA (R & D) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se determinó la actividad de AMCasa en fluido de lavado broncoalveolar (BAL) (dilución 1 a 10 con BSA al 0,01%, citrato sódico 30 mM, fosfato sódico 60 mM, pH 5,2 en presencia de 4-metilumbeliferil β -DN,N'-diacetil-quitobiósido 80 μ M. Las reacciones se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y se sofocaron mediante la adición de 100 μ L de glicina/NaOH 1 M, pH 10,6. La formación del producto se determinó mediante emisión de fluorescencia a 460 nm utilizando excitación a 385 nm en un fluorómetro Fluoroskan Ascent. Para evaluar la hiperplasia de las células de Goblet, los pulmones se inflaron con formalina tamponada neutro al 10% a 22 cm de altura durante 15 minutos para lograr un área consistente de la superficie del pulmón. Las secciones se incluyeron en parafina, se seccionaron y se tiñeron con ácido peryódico de Schiff (PAS). El área de células positivas a lo largo del bronquio principal del pulmón izquierdo se cuantificó utilizando el soporte lógico ImagePro Plus. Los niveles de Muc5ac se determinaron mediante ELISA. Se recubrió una placa de 96 pocillos con fluido BAL, se secó durante la noche y después se añadió un anticuerpo anti-Muc5ac biotinilado y se detectó con estreptavidina conjugada con HRP, seguido de escisión del sustrato colorimétrico TMB.

La contribución relativa de IL-13R α 1 y α 2 a la patogénesis del asma se sometió a ensayo en un modelo convencional de asma inducida por ovoalbúmina en ratones. Los anticuerpos que bloquearon la unión de IL-13 tanto al receptor α 1 como al receptor α 2 (51D9, 54D1 y 3H7 con potencias de 340, 24 y 2430 pM respectivamente) así como a un anticuerpo que bloqueó la unión de IL-13 solamente al receptor α 1 (48D3, potencia de 50 pM) se sometieron a ensayo tratando los animales con los anticuerpos un día antes de las sensibilizaciones locales con ovoalbúmina y los resultados se presentan en la Tabla 23. La sensibilización con OVA indujo aumentos en la resistencia pulmonar después de la sensibilización con metacolina, hipersecreción de moco medida por aumento de los niveles de Muc5ac en el líquido BAL, así como aumento de la tinción PAS positiva de las células epiteliales

mediante evaluación histológica, infiltración pulmonar con eosinófilos y células T y producción de proteínas relacionadas con el asma AMCasa y TARC.

5 Los anticuerpos que bloquearon la unión de IL-13 tanto a IL-13R α 1 como α 2 demostraron eficacia y la potencia in vivo de los reactivos cambió de acuerdo con su potencia medida in vitro. 51D9 se sometió a ensayo a dosis de 100, 300 y 1000 μ g/ratón. El tratamiento con OVA causó un aumento en la resistencia de las vías respiratorias después de la sensibilización con metacolina de 30 mg/ml a 6,2 cm H₂O/ml/seg en comparación con 3,6 cm H₂O/ml/seg en animales no asmáticos. El tratamiento de ratones con 51D9 evitó por completo el aumento de la resistencia pulmonar con valores comparables a los observados en animales control no asmáticos de 4,1, 4,0 y 3,5 cm H₂O/ml/seg para dosis de 100, 300 y 1000 μ g, respectivamente (n = 8-10/grupo; p <0,05). La cantidad de inhibición observada con 51D9 fue comparable a la lograda con el tratamiento con esteroides (3,3 cm H₂O/ml/seg). El tratamiento con 51D9 también inhibió de manera dependiente de la dosis la hipersecreción de moco desde 404 unidades de Muc5ac hasta 55 U en animales tratados con 1000 μ g de 51D9. La inhibición de la hipersecreción de moco también se observó por evaluación histológica de células epiteliales reactivas a PAS. El área de porcentaje de células positivas se redujo de 1,0% a 0,6% y 0,5% con 300 y 1000 μ g de dosis de anticuerpo 51D9, respectivamente, lo que representa una disminución de 47-65% (n = 8, p <0,01). El tratamiento con 51D9 también inhibió TARC y AMCasa. La sensibilización con OVA indujo 61 pg/ml de TARC que se redujo a 7,8 pg/ml con 1000 μ g de tratamiento con 51D9 (n = 10, p <0,05). La sensibilización con OVA indujo 96 unidades arbitrarias de actividad AMCasa que se redujo de forma dependiente de la dosis con 51D9 a 52, 45 y 21 U con 100, 300 y 1000 μ g de anticuerpo, respectivamente (n = 9-10, p <0,01). 54D1 que tiene una potencia in vitro 10 veces mayor (24 pM) demostró la inhibición de AHR a la dosis de 30 μ g con una reducción de la resistencia de las vías respiratorias desde 6,58 cm H₂O/ml/seg a 4,4 cm H₂O/ml/seg y una inhibición máxima observada con el tratamiento con 300 μ g de anticuerpo para reducir la resistencia de las vías respiratorias a un valor de 3,65 cm H₂O/ml/seg. Se observó una potencia similar en la inhibición de la producción de moco, AMCasa y TARC. Un tercer anticuerpo 3H7, que tenía una potencia de 2,5 nM, todavía demostró una inhibición de AHR, moco y niveles de AMCasa, pero solo a una dosis de 1000 μ g de tratamiento con anticuerpo compatible con un cambio de 10 veces en la potencia descrita en bioanálisis *in vitro*.

30 La eficacia de los anticuerpos que bloquean la unión de IL-13 solamente a IL-13R α 1 se sometió a ensayo con el anticuerpo 48D3. Los animales se trataron con 30, 100, 300 y 1000 μ g/ratón. La sensibilización con OVA indujo un aumento en la resistencia de las vías respiratorias a 5,69 cm H₂O/ml/seg en comparación con 4,1 cm H₂O/ml/s en animales tratados con PBS no asmáticos. El tratamiento con 30 μ g de 48D3 no tuvo efecto sobre la resistencia pulmonar inducida por OVA, mientras que el tratamiento con 100, 300 y 1000 μ g de 48D3 inhibió los cambios inducidos por OVA en la resistencia pulmonar a un máximo de 4,4 cm H₂O/ml/seg o hasta ~ 80% de los niveles de control de OVA (n = 10, p <0,05). En contraste con los efectos observados con 51D9, 48D3 no inhibió la hipersecreción de moco inducida por OVA, medida por ELISA para Muc5ac o células epiteliales reactivas a PAS. Se observó una reducción leve pero estadísticamente significativa en el moco (30%) con el tratamiento con 48D3 a la dosis de 30 μ g, mientras que todas las demás dosis fueron equivalentes a los animales expuestos a OVA. La cuantificación histológica de la tinción positiva a PAS demostró 0,6% en animales expuestos a OVA frente a 0,8% en animales expuestos a OVA y tratados con 1000 μ g de 48D3. En estos estudios, 48D3 inhibió la expresión de AMCasa inducida por OVA desde 196 U detectada en animales tratados con OVA a 63, 90, 87 y 96 U a dosis de 30, 100, 300 y 1000 μ g, respectivamente. El análisis de los niveles de anticuerpos indicó que se podían detectar niveles comparables de 48D3 y 51D9 tanto en el suero como en el fluido BAL de ratones tratados con anticuerpos. A pesar de la potencia 7 veces mayor del anticuerpo 48D3 en comparación con el anticuerpo 51D9 y la exposición equivalente de los dos anticuerpos, el anticuerpo 48D3 no fue capaz de inhibir AHR o AMCasa en la misma medida que el anticuerpo que bloqueó la unión de IL-13 a IL-13R α 1 y α 2 y no fue capaz de atenuar la producción de moco. En conjunto, estos datos sugieren que IL-13R α 2 desempeña un papel central en la mediación de la hipersecreción de moco inducida por OVA y que IL-13R α 2 contribuye a la regulación in vivo del fenotipo asmático.

Tabla 23: Eficacia de anticuerpos anti-IL-13 de ratón en modelo murino de asma inducida por ovoalbúmina.

Anticuerpo	Dosis	AHR		Moco		AMCasa		TARC	
		Resistencia	% De inhibición	Unidades Muc5ac	% de inhibición	Unidades arbitrarias	% de inhibición	pg/ml	% de inhibición
54D1	0	6,585 (.89)	-0-	573 (96,2)	-0-	112,1 (19,3)	-0-	141 (43,2)	-0-
	30	4,486 (0,3)*	34	203 (22)*	65	30,8 (4,8)*	72,5	38,3 (10,6)*	63
	100	4,2 (0,32)*	37	153 (44)*	74	14,4 (2,7)*	87,3	23,8(7,3)*	83
	300	3,65 (0,22)*	45	77,3 (6,9)*	87	11,0 (1,5)*	90,2	17,2 (4,5)*	88

ES 2 661 032 T3

Anticuerpo	Dosis	AHR		Moco		AMCasa		TARC	
		Resistencia	% De inhibición	Unidades Muc5ac	% de inhibición	Unidades arbitrarias	% de inhibición	pg/ml	% de inhibición
	1000	3,58 (0,34)*	46	79 (8,5)*	87	10,4 (1,2)*	90,1	20 (12,3)*	86
51D9	0	6,24 (1,4)	-0-	409,2 (36,4)	-0-	97,6 (11)	-0-	61,8 (12,1)*	-0-
	100	4,13 (0,91)*	33,8	188,8 (24,8)*	54	52,9 (10,9)*	46	25,2 (12,8)*	60
	300	4,06 (0,32)*	34,8	180,8 (32,4)*	56	45,8 (13,7)*	53	23,1 (12,9)*	62
	1000	3,57 (0,78)*	43	55,1 (23,4)*	87	21,2 (7,8)*	79	7,8 (4,2)*	87
3H7	0	7,9 (1,2)	-0-	965 (59,9)	-0-	129,7(17,2)	-0-	173,9 (32,0)	-0-
	1000	6,02 (0,31)*	24	587 (48,4)*	40	78,18 (12,3)*	40	77,3 (18,5)*	56
48D3	0	5,69 (0,42)	-0-	666,7 (74,7)	-0-	196,6 (35,5)	-0-	NT	
	30	5,288 (0,43)	8,1	445,4 (33,8)*	34	63,1 (18,2)*	68	NT	
	100	4,5 (0,42)*	19,5	567,5 (62,6)	15	90,4 (15,4)*	54	NT	
	300	5,25 (0,42)	14,1	606,3 (71,2)	9	87,4 (19,6)*	55	NT	
	1000	4,4 (0,33)*	20,7	534,9 (31)	20	96,5 (10,4)*	51	NT	

* denota p <0,05, ANOVA

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Abbott Laboratories, Inc.
Wu, Chengbin

5 <120> Proteínas de unión a la interleucina-13

<130> 8370 US P1

10 <160> 94

<170> PatentIn versión 3.4

15 <210> 1
<211> 132
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1
Met Ala Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly
1 5 10 15
Phe Ala Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu
20 25 30
Ile Glu Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys
35 40 45
Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys
50 55 60
Ala Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu
65 70 75 80
Lys Thr Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala
85 90 95
Gly Gln Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala
100 105 110
Gln Phe Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu
115 120 125

20 Gly Arg Phe Asn
130

<210> 2
<211> 330
<212> PRT
25 <213> Homo sapiens

<400> 2
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Phe Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

ES 2 661 032 T3

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

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

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

ES 2 661 032 T3

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 3

<211> 330

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

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

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

10

ES 2 661 032 T3

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 4
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 4
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 1 5 10 15
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 20 25 30
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 35 40 45
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 65 70 75 80
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 85 90 95
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

10

<210> 5
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

ES 2 661 032 T3

<400> 5

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

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

- 5 <210> 6
- <211> 30
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 6

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

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

- <210> 7
- <211> 14
- <212> PRT
- 15 <213> Homo sapiens

<400> 7

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

- 20 <210> 8
- <211> 32
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

25 <400> 8

Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

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

- 30 <210> 9
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

ES 2 661 032 T3

<400> 9
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

5 <210> 10
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

10 <210> 11
 <211> 32
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15

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

20 <210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 12
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

30 <210> 13
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
 1 5 10 15

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

35 <210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 14
 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His
 1 5 10 15

45 <210> 15
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 15

ES 2 661 032 T3

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Val Leu Thr
 1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

5 <210> 16
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15

10 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Leu Tyr Gly Phe Ser Leu Ser
 20 25 30

<210> 17
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 17
 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
 1 5 10

20 <210> 18
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
 1 5 10 15

25 Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

30 <210> 19
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu
 1 5 10 15

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

35 <210> 20
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 20

ES 2 661 032 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 21
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 22
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

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

<210> 23
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 25
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 Gly Val Pro Ser Arg Ile Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 26
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 26

ES 2 661 032 T3

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
 20

<210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 28
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

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

<210> 29
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 29
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys
 20

<210> 30
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30
 Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 31
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 31
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 32
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 32

ES 2 661 032 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Thr Ala Thr Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

- 5 <210> 33
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> Mus musculus

10 <400> 33
Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Asn Ile Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Lys Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ala Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln His
85 90 95

Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Asn Leu Glu Leu Lys
100 105 110

Arg

- 15 <210> 34
- <211> 116
- <212> PRT

ES 2 661 032 T3

<213> Mus musculus

<400> 34

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Thr Ala Thr Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

5

<210> 35

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

10

<400> 35

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

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

Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Asn
85 90 95

Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

Arg

15

<210> 36

<211> 120

<212> PRT

ES 2 661 032 T3

<213> Mus musculus

<400> 36

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

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

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

Gly His Ile Ala Pro Gly Ser Gly Glu Thr Tyr Asp Asn Glu Met Phe
50 55 60

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

Ile His Leu Ser Ser Leu Ser Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

5 <210> 37
<211> 113
<212> PRT
<213> Mus musculus

10 <400> 37

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

15 <210> 38
<211> 120

ES 2 661 032 T3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 38

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

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

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

Gly His Ile Ala Pro Gly Ser Gly Glu Thr Tyr Asp Asn Glu Met Phe
50 55 60

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

Ile His Leu Ser Ser Leu Ser Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

5

<210> 39

<211> 123

<212> PRT

<213> Mus musculus

10

<400> 39

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

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

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

Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Tyr Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ser Arg Trp Arg Thr Ser Tyr Phe Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

15

ES 2 661 032 T3

5 <210> 40
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 40
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 His Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

10 <210> 41
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 41
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Val Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Asn Tyr Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ser Arg Trp Arg Thr Ser Tyr Phe Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

ES 2 661 032 T3

<210> 42
 <211> 111
 <212> PRT
 5 <213> Mus musculus
 <400> 42
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gly Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Glu Thr Met
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Gly Ser Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

10
 <210> 43
 <211> 113
 <212> PRT
 15 <213> Mus musculus
 <400> 43
 Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Asp Gly Glu Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg

ES 2 661 032 T3

<210> 44
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5 <400> 44
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Asn Ile Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu His Leu
 65 70 75
 Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Gly Tyr Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

10 <210> 45
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

15 <400> 45

ES 2 661 032 T3

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Asn Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

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

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys Arg

<210> 46

<211> 123

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 46

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
50 55 60

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

Phe Leu Met Leu Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Thr Val Ser Ser Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

10

<210> 47

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

15

ES 2 661 032 T3

<400> 47

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Leu
85 90 95

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

<210> 48

<211> 123

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 48

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
50 55 60

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

Phe Leu Met Leu Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Val Ser Ser Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 49

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 49

5

10

15

ES 2 661 032 T3

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Leu
85 90 95

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

<210> 50

<211> 123

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 50

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
50 55 60

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

Phe Leu Met Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Gly Ser Ser Gly Tyr Ile Tyr Tyr Glu Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

10 <210> 51

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

15 <400> 51

ES 2 661 032 T3

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Leu
85 90 95

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

- 5 <210> 52
- <211> 118
- <212> PRT
- <213> Mus musculus
- <400> 52

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

Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asn Thr Ile Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

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

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

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

10 Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

- <210> 53
- <211> 110
- <212> PRT
- <213> Mus musculus

<400> 53

ES 2 661 032 T3

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Ile Gly Thr Val Thr Thr Asn
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Ser Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

- 5 <210> 54
- <211> 118
- <212> PRT
- <213> Mus musculus
- <400> 54

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

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

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

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

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

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Gly Arg Tyr Phe Cys Ala
85 90 95

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

10 Ser Val Thr Val Ser Ser
115

- <210> 55
- <211> 112
- <212> PRT
- 15 <213> Mus musculus
- <400> 55

ES 2 661 032 T3

Asn 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 Thr Val Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Lys Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro 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 Ile Ile Asp
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
 85 90 95
 Glu Gly Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

5 <210> 56
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 56

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly 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 Asn Ser Val 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
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

10 Ser Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 57
 <211> 112
 <212> PRT
 15 <213> Mus musculus
 <400> 57

ES 2 661 032 T3

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

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

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser 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 Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Phe Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
85 90 95

Glu Asn Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 58

<211> 118

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 58

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

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

Ser Val 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 Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

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

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

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

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

10 <210> 59

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

15 <400> 59

ES 2 661 032 T3

Asn 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 Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro 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 Ala Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp
65 70 75 80

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

Glu Asn Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 60
<211> 118
5 <212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 60

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

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

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

Gly Leu Ile Trp Gly Asp Gly Asn Thr Ala Phe Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

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

Lys Leu Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Ile Lys Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

10 Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 61
<211> 112
<212> PRT
15 <213> Mus musculus

<400> 61

ES 2 661 032 T3

Asn 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 Thr Val Asp Ser Tyr
20 25 30

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro 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 Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
85 90 95

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

<210> 62

<211> 118

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 62

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

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

Asn 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 Asn Thr Asp Phe Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

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

Lys Leu Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

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

10 Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 63

<211> 112

15 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 63

ES 2 661 032 T3

His 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 Thr Val Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Ser Ser Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Lys 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 Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
 85 90 95
 Glu Gly Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Ser Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

- 5 <210> 64
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> CDR IL-13 consenso
- <220>
- <221> RASGO_MISC
- <222> (1)..(1)
- <223> X = T, D, G, S

- 15 <220>
- <221> RASGO_MISC
- <222> (4)..(4)
- <223> X = M, S, Y, L, H

- 20 <220>
- <221> RASGO_MISC
- <222> (5)..(5)
- <223> X = G, W, Y, A, S, N

- 25 <220>
- <221> RASGO_MISC
- <222> (6)..(6)
- <223> X = V, I, M

- 30 <220>
- <221> RASGO_MISC
- <222> (7)..(7)
- <223> X = D, H, S, Y, N, G

- 35 <400> 64
- Xaa Ser Asp Xaa Xaa Xaa Xaa
- 1 5

- <210> 65
- <211> 17
- 40 <212> PRT

<213> Artificial
 <220>
 <223> CDR IL-13 consenso
 5
 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (1)..(1)
 <223> X = M, E, H, R, S, G, L
 10
 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (2)..(2)
 <223> X = I o ausente
 15
 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (3)..(3)
 <223> X = H, Y, A, D, S, W
 20
 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (4)..(4)
 <223> X = P, S, W, G
 25
 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (5)..(5)
 <223> X = S, G, E, D
 30
 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (6)..(6)
 <223> X = D, G, S, E, N
 35
 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (7)..(7)
 <223> X = S, Y, G
 40
 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (8)..(8)
 <223> X = E, N, Y, V, R
 45
 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (9)..(9)
 <223> X = T, I, K
 50
 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (10)..(10)
 <223> X = R, Y, I, D, A
 55
 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (11)..(11)
 <223> X = L, Y, D, F
 60
 <220>
 <221> RASGO_MISC

<222> (12)..(12)
 <223> X = N, P, S, D

 <220>
 5 <221> RASGO_MISC
 <222> (13)..(13)
 <223> X = Q, E, D, P, S

 <220>
 10 <221> RASGO_MISC
 <222> (14)..(14)
 <223> X = K, M, S, T, A, V

 <220>
 15 <221> RASGO_MISC
 <222> (15)..(15)
 <223> X = F, L, V, M

 <220>
 20 <221> RASGO_MISC
 <222> (16)..(16)
 <223> X = K, R, Q

 <220>
 25 <221> RASGO_MISC
 <222> (17)..(17)
 <223> X = D, G, S

 <400> 65
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

 .
 30 Xaa
 <210> 66
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> CDR IL-13 consenso

 <220>
 40 <221> RASGO_MISC
 <222> (1)..(1)
 <223> X = W, T, G, Y, D, I

 <220>
 45 <221> RASGO_MISC
 <222> (2)..(2)
 <223> X = R, A, S, G, V

 <220>
 50 <221> RASGO_MISC
 <222> (3)..(3)
 <223> X = T, F, Y, S

 <220>
 55 <221> RASGO_MISC
 <222> (4)..(4)
 <223> X = S, T, Y

 <220>

<221> RASGO_MISC
 <222> (5)..(5)
 <223> X = Y, F, G

5 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (6)..(6)
 <223> X = F, Y

10 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (7)..(7)
 <223> X = S, Y, I, F

15 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (8)..(8)
 <223> X = D, L, Y, P

20 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (11)..(11)
 <223> X = Y, A, P, E

25 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (12)..(12)
 <223> X = F, M, S, L, I

30 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (13)..(13)
 <223> X = D, V, N, K

35 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (14)..(14)
 <223> X = Y, F

40 <400> 66
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Gly Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

<210> 67
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> CDR IL-13 consenso

50 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (1)..(1)
 <223> X = K, R

55 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (2)..(2)
 <223> X = S, A

60 <220>

<221> RASGO_MISC
 <222> (3)..(3)
 <223> X = S, T

5

<220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (4)..(4)
 <223> X = Q, K, I

10

<220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (5)..(5)
 <223> X = N, S, T, G, E

15

<220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (6)..(6)
 <223> X = L, T, S

20

<220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (7)..(7)
 <223> X = L, Q, V

25

<220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (8)..(8)
 <223> X = Y, N, H, D, T

30

<220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (9)..(9)
 <223> X = S, I, T

35

<220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (10)..(10)
 <223> X = S, D, N, H, Y

40

<220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (11)..(11)
 <223> X = N, G

45

<220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (13)..(13)
 <223> X = K, F, N, E, S

50

<220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (14)..(14)
 <223> X = N, T, S

55

<220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (15)..(15)
 <223> X = Y, F

60

<220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (16)..(16)

ES 2 661 032 T3

<223> X = L, A, M
<220>
<221> RASGO_MISC
5 <222> (17)..(17)
<223> X = A, D, E, H, N

<400> 67
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa
10 <210> 68
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial
15 <220>
<223> CDR IL-13 consenso

<220>
20 <221> RASGO_MISC
<222> (1)..(1)
<223> X = L, S, K, T, W, Y

<220>
25 <221> RASGO_MISC
<222> (2)..(2)
<223> X = V, T, A

<220>
30 <221> RASGO_MISC
<222> (3)..(3)
<223> X = S, N

<220>
35 <221> RASGO_MISC
<222> (4)..(4)
<223> X = N, K, T, R, M

<220>
40 <221> RASGO_MISC
<222> (5)..(5)
<223> X = R, L, K

<220>
45 <221> RASGO_MISC
<222> (6)..(6)
<223> X = F, D, E, H, A, P

<220>
50 <221> RASGO_MISC
<222> (7)..(7)
<223> X = S, P, R

<400> 68
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
55 1 5

<210> 69
<211> 9

<212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> CDR IL-13 consenso

 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (1)..(1)
 10 <223> X = F, W, Q, A

 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (2)..(2)
 15 <223> X = Q, L

 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (3)..(3)
 20 <223> X = H, G, Y, W, N

 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (4)..(4)
 25 <223> X = N, S, T, Y, L

 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (5)..(5)
 30 <223> X = Y, T, S, E, H

 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (6)..(6)
 35 <223> X = L, V, F, Y, N, G, D, P

 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (7)..(7)
 40 <223> X = P, H

 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (8)..(8)
 45 <223> X = L, F, Y, W, R

 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (9)..(9)
 50 <223> X = T, V

 <400> 69
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

 55 <210> 70
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial

 60 <220>
 <223> región variable 5G1.1 de la cadena pesada humanizada

ES 2 661 032 T3

<400> 70
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Asn Tyr Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Arg Gly Lys Ala Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Trp Arg Thr Ser Tyr Phe Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 71
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> región variable de la cadena ligera humanizada 5G1.1
 <400> 71
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 His Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

15 Arg

ES 2 661 032 T3

<210> 72
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> región variable 5G1.2 de la cadena pesada humanizada

<400> 72
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Asn Tyr Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ser Arg Trp Arg Thr Ser Tyr Phe Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

10

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 73
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

15

<220>
<223> región variable 5G1.2 de la cadena ligera humanizada

20

<400> 73

ES 2 661 032 T3

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

His Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

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

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 74
<211> 123
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> región variable 5G1.3 de la cadena pesada humanizada

<400> 74
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Asn Tyr Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ser Arg Trp Arg Thr Ser Tyr Phe Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

15 <210> 75
<211> 112

ES 2 661 032 T3

<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> región variable 5G1.3 de la cadena ligera humanizada

<400> 75
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 His Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

10 <210> 76
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> región variable 13C5.1 de la cadena pesada humanizada

<400> 76
 Glu Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
 1 5 10 15

20

ES 2 661 032 T3

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
 50 55 60

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

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

Cys Ala Arg Thr Val Ser Ser Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 77
 <211> 108
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> región variable 13C5.1 de la cadena ligera humanizada

10 <400> 77
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

15 <210> 78
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> región variable 13C5.2 de la cadena pesada humanizada

ES 2 661 032 T3

<400> 78

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

<210> 79

5 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

10 <223> región variable 13C5.2 de la cadena ligera humanizada

<400> 79

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

15

<210> 80
 <211> 123
 <212> PRT

ES 2 661 032 T3

<213> Artificial

<220>

<223> región variable 13C5.5 de la cadena pesada humanizada

5 <400> 80
 Glu Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Leu Tyr Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Asp Met Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Lys Leu Thr Ser Val Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Thr Val Ser Ser Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 81

<211> 107

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> región variable 13C5.5 de la cadena ligera humanizada

15 <400> 81

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

ES 2 661 032 T3

<220>

<223> región variable 9C11.1 de la cadena ligera humanizada

<400> 83

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Thr Gln Thr Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Asn
85 90 95

Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

5

<210> 84

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> región variable 9C11.2 de la cadena pesada humanizada

<400> 84

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

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

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

Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe

15

ES 2 661 032 T3

50

55

60

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

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

Ala Ser Thr Ala Thr Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 85

<211> 113

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10

<223> región variable 9C11.2 de la cadena ligera humanizada

<400> 85

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Thr Gln Thr Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Asn
85 90 95

Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 86

<211> 123

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 86

15

ES 2 661 032 T3

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

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

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

Ala Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Lys Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Glu Ala Ser Ala Ser Thr Ala Thr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ala Gly Arg Thr Glu Gly Thr His Tyr Tyr Ala Met Asp Ala
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 87

<211> 111

5 <212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 87

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

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

Ser Asp Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly His Gln Pro Lys
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Ala Arg
50 55 60

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

Val Gln Ala Asp Asp Ile Ala Ala Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Arg Glu
85 90 95

Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105 110

10

<210> 88

<211> 119

<212> PRT

<213> Rattus sp.

15

<400> 88

ES 2 661 032 T3

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

<210> 89
<211> 111
5 <212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 89
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15
Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ile Ser Arg
20 25 30
Tyr Asn Arg Met His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Gln Pro Lys
35 40 45
Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Tyr Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
50 55 60
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Tyr Pro
65 70 75 80
10 Val Gln Ala Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Arg Glu
85 90 95
Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Asn Arg
100 105 110

<210> 90
<211> 123
15 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> región variable 5G1.5 de la cadena pesada humanizada

ES 2 661 032 T3

<400> 90

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Asn Tyr Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Trp Arg Thr Ser Tyr Phe Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 91

5 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

10 <223> cadena ligera humanizada 5G1.5

<400> 91

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

<210> 92

<211> 107
 <212> PRT

ES 2 661 032 T3

<213> Artificial

<220>

<223> región variable 13C5.5L2E de la cadena ligera humanizada

5

<400> 92

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

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

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

Phe Tyr Thr Ser Met Lys Pro Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Leu
85 90 95

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

<210> 93

<211> 107

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena ligera humanizada 13C5.5L3F

15

<400> 93

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

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

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

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

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

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

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

<210> 94

<211> 107

ES 2 661 032 T3

<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> región variable13c5.5L2EL3F de la cadena ligera humanizada

5

<400> 94
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Phe Tyr Thr Ser Met Lys Pro Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Leu Thr Pro Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

10

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de unión que comprende un dominio de unión a antígeno, dicha proteína de unión capaz de unirse a IL-13, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno seis CDR: CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, en donde dichas seis CDR se seleccionan entre los conjuntos de CDR (a) a (f) de la siguiente manera:

(a)

CDR-H1 es: S-S-W-I-H (residuos 31-35 de SEQ ID NO: 32),
 CDR-H2 es: M-I-H-P-S-D-S-E-T-R-L-N-Q-K-F-K-D (residuos 50-66 de SEQ ID NO: 32),
 CDR-H3 es: T-A-T-D-F-D-Y (residuos 99-105 de SEQ ID NO: 32),
 CDR-L1 es: K-S-T-K-S-L-L-N-S-D-G-F-T-Y-L-D (residuos 24-39 de SEQ ID NO: 33),
 CDR-L2 es: L-V-S-N-R-F-S (residuos 55-61 de SEQ ID NO: 33), y
 CDR-L3 es: F-Q-H-N-Y-L-P-L-T (residuos 94-102 de SEQ ID NO: 33);

(b)

CDR-H1 es: T-S-D-M-G-V-D (residuos 31-37 de SEQ ID NO: 46),
 CDR-H2 es: H-I-W-W-D-D-V-K-R-Y-N-P-A-L-K-S (residuos 52-67 de SEQ ID NO: 46),
 CDR-H3 es: T-V-S-S-G-Y-I-Y-Y-A-M-D-Y (residuos 100-112 de SEQ ID NO: 46),
 CDR-L1 es: R-A-S-Q-D-I-R-N-Y-L-N (residuos 24-34 de SEQ ID NO: 47),
 CDR-L2 es: Y-T-S-R-L-H-S (residuos 50-56 de SEQ ID NO: 47), y
 CDR-L3 es: Q-Q-G-N-T-L-P-L-T (residuos 89-97 de SEQ ID NO: 47);

(c)

CDR-H1 es: T-S-D-L-G-V-G (residuos 31-37 de SEQ ID NO: 50),
 CDR-H2 es: H-I-W-W-D-D-V-K-R-Y-N-P-A-L-K-S (residuos 52-67 de SEQ ID NO: 50),
 CDR-H3 es: I-I-G-S-S-G-Y-I-Y-Y-E-M-D-Y (residuos 100-112 de SEQ ID NO: 50),
 CDR-L1 es: R-A-S-Q-D-I-R-N-Y-L-N (residuos 24-34 de SEQ ID NO: 51),
 CDR-L2 es: Y-T-S-R-L-H-S (residuos 50-56 de SEQ ID NO: 51), y
 CDR-L3 es: Q-Q-G-N-T-L-P-L-T (residuos 89-97 de SEQ ID NO: 51);

(d)

CDR-H1 es: T-S-D-M-G-V-D (residuos 31-37 de SEQ ID NO: 80),
 CDR-H2 es: H-I-W-W-D-D-V-K-R-Y-N-P-A-L-K-S (residuos 52-67 de SEQ ID NO: 80),
 CDR-H3 es: T-V-S-S-G-Y-I-Y-Y-A-M-D-Y (residuos 100-112 de SEQ ID NO: 80),
 CDR-L1 es: R-A-S-Q-D-I-R-N-Y-L-N (residuos 24-34 de SEQ ID NO: 92),
 CDR-L2 es: Y-T-S-M-K-P-R (residuos 50-56 de SEQ ID NO: 92), y
 CDR-L3 es: Q-Q-G-N-T-L-P-L-T (residuos 89-97 de SEQ ID NO: 92);

(e)

CDR-H1 es: T-S-D-M-G-V-D (residuos 31-37 de SEQ ID NO: 80),
 CDR-H2 es: H-I-W-W-D-D-V-K-R-Y-N-P-A-L-K-S (residuos 52-67 de SEQ ID NO: 80),
 CDR-H3 es: T-V-S-S-G-Y-I-Y-Y-A-M-D-Y (residuos 100-112 de SEQ ID NO: 80),
 CDR-L1 es: R-A-S-Q-D-I-R-N-Y-L-N (residuos 24-34 de SEQ ID NO: 93),
 CDR-L2 es: Y-T-S-K-L-H-S (residuos 50-56 de SEQ ID NO: 93), y
 CDR-L3 es: Q-Q-G-L-T-P-P-L-T (residuos 89-97 de SEQ ID NO: 93); o

(f)

CDR-H1 es: T-S-D-M-G-V-D (residuos 31-37 de SEQ ID NO: 80),
 CDR-H2 es: H-I-W-W-D-D-V-K-R-Y-N-P-A-L-K-S (residuos 52-67 de SEQ ID NO: 80),
 CDR-H3 es: T-V-S-S-G-Y-I-Y-Y-A-M-D-Y (residuos 100-112 de SEQ ID NO: 80),
 CDR-L1 es: R-A-S-Q-D-I-R-N-Y-L-N (residuos 24-34 de SEQ ID NO: 94),
 CDR-L2 es: Y-T-S-M-K-P-R (residuos 50-56 de SEQ ID NO: 94), y
 CDR-L3 es: Q-Q-G-L-T-P-P-L-T (residuos 89-97 de SEQ ID NO: 94).

2. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichas seis CDR son:

CDR-H1 es: T-S-D-M-G-V-D (residuos 31-37 de SEQ ID NO: 46),
 CDR-H2 es: H-I-W-W-D-D-V-K-R-Y-N-P-A-L-K-S (residuos 52-67 de SEQ ID NO: 46),
 CDR-H3 es: T-V-S-S-G-Y-I-Y-Y-A-M-D-Y (residuos 100-112 de SEQ ID NO: 46),
 CDR-L1 es: R-A-S-Q-D-I-R-N-Y-L-N (residuos 24-34 de SEQ ID NO: 47),
 CDR-L2 es: Y-T-S-K-L-H-S (residuos 50-56 de SEQ ID NO: 47), y
 CDR-L3 es: Q-Q-G-N-T-L-P-L-T (residuos 89-97 de SEQ ID NO: 47).

- 5
- 10 3. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha proteína de unión comprende dos dominios variables, y en donde dichos dominios variables tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 81.
- 15 4. La proteína de unión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha proteína de unión es capaz de unirse a una IL-13 humana (SEQ ID NO: 1).
- 20 5. La proteína de unión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha proteína de unión es capaz de unirse a una variante de IL-13 humana en la que un residuo de arginina en la posición 130 de SEQ ID NO: 1 se reemplaza por un residuo de glutamina.
6. La proteína de unión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la proteína de unión es capaz de modular o neutralizar una función biológica de IL-13.
7. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la proteína de unión inhibe la unión de IL-13 tanto a IL-13R α 1 como a IL-13R α 2.
- 25 8. La proteína de unión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde dicha proteína de unión tiene una constante de velocidad de asociación (K_{on}) a dicha IL-13 seleccionada del grupo que consiste en: al menos aproximadamente $10^2 M^{-1}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^3 M^{-1}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^4 M^{-1}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^5 M^{-1}s^{-1}$; y al menos aproximadamente $10^6 M^{-1}s^{-1}$; medida por resonancia de plasmón superficial;
- 30 o dicha proteína de unión tiene una constante de velocidad de disociación (K_{off}) a dicha diana seleccionada del grupo que consiste en: a lo sumo aproximadamente $10^{-3}s^{-1}$; a lo sumo aproximadamente $10^{-4}s^{-1}$; a lo sumo aproximadamente $10^{-5}s^{-1}$; y a lo sumo aproximadamente $10^{-6}s^{-1}$, medido por resonancia de plasmón superficial;
- 35 o dicha proteína de unión tiene una constante de disociación (K_D) a dicha diana seleccionada del grupo que consiste en: a lo sumo aproximadamente $10^{-7} M$; a lo sumo aproximadamente $10^{-8} M$; a lo sumo aproximadamente $10^{-9} M$; a lo sumo aproximadamente $10^{-10} M$; a lo sumo aproximadamente $10^{-11} M$; a lo sumo aproximadamente $10^{-12} M$; y a lo sumo $10^{-13} M$.
- 40 9. Una construcción de anticuerpo que comprende una proteína de unión descrita en una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, comprendiendo dicha construcción de anticuerpo adicionalmente un polipéptido conector o un dominio constante de inmunoglobulina.
- 45 10. La construcción de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicha proteína de unión se selecciona del grupo que consiste en:

una molécula de inmunoglobulina,	un Fv ligado a disulfuro,
un anticuerpo monoclonal,	un scFv,
un anticuerpo quimérico,	un anticuerpo injertado con CDR,
un anticuerpo humanizado,	un anticuerpo multiespecífico,
un Fab,	un anticuerpo específico dual, y
un Fab',	un anticuerpo biespecífico.
a F(ab') ₂ ,	
un Fv,	

11. La construcción de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en donde dicha proteína de unión comprende un dominio constante de inmunoglobulina de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en:

un dominio constante de IgM humana,	un dominio constante de IgG4 humana,
un dominio constante de IgG1 humana,	un dominio constante de IgE humana,
un dominio constante de IgG2 humano,	y
un dominio constante de IgG3 humana,	un dominio constante de IgA humana.

12. Un ácido nucleico aislado que codifica la proteína de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o una construcción de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 9-11.

13. Un vector que comprende un ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 12.

14. El vector de la reivindicación 13, en donde dicho vector es un vector seleccionado del grupo que consiste en pcDNA, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV y pBJ.

15. Una célula anfitriona que comprende un vector de acuerdo con la reivindicación 13 o 14.

16. La célula anfitriona de acuerdo con la reivindicación 15, en donde dicha célula anfitriona es una célula procariota o una célula eucariota.

17. La célula anfitriona de acuerdo con la reivindicación 16, en donde dicha célula eucariota se selecciona del grupo que consiste en: una célula de protista, una célula animal, una célula vegetal y una célula fúngica.

18. La célula anfitriona de acuerdo con la reivindicación 17, en donde dicha célula eucariota es una célula animal seleccionada del grupo que consiste en: una célula de mamífero, una célula de ave y una célula de insecto.

19. La célula anfitriona de acuerdo con la reivindicación 16, en donde dicha célula anfitriona es una célula eucariota seleccionada del grupo que consiste en: una célula CHO, una célula COS o una célula de levadura.

20. Un método para producir una proteína capaz de unirse a IL-13 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende cultivar una célula anfitriona de una cualquiera de las reivindicaciones 15-19 en medio de cultivo en condiciones suficientes para producir una proteína de unión capaz de unirse a IL-13.

21. Una proteína producida de acuerdo con el método de la reivindicación 20.

22. Una proteína de unión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o una construcción de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9-11 para su uso en la reducción de la actividad de IL-13 humana en un sujeto humano que padece un trastorno en el que la actividad de IL-13 es perjudicial, en donde dicho trastorno se selecciona del grupo que consiste en trastornos respiratorios; asma; asma alérgica y asma no alérgica; asma debida a infección; asma debida a infección con el virus respiratorio sincitial (RSV); enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); otras afecciones que implican inflamación de las vías respiratorias; eosinofilia, fibrosis y exceso de producción de moco; fibrosis quística; fibrosis pulmonar; trastornos atópicos; dermatitis atópica; urticaria; eczema; rinitis alérgica; y enterogastritis alérgica; afecciones inflamatorias y/o autoinmunitarias de la piel; afecciones inflamatorias y/o autoinmunitarias de los órganos gastrointestinales; enfermedades inflamatorias intestinales (EII); colitis ulcerosa; enfermedad de Crohn; afecciones inflamatorias y/o autoinmunitarias del hígado; cirrosis hepática; fibrosis hepática; fibrosis hepática causada por el virus de la hepatitis B y/o C; escleroderma; tumores o cánceres; carcinoma hepatocelular; glioblastoma; linfoma; linfoma de Hodgkin; infecciones virales; Infección por HTLV-1 (p. ej., de HTLV-1); supresión de la expresión de respuestas inmunitarias de tipo 1 protectoras, y supresión de la expresión de respuestas inmunitarias de tipo 1 protectoras durante la vacunación.

23. La proteína de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde dicha proteína de unión es un anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo:

se une a la IL-13 humana e inhibe la unión de dicha IL-13 al receptor IL-13 α 2 en un análisis de unión al receptor basado en la superficie celular con una CI_{50} seleccionada del grupo que consiste en aproximadamente de $1,5 \times 10^{-8}$ a 1×10^{-8} M, de 1×10^{-8} a 1×10^{-9} M, de 10^{-9} a 10^{-10} M y de 10^{-10} a 10^{-11} M, o en un análisis de unión a receptor basado en ELISA con una CI_{50} seleccionada del grupo que consiste en aproximadamente de $1,8 \times 10^{-8}$ a 1×10^{-8} M, de 1×10^{-8} a 1×10^{-9} M, de 10^{-9} a 10^{-10} M y de 10^{-10} a 10^{-11} M; o se une a IL-13 con características de unión seleccionadas del grupo que consiste en:

- a) una constante de velocidad de asociación (k_{on}) entre aproximadamente $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, o aproximadamente de $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$;
- b) una constante de velocidad de disociación (k_{off}) de aproximadamente 10^{-4} s^{-1} a 10^{-5} s^{-1} , o de aproximadamente 10^{-5} s^{-1} a 10^{-6} s^{-1} , medida por resonancia de plasmón superficial; y
- 5 c) una constante de disociación (K_D) de aproximadamente $1,5 \times 10^{-10}$ a $1 \times 10^{-10} \text{ M}$, o de aproximadamente 10^{-10} a 10^{-11} M .
24. El anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 23, en donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se unen a IL-13 humana e inhiben AHR en al menos aproximadamente 50% en un modelo de asma inducido por IL-13 humana.
- 10 25. El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 23, en el donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo tienen una constante de velocidad de asociación (k_{on}) a IL-13 seleccionada del grupo que consiste en: $6,68 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $7,86 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $8,35 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $8,69 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $9,15 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $1,26 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $1,7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $2,51 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$;
- 15 o
en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo tienen una constante de velocidad de disociación (k_{off}) a IL-13 seleccionada del grupo que consiste en: $1,23 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $1,76 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $4,74 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $1,91 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $2,14 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $3,82 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $8,81 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ y $9,65 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, medida por resonancia de plasmón superficial;
- 20 o
en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo tienen una constante de disociación (K_D) a IL-13 seleccionada del grupo que consiste en: $1,05 \times 10^{-10} \text{ M}$, $7,10 \times 10^{-10} \text{ M}$, $1 \times 10^{-11} \text{ M}$, $2,20 \times 10^{-11} \text{ M}$, $2,72 \times 10^{-11} \text{ M}$, $4,17 \times 10^{-11} \text{ M}$, $5,68 \times 10^{-11} \text{ M}$, $7,01 \times 10^{-11} \text{ M}$, $7,10 \times 10^{-11} \text{ M}$, y $9,79 \times 10^{-11} \text{ M}$.
26. El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 23, en donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprenden dos dominios variables, en donde dichos dos dominios variables tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 81.
- 25 27. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o la construcción de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 30 28. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 23-26, y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 35 29. La composición farmacéutica de la reivindicación 27 o 28, en donde dicho portador farmacéuticamente aceptable funciona como un coadyuvante útil para aumentar la absorción o dispersión de dicha proteína de unión.