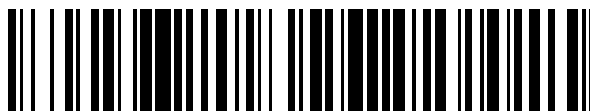


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 165**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2008** **E 15190653 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2018** **EP 3072525**

54 Título: **Métodos para reducir los niveles de eosinófilos**

30 Prioridad:

14.05.2007 US 924422 P

01.06.2007 US 924832 P

20.07.2007 US 935005 P

14.03.2008 US 64612 P

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

03.05.2018

73 Titular/es:

ASTRAZENECA AB (50.0%)

151 85 Södertälje, SE y

BIOWA, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

KOIKE, MASAMICHI;

SPITALNY, GEORGE L.;

WHEELER, ALISTAIR y

WHITE, BARBARA

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 666 165 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

Métodos para reducir los niveles de eosinófilos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos para reducir los niveles de basófilos en sujetos humanos.

Antecedentes de la invención

10

Los eosinófilos están implicados en diversas enfermedades incluyendo enfermedades alérgicas, y se cree que desempeñan un papel importante en la generación de morbilidad de enfermedades alérgicas, tales como asma bronquial crónica y dermatitis atópica [Adv. Immunol., 39, 177(1986), Immunol. Today, 13, 501(1992)]. Además de las enfermedades anteriores, los eosinófilos también están implicados en enfermedades denominadas generalmente

15

síndrome hipereosinófilo (HES), tales como eosinofilia, enterogastritis eosinófila, leucemia eosinófila, granuloma eosinófilo y enfermedad de Kimura [Ann. Intern. Med., 97, 78 (1982)].

20

El granuloma eosinófilo es una lesión criptogénica no neoplásica, que es osteolítica y focal, y se cree que está asociada con eosinofilia tisular notable [U.S. Armed Forces Med. J., 2, 1085 (1951)]. De acuerdo con el registro de pacientes de tumor óseo en Japón (1972-1984), 379 de 404 pacientes con tumor óseo (93,8 %) padecían granuloma eosinófilo. El granuloma eosinófilo en estadio temprano comprende principalmente eosinófilos e histiocitos, y el granuloma en el estadio avanzado comprende fibrosis, o puede progresar a pulmón fibroso. Por lo tanto, además de enfermedades inflamatorias, tales como alergia, los eosinófilos pueden provocar otras diversas enfermedades.

25

La interleucina-5 (denominada en lo sucesivo en el presente documento IL-5), interleucina-3 (denominada en lo sucesivo en el presente documento IL-3) y factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (denominado en lo sucesivo en el presente documento GM-CSF), que son miembros de la familia de citocinas, están implicados en la regulación de la diferenciación, proliferación y activación de eosinófilos. De estas citocinas, se sabe que IL-5 actúa específicamente en eosinófilos e induce específicamente la diferenciación terminal [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 2288 (1988)].

30

In vitro, IL-3 y/o GM-CSF pueden activar eosinófilos o prolongar su supervivencia [J. Clin. Invest., 81, 1986 (1988)]. Además, IL-3 y/o GM-CSF también actúa predominantemente en la inducción de eosinófilos inmaduros a partir de células madre mieloides [Blood, 76, 1956 (1990)]. Además, las quimiocinas tales como eotaxina y RANTES (regulada en activación expresada y secretada por linfocitos T normales), inducen la quimiotaxis de eosinófilos al sitio inflamado [Clin. Exp. Allergy, 26, 1005 (1996)]. Los factores de células madre (denominados en lo sucesivo en el presente documento SCF) están implicados en la acumulación de eosinófilos en bronquitis alérgica. Además de IL-5, hay muchos factores que afectan a la función de los eosinófilos.

35

40

Los eosinófilos se dividen en subgrupos, eosinófilos normodensos y eosinófilos hipodensos. Se ha mostrado que los eosinófilos son eosinófilos hipodensos tras la activación [Immunology, 47, 531 (1982)]. Los eosinófilos hipodensos también se denominan eosinófilos activados. Se ha indicado que se produce un cambio cualitativo además de un cambio cuantitativo en eosinófilos en la sangre periférica de un paciente de HES [Clin. Exp. Immunol., 24, 423 (1976)]. Los eosinófilos activados se han implicado en la gravedad del síntoma de HES [Am. J. Cardiol., 52, 321 (1983)]. Además de pacientes de HES, se han encontrado también eosinófilos activados en la sangre periférica, y en el fluido de lavado bronquioalveolar (BALF) de un paciente con asma bronquial [Am. Rev. Respir. Dis., 132, 981 (1985)]. Diversos receptores, tales como los de citocinas, se expresan en eosinófilos activados (eosinófilos hipodensos) [J. Immunol., 142, 4416 (1989)]. En comparación con eosinófilos normodensos, estos eosinófilos hipodensos muestran sensibilidades elevadas frente a IL-5 [Clin. Exp. Immunol., 85, 312 (1991); J. Exp. Med., 172, 1347 (1990)].

45

50

También se sabe que los eosinófilos activados anteriormente mencionados sobreviven *in vitro* sin las citocinas que inducen la diferenciación y proliferación de eosinófilos [J. Exp. Med., 170, 343(1989)]. Por lo tanto, las propiedades de eosinófilos activados son similares a las de eosinófilos, que se infiltrarán en tejidos, tales como alveolos [Int. Arch. Allergy Immunol., 120, 91 (1999)]. Sigue sin conocerse una explicación detallada de por qué los eosinófilos activados se hacen independientes de citocinas, sin embargo, su desgranulación y supervivencia prolongada probablemente se induzcan por diversas moléculas funcionales vitales distintas de IL-5.

55

60

Se han considerado como agentes que inhiben las funciones de eosinófilos sustancias que tienen actividad de inhibición en citocinas o quimiocinas que están implicadas en la diferenciación o proliferación de eosinófilos. Sin embargo, en la mayoría de los casos estos agentes no actúan en eosinófilos independientes de citocinas que se han activado e infiltrado en áreas inflamadas. Por lo tanto, la inhibición específica de eosinófilos y la inducción de muerte celular de eosinófilos activados son necesarias para inhibir las funciones de cualquier eosinófilo. Sin embargo, no se conoce que ningún agente antiinflamatorio, hasta la fecha, induzca apoptosis de eosinófilos activados.

65

En la actualidad, el tratamiento para pacientes con enfermedades eosinófilas consiste en la administración de

esteroides. Sin embargo, la administración de esteroides se asociada con frecuencia con efectos secundarios. Específicamente, el tratamiento tiene algunos otros problemas, de modo que la afección patológica del paciente puede volver al estado original cuando se detiene la administración de esteroides, y la administración de esteroides prolongada puede inducir resistencia a esteroides. En consecuencia, existe la necesidad de tratamientos seguros y eficaces para enfermedades y trastornos mediados por eosinófilos.

Sumario de la invención

La invención proporciona un método para reducir los números de eosinófilos en un sujeto humano que comprende la administración a dicho paciente de una molécula de unión a IL-5R que comprende (a) una región que se une específicamente con IL-5R y (b) una región Fc de inmunoglobulina.

Breve descripción de las figuras

Para el fin de ilustrar la invención, se representan en los dibujos ciertas realizaciones sobre la invención. Sin embargo, la invención no se limita a las disposiciones precisas y las instrumentalidades de las realizaciones representadas en los dibujos.

Figura 1. Reducción de la proteína catiónica eosinófila (ECP) del suero: la ECP es un marcador producido por eosinófilos. En la cohorte de pacientes 1, esta reducción de los niveles de ECP se correlaciona con la reducción de eosinófilos observada en la figura 1. El eje Y resume los niveles de ECP (ng/ml) y el eje X resume el tiempo (en días).

Figura 2. Empobrecimiento de basófilos periféricos reversibles: se midieron los basófilos en circulación en la cohorte de pacientes 1. El eje Y resume los recuentos de basófilos (basófilos/mm³) y el eje X resume el tiempo (en días). Se observó una reducción rápida de los basófilos en la periferia a las 24 horas después de la administración.

Figura 3. hsCRP (proteína sensible a c de alta sensibilidad) aumentada (reversible) en sujetos con eosinofilia en la línea basal. La medición de este marcador en la cohorte de pacientes 1 demuestra que se produce la respuesta esperada, mediada por el sistema inmunitario, contra células que expresan IL-5R. El eje Y resume los niveles de hsCRP (mg/dl) y el eje X resume el tiempo (en días).

Figura 4. Aumento mínimo de IL-6 en el suero. Se resume la medición de la citocina IL-6 en la cohorte de pacientes 1. El eje Y resume los niveles de IL-6 (pg/ml) y el eje X resume el tiempo (en horas).

Figura 5. Reducción variable de neutrófilos en circulación. Se midieron los niveles de neutrófilos en la cohorte de pacientes 1 y se resumen en ambos paneles.

Figura 6. Reducción variable de linfocitos en circulación. Se midieron los niveles de linfocitos en la cohorte de pacientes 1 y se resumen en ambos paneles.

Figura 7. Reducción uniforme y moderada del % de NK el día 1. Se midieron los niveles de linfocitos NK en la cohorte de pacientes 1 antes del tratamiento, el día 1 después de la administración y el día 28 después de la administración.

Figura 8. FENO reducido en sujetos con mayor línea basal. La fracción de óxido nítrico exhalado se midió en la cohorte de pacientes 1. Este ensayo es una medición no invasiva de inflamación pulmonar, indicando los datos una tendencia a la reducción de la inflamación.

Figura 9. Ensayo de citotoxicidad in vitro: se ensayó MEDI-563 en un ensayo de citotoxicidad in vitro en comparación con un anticuerpo de control que no se une con IL-5R (A) y también con el control adicional de MEDI-563 (B) fucosilado. Se usaron células efectoras KC 1333 en una relación 5:1 contra células diana CTLL2. La citotoxicidad se midió a las 4 horas. El eje Y mide el porcentaje de citotoxicidad y el eje X es la concentración de anticuerpo.

Figura 10. Unión de MEDI-563 con-rhuIL5R α : se midió la afinidad de unión de MEDI-563 con IL-5R α humano recombinante mediante resonancia de plasmón superficial en tres experimentos separados y se resume en esta figura.

Figura 11. Unión de MEDI-563 con rhuFc γ R α s: la afinidad de unión de MEDI-563 con Fc γ R α s recombinantes de varios lotes diferentes se midió en comparación con un anticuerpo de control fucosilado de isotipo coincidente y se resume en esta figura. Obsérvese que MEDI-563 se une con una afinidad 5-10 veces mayor con huFc γ R1IIa y muFc γ RIV.

Figura 12. Se analizó la expresión de IL-5R α en el pulmón del ratón IL-9tg mediante inmunohistoquímica y se visualiza en esta figura.

Figura 13. Se analizó la expresión de IL-5R α en pólipos nasales mediante inmunohistoquímica usando MEDI-563 y

se visualiza en esta figura. MEDI-563 tiñe todos los eosinófilos en pólipos nasales.

Figura 14. Neutropenia transitoria mínima en sujetos: se tomaron recuentos de neutrófilos absolutos para sujetos en la cohorte 1 y se resumen en esta figura. El eje Y resume los recuentos de neutrófilos (neutrófilos/mm³) y el eje X resume el tiempo en días.

Figura 15. MEDI-563 se une con eosinófilos en sangre completa de donantes sanos: se realizó análisis de citometría de flujo en muestras de sangre completa como se describe en el ejemplo 6 del presente documento. Los tres paneles de datos, particularmente el tercer panel titulado "MEDI-563 se une con Eos" demuestra por FACS que MEDI-563 se une con eosinófilos.

Figura 16. Análisis de FACS de leucocitos de ratones transgénicos IL-5: se realizó análisis de citometría de flujo en leucocitos de ratones transgénicos IL5 como se describe en el ejemplo 7. La figura 16A resume un análisis de FACS de eosinófilos SiglecF+CCR3+. La figura 16B demuestra que todos los eosinófilos (SiglecF+CCR3+) en la médula ósea, bazo, sangre y pulmón expresan IL-5Rα usando mAb anti-IL-5Rα H7.

Figura 17. MEDI-563 agota células mononucleares positivas para IL-5Rα de la médula ósea en un ensayo ADCC in vitro. Se expusieron células mononucleares de médula ósea no adherentes aisladas a MEDI-563, o anticuerpos de control de isotipo (R347), en presencia de células efectoras teñidas con CFSE. Las células positivas para IL-5Rα se visualizaron por anticuerpo KM 1257/IgG de cabra anti Mu conjugado con PE. Se realizó tinción de control de las muestras usando el anticuerpo de control de isotipo 1A7/IgG de cabra anti Mu conjugado con PE. Se presenta el perfil de tinción de las poblaciones celulares de las muestras después de empobrecimiento mediado por MEDI-563 o R347 como gráficos de puntos de KM 1257/PE frente a. CFSE o 1A7/PE frente a CFSE. Una comparación de los gráficos de puntos de KM 1257/PE frente a. CFSE obtenidos para muestras tratadas con MEDI-563 y R347 revela que ADCC mediada por MEDI-563 agota sustancialmente todas las células positivas IL-5Rα de la muestra.

Figura 18. MEDI-563 agota de forma reversible eosinófilos de sangre periférica en asmáticos leves. Seis voluntarios con asma atópica leve recibieron una única dosis IV de (A) 0,03 mg/kg o (B) 0,1 mg/kg de MEDI-563. Se enumeraron eosinófilos de sangre periférica por citometría de flujo en un momento de exploración, el día 0 antes de la dosificación, y a intervalos regulares hasta el día 84 y en el seguimiento. El eje Y resume los recuentos de eosinófilos (eosinófilos/mm³) y el eje X resume el tiempo (en días). Se observó reducción rápida de eosinófilos en la periferia a las 24 horas después de la administración. La eosinopenia inducida por MEDI-563 era reversible.

Figura 19. IL-5Rα se expresa en todos los eosinófilos en pulmón humano normal como se analiza mediante inmunohistoquímica usando MEDI-563 y se visualiza en esta figura.

Figura 20. IL-5Rα se expresa en todos los eosinófilos en biopsias de pulmón de pacientes humanos asmáticos como se analiza mediante inmunohistoquímica usando MEDI-563 y se visualiza en esta figura.

Figura 21. Se analizó la expresión de IL-5Rα por basófilos primarios y eosinófilos aislados de donantes sanos mediante citometría de flujo. Se muestran los perfiles de tinción obtenidos usando el anticuerpo MEDI- 563 anti-IL5Rα y un anticuerpo de control de isotipo de especificidad irrelevante, las células CTLLh5r (células tumorales transfectadas con IL-5Rα/beta) actuaron como un control positivo.

Figura 22. Ensayo de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC) in vitro. Se compararon la actividad de MEDI-563 afucosilado y fucosilado en un ensayo de (ADCC) in vitro. Se usaron linfocitos NK primarios y eosinófilos aislados como células efectoras y diana, respectivamente, a una relación 5:1. El ensayo se realizó en presencia de IL-2 humana 1 ng/ml. La muerte celular se evaluó por citometría de flujo basándose en la tinción con anexina V. Los ejes Y y X presentan el porcentaje de citotoxicidad máximo y la concentración de anticuerpos, respectivamente. El valor de CE50 para el anticuerpo MEDI-563 afucosilado fue de 0,965 pM.

Figura 23. Ensayo de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC) in vitro: se analizó la actividad de MEDI-563 afucosilado en un ensayo ADCC in vitro. Se usaron linfocitos NK primarios y basófilos aislados como células efectoras y dianas, respectivamente. Los ejes Y y X presentan el porcentaje de citotoxicidad máxima y la concentración de anticuerpos, respectivamente. El valor CE50 para el anticuerpo MEDI-563 afucosilado fue 0,561 pM en este ensayo.

Figura 24. Desgranulación de eosinófilos en un ensayo de citotoxicidad mediado por células dependientes de anticuerpo (ADCC) in vitro: Se analizó la liberación EDN (neurotoxina derivada de eosinófilos) en un ensayo ADCC in vitro usando diversos niveles de anticuerpo anti-IL5Rα fucosilado (MEDI-563F) y afucosilado (MEDI-563). El ensayo utilizó eosinófilos recién aislados y linfocitos NK o células PBMC como células diana y efectoras, respectivamente. Se muestra la desgranulación de eosinófilos máxima detectada en respuesta al tratamiento con Triton X-100 1 % para comparación.

Figura 25. MEDI-563 se une específicamente con un epítipo dentro del dominio D1 de la relación extracelular de IL-5Rα humana. Se determinó la unión de anticuerpos a células transgénicas que expresaban de forma transitoria

proteínas IL-5Ralfa quiméricas por citometría de flujo. Se muestran los perfiles de tinción fluorescente. "Policlona" y "MEDI-563" indican perfiles de tinción observados usando anticuerpos policlonales anti-IL-5Ralfa humana y MEDI-563, respectivamente. La "tinción doble" indica el perfil de tinción fluorescente para los anticuerpos "policlonales" (eje X) y MEDI-563 (eje Y). (A) se expresó de forma transitoria una serie de transgenes de IL-5Ralfa quiméricos de ser humano-ratón. Los transgenes "de anulación" fueron construcciones de IL-5Ralfa quiméricas que comprendían un único dominio extracelular de ratón en un fondo de otro modo humano. Los transgenes "de introducción" fueron construcciones de IL-5Ralfa quiméricas que comprendían un único dominio extracelular humano en un fondo de otro modo de ratón. (B) MEDI-563 se unió específicamente a células transgénicas que expresaban IL-5Ralfa humano. MEDI-563 no se unió con células transgénicas que expresaban IL-5Ralfa de ratón. (C) MEDI-563 no se unió con células transgénicas que expresaban un transgén de IL-5Ralfa quimérico que comprendía dominios extracelulares D1 de ratón y D2-D3 humano ("D1 de anulación"). MEDI-563 se unió específicamente con células transgénicas que expresaban un transgén de IL-5Ralfa quimérico que comprendía los dominios extracelulares D2 o D3 de ratón en un fondo humano ("anulación de D2 o D3"). (D) MEDI-563 se unía específicamente con células transgénicas que expresaban un transgén de IL-5Ralfa quimérico que comprendía los dominios extracelulares D1 humano y D2-D3 de ratón ("introducción de D1"). MEDI-563 no se unió con células transgénicas que expresaban un transgén quimérico basado en IL-5Ralfa de ratón que comprendía el dominio extracelular D2 o D3 humano ("introducción de D2 o D3").

Figura 26. MEDI-563 se une específicamente con un epítipo dentro del Segmento B del dominio extracelular D1 de IL-5Ralfa humana. La unión del anticuerpo con células transgénicas que expresaban una proteína IL-5Ralfa quimérica se determinó por citometría de flujo. Se muestran los perfiles de tinción fluorescente. "Policlona" y "MEDI-563" indican perfiles de tinción observados usando anticuerpo policlonales anti-IL-5Ralfa humana y MEDI-563, respectivamente. La "tinción doble" indica el perfil de tinción fluorescente para los anticuerpos policlona (eje X) y MEDI-563 (eje Y). (A) la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular D1 de IL-5Ralfa de ratón es 75 % idéntica a la de la proteína IL-5Ralfa humana. El dominio extracelular D1 de IL-5Ralfa se dividió en los Segmentos A, B y C. las secuencias de aminoácidos de IL-5Ralfa humanas y de ratón mostradas son los restos 1-102 de SEC ID N^o 5 Y 6, respectivamente. (B) se expresó de forma transitoria una serie de transgenes de IL-5Ralfa quiméricos de ser humano-ratón. Los transgenes "de anulación" fueron construcciones de IL-5Ralfa quiméricas que comprendían un único segmento de ratón del dominio extracelular D1 en un fondo de otro modo humano. Los transgenes "de introducción" fueron construcciones de IL-5Ralfa quiméricas que comprendían un único segmento humano del dominio extracelular D1 en un fondo D1 de ratón-D2 humano-D3 de ratón-TM de ratón. (C) MEDI-563 reconocía específicamente células transgénicas que expresaban (i) un transgén de IL-5Ralfa humano o (ii) un transgén quimérico de IL-5Ralfa de ratón que comprendía un dominio extracelular D1 humano ("introducción de D1"). MEDI-563 no se unió con células transgénicas que expresaban (i) transgén de receptor IL-5Ralfa de ratón o (ii) un transgén de IL-5Ralfa quimérico humano que comprendía un dominio extracelular D1 de ratón. (D) MEDI-563 no se unió con células transgénicas que expresaban un transgén de IL-5Ralfa quimérico que comprendía un Segmento B de ratón del dominio extracelular D1 en un fondo de otro modo humano ("anulación de B"). MEDI-563 se unía específicamente con células transgénicas que expresaban un transgén de IL-5Ralfa quimérico que comprendía el Segmento A o C de ratón de los dominios extracelulares D1 en un fondo humano ("anulación de A o C"). (E) MEDI-563 se unía específicamente con células transgénicas que expresaban un transgén de IL-5Ralfa quimérico que comprendía un Segmento B humano del dominio extracelular D1 en un fondo de D1 de ratón- D2 humano-D3 de ratón-TM de ratón ("introducción de B"). MEDI-563 no se unió con células transgénicas que expresaban un transgén de IL-5Ralfa quimérico que comprendía un Segmento A o C humano en un fondo de D1 de ratón-D2 humano-D3 de ratón-TM de ratón ("introducción de A o C").

Figura 27. MEDI-563 se une específicamente con un epítipo de IL-5Ralfa humano que comprende el resto de aminoácido Ile61 del dominio extracelular D1. La unión de anticuerpos con células transgénicas que expresaban una proteína IL-5Ralfa variante se determinó por citometría de flujo. Se muestran los perfiles de tinción fluorescente. "Policlona" y "MEDI-563" indican perfiles de tinción observados usando anticuerpos policlonales anti-IL-5Ralfa humano y MEDI-563, respectivamente. La "tinción doble" indica el perfil de tinción fluorescente para los anticuerpos policlonales (eje X) y MEDI-563 (eje Y). (A) se muestran los restos 50-61 del dominio extracelular D1 de IL-5Ralfa humano (restos 40-61 de SEC ID N^o 5). Los restos mostrados en cursiva son diferentes en la región correspondiente de la proteína IL-5Ralfa de ratón. Se expresó una serie de variantes de receptor IL-5Ralfa que comprendía al menos un resto de aminoácido mutante en células transgénicas. Las variantes de IL-5Ralfa de "anulación" fueron proteínas humanas mutantes que comprendían al menos una sustitución que intercambiaba con el resto humano el resto de ratón correspondiente. Por ejemplo, la variante de "anulación DE" es una proteína IL-5Ralfa humana que comprende las sustituciones de aminoácidos D56E y E58D. Las variantes de IL-5Ralfa "de introducción" fueron proteínas quiméricas que comprendían los dominios D1 de ratón, D2 humano, D3 de ratón y TM de ratón en los que el dominio D1 de ratón comprendía un Segmento B mutante que tenía al menos una sustitución que intercambiaba con un resto de ratón el resto humano correspondiente. Por ejemplo, la variante de "introducción DE" fue una proteína IL-5Ralfa quimérica que comprendía un Segmento B mutante de ratón en el que el Segmento B de ratón mutante comprendía las sustituciones de aminoácidos E56D y D58E. (B) MEDI-563 no se unió con células transgénicas que expresaban una proteína IL-5Ralfa humana mutante que comprendía las sustituciones de aminoácidos K53Q, D56E, E58D, 161 K ("anulación KDEI"). MEDI-563 se une específicamente con células transgénicas que expresan una proteína IL-5Ralfa humana mutante que comprende las sustituciones de aminoácidos N40H, N42D, Q46H ("anulación NNQ") o D56E, E58D ("anulación DE"), o N40H, N42D, D56E, E58D ("anulación NNDE"). (C) MEDI-563 se unió específicamente con células transgénicas que expresaban una proteína

IL-5R α quimérica que comprendía un Segmento B de ratón mutante en el que el Segmento B de ratón mutante comprendía las sustituciones de aminoácidos Q53K, E56D, D58E, K611 ("introducción KDE1"). (D) MEDI-563 no se unió con células transgénicas que expresaban una proteína IL-5R α humana mutante que comprendía la sustitución de aminoácidos 161 K ("anulación 161"). MEDI-563 se une específicamente con células transgénicas que expresan una proteína IL-5R α humana mutante que comprende la sustitución de aminoácidos K53Q ("anulación de K53"). (E) MEDI-563 se unió específicamente con células transgénicas que expresaban una proteína IL-5R α quimérica que comprendía un Segmento B de ratón mutante en el que el Segmento B de ratón mutante comprendía la sustitución de K611 ("introducción de 161"). MEDI-563 no se unió con células transgénicas que expresaban una proteína IL-5R α quimérica que comprendía un Segmento B de ratón mutante en el que el Segmento B de ratón mutante comprendía la sustitución de aminoácidos Q53K ("introducción de K53").

Figura 28. Unión de IL-5R α anti ratón quimérico (H7) con Fc γ R murinos: se midió la afinidad de unión de IL-5R α anti ratón quimérico (H7) por Fc γ R murinos recombinantes en comparación con un anticuerpo de control fucosilado de isotipo coincidente y se resume en esta figura. Se muestran las constantes de disociación (nM). Se realizaron mediciones por resonancia de plasmón superficial.

Figura 29. (A) Se identificaron eosinófilos por análisis citométrico de flujo como células con alta dispersión lateral que se tiñeron positivamente para CCR3 y Siglec-F. (B) IL-5R se expresó selectivamente por eosinófilos en médula ósea, sangre, bazo y tejido pulmonar de ratones IL-5Tg.

Figura 30. H7 tanto afuc como fuc agotó eosinófilos en el bazo (A), tejido pulmonar (A) y sangre (B) de ratones IL-5Tg. No se detectó empobrecimiento en la médula ósea (B). H7 afucosilado fue más potente en la retirada de eosinófilos en comparación con H7 fuc, especialmente a dosis de anticuerpo menores. Los datos se expresan como media $\pm$ ETM, n=6-8 ratones/grupo, p<0,05 tratado con anticuerpo en comparación con tratado con IgG de control, ensayo de U de Mann-Whitney.

Figura 31. H7 afuc también agota eosinófilos en un modelo de exposición a alérgeno. H7 afuc agotó eosinófilos en el lumen de las vías respiratorias, tejido pulmonar, sangre y médula ósea. El empobrecimiento fue mayor en todos los compartimentos 72 horas después de la exposición final (96 horas después del suministro de anticuerpos). Los datos se expresan como la media $\pm$ ETM, n=6 ratones/grupo, *p<0,05 tratado con anticuerpo en comparación con tratado con IgG de control, ensayo de U de Mann-Whitney.

Descripción detallada de la invención

Como se ha analizado anteriormente en el presente documento y sin quedar ligado a una hipótesis o teoría particular, los eosinófilos se han implicado en la patogénesis de numerosas enfermedades y trastornos. Muchas de estas enfermedades o trastornos se caracterizan por una sobreabundancia de eosinófilos (eosinofilia), y se denominan síndromes hipereosinófilos.

Son ejemplos no limitantes de enfermedades y trastornos en los que los eosinófilos desempeñan un papel: asma, alergia alimentaria mediada por inmunoglobulina (IgE), esofagitis eosinófila (inflamación del esófago), enfermedad inflamatoria del intestino, EPOC, colitis alérgica, reflujo gastroesofágico, enfermedad gastrointestinal eosinófila, (EGID), gastroenteritis eosinófila, fibrosis endomiocárdica, endocarditis de Loeffler, enfermedad de Davies, angioedema episódico asociado con eosinofilia, síndrome de eosinofilia-mialgia/síndrome del aceite tóxico español, cirrosis hepática, dermatitis herpetiforme, pemfigoide ampolloso, síndrome de Churg-Strauss, leucemia eosinófila mielógena aguda, leucemia eosinófila linfocítica aguda, mastocitosis sistémica con eosinofilia, rinitis alérgica, eccema, granulomatosis de Wegener, poliarteritis nodosa, fasciculitis eosinófila y artritis reumatoide.

En consecuencia, la invención proporciona un método para reducir los números de eosinófilos en un sujeto humano que comprende la administración a dicho paciente de una molécula de unión a IL-5R que comprende (a) una región que se une específicamente con IL-5R y (b) una región Fc de inmunoglobulina.

En una realización, la invención proporciona métodos para reducir el número de eosinófilos en un sujeto humano que comprenden la administración a dicho paciente de una molécula de unión a IL-5R que comprende (a) una región que se une específicamente con IL-5R y (b) una región Fc de inmunoglobulina. En una realización específica, un método de la invención reduce el número de eosinófilos en sangre, la médula ósea, el tracto gastrointestinal (por ejemplo, esófago, estómago, intestino delgado y colon) o pulmón. En otra realización específica, un método de la invención reduce el número de eosinófilos en sangre. En una realización específica adicional, un método de la invención reduce el número de eosinófilos de pulmón. En una realización específica, un método de la invención reduce el número de células precursoras de eosinófilos.

En otra realización, un método de la invención reduce el número de eosinófilos en al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 % o al menos aproximadamente 99 %. En una realización específica, un método de la invención reduce el número de eosinófilos

por debajo del límite de detección.

En otra realización, un método de la invención reduce el número de precursores de eosinófilos en al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 % o al menos aproximadamente 99 %. En una realización específica, un método de la invención reduce el número de precursores de eosinófilos por debajo del límite de detección.

En una realización adicional, un método de la invención elimina todos los eosinófilos detectables después de una única administración de una molécula de unión a IL-5R. En una realización específica, una única administración de una molécula de unión a IL-5R elimina todos los eosinófilos detectables durante al menos aproximadamente 1 día, al menos aproximadamente 2 días, al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 4 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 6 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 8 días, al menos aproximadamente 9 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 12 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 16 días, al menos aproximadamente 20 días, o al menos aproximadamente 25 días.

En una realización adicional, un método de la invención elimina todos los precursores eosinófilos detectables después de una única administración de una molécula de unión a IL-5R. En una realización específica, una única administración de una molécula de unión a IL-5R elimina todos los precursores de eosinófilos detectables durante al menos aproximadamente 1 día, al menos aproximadamente 2 días, al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 4 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 6 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 8 días, al menos aproximadamente 9 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 12 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 16 días, al menos aproximadamente 20 días, o al menos aproximadamente 25 días.

En una realización específica, el método de la invención comprende la administración a un sujeto de una única dosis de 0,03 mg/kg de una molécula de unión a IL-5R que comprende (a) una región que se une específicamente con IL-5R y (b) una región Fc de inmunoglobulina, en el que la administración de la molécula de unión a IL-5R conduce al agotamiento de al menos aproximadamente el 99 % de los eosinófilos de la circulación del sujeto, en el que el agotamiento es completo a las 24 horas después de la dosificación, y en el que el agotamiento dura al menos aproximadamente 28 días después de la dosificación.

En una realización específica, el método de la invención comprende la administración a un sujeto de una única dosis de 0,1 mg/kg de una molécula de unión a IL-5R que comprende (a) una región que se une específicamente con IL-5R y (b) una región Fc de inmunoglobulina, en el que la administración de la molécula de unión a IL-5R conduce al agotamiento de al menos aproximadamente el 99 % de los eosinófilos de la circulación del sujeto, en el que el agotamiento está completo a las 24 horas después de la dosificación, y en el que el agotamiento dura al menos aproximadamente 84 días después de la dosificación.

En una realización, las moléculas de unión a IL-5R de la presente invención incluyen proteínas de fusión. En ciertas realizaciones, las proteínas de fusión comprenden una región polipeptídica que se une específicamente con el IL-5R, y comprenden además una región Fc de inmunoglobulina. En las patentes de Estados Unidos N.º 7.109.299 y 5.677.280, publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2006/0014680 A, pueden encontrarse ejemplos no limitantes de una región polipeptídica que se une específicamente con el IL-5R. En otras realizaciones, la región polipeptídica que se une específicamente con el IL-5R es la IL-5 humana (véase, por ejemplo, Tanabi *et al.*, Journal of Biological Chemistry, 1987, Vol. 262, N.º 34, págs. 16580-16584), o fragmentos, derivados o variantes de la misma (véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos N.º 6.465.616).

En una realización, las moléculas de unión a IL-5R de la presente invención comprenden anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos sintéticos, anticuerpos multiespecíficos, (incluyendo anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, Fv monocatenarios (scFv) (incluyendo scFv biespecíficos), anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fv con enlaces disulfuro (sdFv) y fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos de la presente invención incluyen moléculas de inmunoglobulina y partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente con un antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

Los anticuerpos útiles de la presente invención pueden ser de cualquier origen animal incluyendo aves y mamíferos (por ejemplo, pero sin limitación, ser humano, murino, burro, oveja, conejo, cabra, cobaya, camello, caballo o pollo). En realizaciones específicas, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales humanos o humanizados.

Los anticuerpos útiles de la presente invención pueden ser monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos o de mayor multiespecificidad. Los anticuerpos multiespecíficos pueden unirse específicamente con diferentes epítopos de un polipéptido o pueden unirse específicamente tanto con un polipéptido como con un epítipo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo o material de soporte sólido. Véase, por ejemplo, publicaciones internacionales N.º WO 93/17715, WO 92/08802, WO 91/00360, y WO 92/05793; Tutt, *et al.*, 1991, J. Immunol. 147:60-69; patentes de Estados Unidos N.º 4.474.893, 4.714.681, 4.925.648, 5.573.920, y 5.601.819; y Kostelny *et al.*, 1992, J. Immunol. 148:1547-1553.

Los anticuerpos útiles en la presente invención pueden ser anticuerpos monocatenarios. El diseño y construcción de un anticuerpo monocatenario se describe en Marasco *et al.*, 1993, Proc Natl Acad Sci 90:7889-7893.

Pueden encontrarse ejemplos no limitantes de anticuerpos de la invención en las patentes de Estados Unidos N.º 7.179.464, 6.538.111, 6.018.032, y las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2004/0136996A1, 2005/0226867A1.

En una realización, las moléculas de unión a IL-5R de la presente invención comprenden anticuerpos. En una realización adicional, una molécula de unión a IL-5R de la presente invención es un anticuerpo que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEC ID N.º: 1-4. En una realización específica, una molécula de unión a IL-5R de la presente invención es un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID N.º: 1 y 3. En una realización específica, una molécula de unión a IL-5R de la presente invención es un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 2 y 4.

En una realización, una molécula de unión a IL-5R de la presente invención es un anticuerpo que se une específicamente con el mismo epítipo que MEDI-563. En una realización específica, el anticuerpo es MEDI-563. En una realización específica adicional, una molécula de unión a IL-5R de la presente invención es un anticuerpo que se une específicamente con el mismo epítipo que MEDI-563 siempre que el anticuerpo no sea MEDI-563.

En una realización, una molécula de unión a IL-5R de la presente invención es un anticuerpo que se une específicamente con un epítipo que comprende los restos 1-102 de SEC ID N.º:5. En una realización específica, el anticuerpo es MEDI-563. En una realización específica adicional, una molécula de unión a IL-5R de la presente invención es un anticuerpo que se une específicamente con un epítipo que comprende los restos 1-102 de SEC ID N.º:5 siempre que el anticuerpo no sea MEDI-563.

En una realización, una molécula de unión a IL-5R de la presente invención es un anticuerpo que se une específicamente con un epítipo que comprende los restos 40-67 de SEC ID N.º:5. En una realización específica, el anticuerpo es MEDI-563. En una realización específica adicional, una molécula de unión a IL-5R de la presente invención es un anticuerpo que se une específicamente con un epítipo que comprende los restos 40-67 de SEC ID N.º:5 siempre que el anticuerpo no sea MEDI-563.

En una realización, una molécula de unión a IL-5R de la presente invención es un anticuerpo que se une específicamente con un epítipo que comprende los restos 52-67 de SEC ID N.º:5. En una realización específica, el anticuerpo es MEDI-563. En una realización específica adicional, una molécula de unión a IL-5R de la presente invención es un anticuerpo que se une específicamente con un epítipo que comprende los restos 52-67 de SEC ID N.º:5 siempre que el anticuerpo no sea MEDI-563.

En una realización, una molécula de unión a IL-5R de la presente invención es un anticuerpo que se une específicamente con un epítipo que comprende el resto 61 de SEC ID N.º:5. En una realización específica, el anticuerpo es MEDI-563. En una realización específica adicional, una molécula de unión a IL-5R de la presente invención es un anticuerpo que se une específicamente con un epítipo que comprende el resto 61 de SEC ID N.º:5 siempre que el anticuerpo no sea MEDI-563.

En una realización, la molécula de unión a IL-5R de la presente invención es un anticuerpo que se une específicamente con un primer antígeno que comprende los restos 1-102 de SEC ID N.º:5 pero no se une específicamente con un segundo antígeno que comprende una variante de los restos 1-102 de SEC ID N.º:5 en el que la variante comprende la sustitución 161 K. En una realización específica, el anticuerpo es MEDI-563. En una realización específica adicional, una molécula de unión a IL-5R de la presente invención es un anticuerpo que se une específicamente con un primer antígeno que comprende los restos 1-102 de SEC ID N.º:5 pero no se une específicamente con un segundo antígeno que comprende una variante de los restos 1-102 de SEC ID N.º:5 en el que la variante comprende la sustitución 161 K, siempre que el anticuerpo no sea MEDI-563.

En una realización, una molécula de unión a IL-5R de la presente invención es un anticuerpo que se une

específicamente con un primer antígeno que comprende los restos 40-67 de SEC ID N°:5 pero no se une específicamente con un segundo antígeno que comprende una variante de los restos 40-67 de SEC ID N°:5 en el que la variante comprende la sustitución I61 K. En una realización específica, el anticuerpo es MEDI-563. En una realización específica adicional, una molécula de unión a IL-5R de la presente invención es un anticuerpo que se une específicamente con un primer antígeno que comprende los restos 40-67 de SEC ID N°:5 pero no se une específicamente con un segundo antígeno que comprende una variante de los restos 40-67 de SEC ID N°:5 en el que la variante comprende la sustitución 161 K, siempre que el anticuerpo no sea MEDI-563.

En una realización, una molécula de unión a IL-5R de la presente invención es un anticuerpo que se une específicamente con IL-5Ralfa humana (SEC ID N°:5) pero no se une específicamente con IL-5Ralfa humana mutante (SEC ID N°:5) que comprende la sustitución I61K. En una realización específica, el anticuerpo es MEDI-563. En una realización específica adicional, una molécula de unión a IL-5R de la presente invención es un anticuerpo que se une específicamente con IL-5Ralfa humana (SEC ID N°:5) pero no se une específicamente con IL-5Ralfa humana mutante (SEC ID N°:5) que comprende la sustitución 161K, siempre que el anticuerpo no sea MEDI-563.

La presente invención proporciona moléculas de unión a IL-5R con función efectora aumentada. Pueden encontrarse ejemplos no limitantes de métodos para aumentar la función efectora en las patentes de Estados Unidos N.º 5.624.821, 6.602.684, 7.029.872, publicaciones de solicitud de patentes de Estados Unidos N.º 2006/0067930A1, 2005/0272128A1, 2005/0079605A1, 2005/0123546A1, 2004/0072290A1, 2006/0257399A1, 2004/0261148A1, 2007/0092521, 2006/0040325A1 y 2006/0039904A1, y publicaciones de solicitud de patente internacional N.º WO 04/029207, WO03011878, WO05044859, WO 06071856 y WO 06071280.

Se conocen en la técnica métodos para modificar técnicamente regiones Fc de anticuerpos para alterar las funciones efectoras (por ejemplo, publicación de patente de Estados Unidos N.º 20040185045 y publicación de PCT N.º WO 2004/016750, ambas de Koenig *et al.*, que describen la alteración de la región de Fc para potenciar la afinidad de unión por FcγRIIB en comparación con la afinidad de unión por FcγRIIA; véase, también, publicaciones de PCT N.º WO 99/58572 de Armour *et al.*, WO 99/51642 de Idusogie *et al.*, y documento U.S. 6.395.272 de Deo *et al.*). También se conocen en la técnica métodos para modificar la región Fc para reducir la afinidad de unión por FcγRIIB (por ejemplo, publicación de patente de Estados Unidos N.º 20010036459 y publicación de PCT N.º WO 01/79299, ambas de Ravetch *et al.*).

También se han descrito anticuerpos modificados que tienen regiones Fc variantes con una afinidad de unión potenciada por FcγRIIA y/o FcγRIIB en comparación con una región Fc de tipo silvestre (por ejemplo, publicaciones de PCT N.º WO 2004/063351, de Stavenhagen *et al.*).

La función efectora de anticuerpo también puede modificarse mediante la generación de anticuerpos con patrones de glucosilación alterados. Por ejemplo, puede prepararse un anticuerpo que tiene un tipo de glucosilación alterado, tal como un anticuerpo afucosilado/hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de restos de fucosilo de un anticuerpo que tiene estructuras de GlcNAc de bisección aumentadas. Se ha demostrado que dichos patrones de glucosilación alterados aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Dichas modificaciones de carbohidratos pueden conseguirse, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula hospedadora con maquinaria de glucosilación alterada. Se han descrito células con maquinaria de glucosilación alterada en la técnica y pueden usarse como células hospedadoras en las que expresar anticuerpos recombinantes de la invención para producir de este modo un anticuerpo con glucosilación alterada. Por ejemplo, el documento EP 1.176.195 de Hanai *et al.* describe una línea celular con un gen de FUT8 alterado funcionalmente, que codifica una fucosil transferasa, de modo que los anticuerpos expresados en dicha línea celular muestran hipofucosilación. La publicación de PCT WO 03/035835 de Presta describe una línea celular CHO variante, células Lec13, con capacidad reducida para unir fucosa con carbohidratos unidos a Asn(297), que también da como resultado hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula hospedadora (véase también Shields, R. L. *et al.* (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740). La publicación de PCT WO 99/54342 de Umana *et al.* describe líneas celulares modificadas técnicamente para expresar glucosil transferasas modificadoras de glucoproteínas (por ejemplo, beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de modo que los anticuerpos expresados en las líneas celulares modificadas técnicamente muestran estructuras de GlcNAc de bisección aumentadas que dan como resultado una actividad ADCC aumentada de los anticuerpos (véase también Umana *et al.* (1999) Nat. Biotech. 17:176-180).

Se conocen en la técnica métodos para generar anticuerpos con glucoformas alteradas, e incluyen pero sin limitación los descritos en Umana *et al.*, 1999, Nat. Biotechnol 17:176-180; Davies *et al.*, 20017 Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields *et al.*, 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa *et al.*, 2003, J Biol Chem 278:3466-3473) patente de Estados Unidos N.º 6.602.684; N.º de serie de Estados Unidos 10/277.370; N.º de serie de Estados Unidos 10/113.929; documentos PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/292246A1; PCT WO 02/311140A1; PCT WO 02/30954A1; tecnología Potillegent™ (Biowa, Inc. Princeton, N.J.); tecnología de modificación por glucosilación GlycoMab™ (GLYCART biotechnology AG, Zúrich, Suiza). Véase, por ejemplo, documentos WO 00061739; EA01229125; US 200301 15614; Okazaki *et al.*, 2004, JMB, 336: 1239-49. También pueden prepararse anticuerpos con patrón de fucosilación alterado por la retirada post traduccional de fucosa (por ejemplo con una enzima fucosidasa).

La presente invención proporciona anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que se unen específicamente con IL-5R que tienen una semivida extendida *in vivo*. En particular, la presente invención proporciona anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que tienen una semivida en un mamífero (por ejemplo, pero sin limitación, un ser humano), de más de 3 días, más de 7 días, más de 10 días, más de 15 días, más de 25 días, más de 30 días, más de 35 días, más de 40 días, más de 45 días, más de 2 meses, más de 3 meses, más de 4 meses, o más de 5 meses.

Para prolongar la circulación en suero de los anticuerpos (por ejemplo, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales y anticuerpos monocatenarios) o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, pero sin limitación, fragmentos Fab) *in vivo*, por ejemplo, pueden unirse moléculas poliméricas inertes tales como polietilenglicol (PEG) de alto peso molecular con los anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpos de los mismos) con o sin un enlazador multifuncional bien mediante conjugación específica de sitio del PEG con el extremo N o C terminal de los anticuerpos o bien mediante grupos amino-épsilon presentes en restos de lisina. Se usará derivatización de polímeros lineales o ramificados que da como resultado pérdida mínima de la actividad biológica. El grado de conjugación puede controlarse estrechamente por SDS-PAGE y espectrometría de masas para asegurar la conjugación apropiada de moléculas de PEG con los anticuerpos. El PEG que no ha reaccionado puede separarse de los conjugados de anticuerpos-PEG por cromatografía de exclusión por tamaño o de intercambio iónico. Los anticuerpos derivatizados con PEG (incluyendo fragmentos de anticuerpos de los mismos) pueden ensayarse con respecto a la actividad de unión así como con respecto a la eficacia *in vivo* usando métodos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, mediante inmunoensayos descritos en el presente documento.

También pueden generarse anticuerpos que tienen una semivida *in vivo* aumentada introduciendo una o más modificaciones de aminoácidos (es decir, sustituciones, inserciones o deleciones) en un dominio constante IgG, o fragmento de unión a FcRn del mismo (por ejemplo, Fc o fragmento de dominio Fc de bisagra). Véase, por ejemplo, publicación internacional N.º WO 98/23289; publicación internacional N.º WO 97/34631; y patente de Estados Unidos N.º 6.277.375.

Además, los anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpo de los mismos) pueden conjugarse con albúmina para hacer al anticuerpo (incluyendo fragmento de anticuerpo del mismo) más estable *in vivo* o que tenga una semivida más larga *in vivo*. Las técnicas se conocen bien en este campo, véase por ejemplo, publicación internacional N.º WO 93/15199, WO 93/15200 y WO 01/77137; y patente europea N.º EP 413.622.

La presente invención proporciona moléculas de unión a IL-5R que se unen específicamente con IL-5R, en las que las moléculas de unión se fusionan de forma recombinante o se conjugan de forma química (incluyendo conjugaciones tanto covalentes como no covalentes) con una proteína o un polipéptido heterólogo (o fragmento de un polipéptido de al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos) para generar proteínas de fusión. En particular, la invención proporciona formulaciones de proteínas de fusión que comprenden un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo descrito en el presente documento. (por ejemplo, pero sin limitación, un fragmento Fab, fragmento Fd, fragmento Fv, fragmento F(ab)2, un dominio VH, una CDR VH, un dominio VL o una CDR VL) y una proteína, un polipéptido o un péptido heterólogo. Se conocen en la técnica métodos para fusionar o conjugar proteínas, polipéptidos o péptidos con un anticuerpo (incluyendo fragmentos de anticuerpo del mismo). Véase, por ejemplo, patentes de Estados Unidos N.º 5.336.603, 5.622.929, 5.359.046, 5.349.053, 5.447.851 y 5.112.946, patentes europeas N.º EP 307.434 y EP 367.166; publicaciones internacionales N.º WO 96/04388 y WO 91/06570; Ashkenazi *et al.*, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535-10539; Zheng *et al.*, 1995, J. Immunol. 154:5590-5600; y Vil *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337- 11341.

Pueden generarse proteínas de fusión adicionales mediante las técnicas de combinación de genes, combinación de motivos, combinación de exones y/o combinación de codones (denominadas colectivamente "combinación de ADN"). La combinación de ADN puede emplearse para alterar las actividades de anticuerpos de la invención o fragmentos de los mismos (por ejemplo, pero sin limitación, anticuerpos o fragmentos de los mismos con mayores afinidades y menores velocidades de disociación). Véase, en general, patentes de Estados Unidos N.º 5.605.793, 5.811.238, 5.830.721, 5.834.252 y 5.837.458; Patten *et al.*, 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33; Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16(2):76-82; Hansson, *et al.*, 1999, J. Mol. Biol. 287:265-76; y Lorenzo y Blasco, 1998, Biotechniques 24(2):308- 313. Los anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpo de los mismos), o los anticuerpos codificados o fragmentos de los mismos, pueden alterarse sometiéndolos a mutagénesis aleatoria por PCR propensa a errores, inserción de nucleótidos aleatorios u otros métodos antes de la recombinación. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo (incluyendo fragmento de anticuerpo del mismo) del mismo puede recombinarse con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc., de una o más moléculas heterólogas.

Además, los anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpo de los mismos) pueden fusionarse con secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar la purificación. La secuencia de aminoácidos marcadora puede ser un péptido de hexa histidina tal como el marcador proporcionado en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales están disponibles en el mercado. Como se describe en Gentz *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824, por ejemplo., la hexa histidina proporciona

purificación conveniente de la proteína de fusión. Otros marcadores peptídicos útiles para la purificación incluyen, pero sin limitación, el marcador de hemaglutinina ("HA"), que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson *et al.*, 1984, Cell 37:767), y el marcador "flag".

En otras realizaciones, los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de los mismos se conjugaron con un agente de diagnóstico o detectable. Dichos anticuerpos pueden ser útiles para controlar o pronosticar la aparición, el desarrollo, la progresión y/o la gravedad de una enfermedad o un trastorno (por ejemplo, pero sin limitación, un trastorno autoinmunitario) como parte de un procedimiento de ensayo clínico, tal como determinar la eficacia de una terapia particular. Dicho diagnóstico y detección pueden conseguirse acoplando el anticuerpo con sustancias detectables incluyendo, pero sin limitación, diversas enzimas, tales como, pero sin limitación, peroxidasa de rábano rusticano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos, tales como, pero sin limitación, estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como, pero sin limitación, umbeliferona, fluoresceína, fluoresceína isotiocianato, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminiscentes, tales como, pero sin limitación, luminol; materiales bioluminiscentes tales como, pero sin limitación, luciferasa, luciferina, y aequorina; materiales radiactivos, tales como, pero sin limitación, yodo (131I, 125I, 123I y 124I), carbono (14C), azufre (35S), tritio (3H), indio (115In, 113In, 112In y 111In), tecnecio (99Tc), talio (201Tl), galio (68Ga, 67Ga), paladio (103Pd), molibdeno (99Mo), xenón (133Xe), flúor (18F), 153Sm, 177Lu, 159Gd, 149Pm, 140La, 175Yb, 166Ho, 90Y, 47Sc, 186Re, 188Re, 142Pr, 105Rh, 97Ru, 68Ge, 57Co, 65Zn, 85Sr, 32P, 153Gd, 169Yb, 51Cr, 54Mn, 75Se, 113Sn y 177Sn; y metales emisores de positrones usando diversas tomografías de emisión de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos.

Como alternativa, un anticuerpo puede conjugarse con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo como se describe por Segal en patente de Estados Unidos. 4.676.980.

El resto terapéutico o fármaco conjugado con un antígeno de interés (por ejemplo IL-5R) o fragmento del mismo debería elegirse para conseguir el efecto o los efectos terapéuticos o profilácticos deseados para una enfermedad o un trastorno particular, por ejemplo, una enfermedad o un trastorno asociado con o caracterizado por expresión y/o actividad aberrante de un polipéptido de interferón alfa, una enfermedad o un trastorno asociado con o caracterizado por la expresión y/o actividad aberrante del receptor de interferón alfa o una o más subunidades del mismo, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad autoinmunitaria, rechazo de trasplantes, enfermedad de injerto contra hospedador, o uno o más síntomas de los mismos, en un sujeto. Un personal clínico u otro médico deberían considerar lo siguiente cuando decida qué conjugar con un anticuerpo de interés, por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente con un polipéptido de interferón alfa o fragmento del mismo: la naturaleza de la enfermedad, la gravedad de la enfermedad y la condición del sujeto.

Los anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpo de los mismos) que se unen específicamente con un antígeno pueden producirse por cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular por síntesis química o por técnicas de expresión recombinante (véase, publicación de patente de Estados Unidos 2007/0014724A1).

Pueden producirse anticuerpos policlonales específicos para un antígeno por diversos procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un antígeno humano puede administrarse a diversos animales hospedadores incluyendo, pero sin limitación, conejos, ratones, ratas, etc., para inducir la producción de sueros que contienen anticuerpos policlonales específicos para el antígeno humano. Pueden usarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie hospedadora, e incluyen, pero sin limitación, Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Tales adyuvantes también se conocen bien en la técnica.

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales usando una amplia diversidad de técnicas conocidas en este campo incluyendo el uso de hibridoma, tecnologías recombinantes y de presentación en fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos monoclonales usando técnicas de hibridoma incluyendo las conocidas en este campo diseñadas, por ejemplo, en Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling, *et al.*, en: Monoclonal Antibodies y T Cell Hybridomas 563 681 (Elsevier, N.Y., 1981), y Harlow *et al.*, Using Antibodies: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999). La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento no se limita a anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridoma. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que deriva de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota o de fago, y no al método por el que se produce.

Los métodos para producir y explorar con respecto a anticuerpos específicos usando tecnología de hibridoma son rutinarios y se conocen bien en la técnica. Brevemente, los ratones pueden inmunizarse con un antígeno no murino y una vez que se ha detectado una respuesta inmunitaria, por ejemplo, se detectan anticuerpos específicos para el antígeno en el suero de ratón, se recoge el bazo del ratón y se aíslan esplenocitos. Los esplenocitos se fusionan después por técnicas bien conocidas con cualquier célula de mieloma adecuada, por ejemplo células de la línea

celular SP20 disponibles de la ATCC. Los hibridomas se seleccionan y se clonan por dilución limitada. Adicionalmente, puede usarse una técnica RIMMS (sitios múltiples de inmunización repetitiva) para inmunizar a un animal (Kilpatrick *et al.*, 1997, Hybridoma 16:381-9). Los clones de hibridoma se ensayan después por métodos conocidos en la técnica con respecto a células que secretan anticuerpos capaces de unirse con un polipéptido de la invención. Puede generarse líquido ascítico, que generalmente contiene altos niveles de anticuerpos, inmunizando ratones con clones de hibridoma positivos.

La presente invención 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 invención en el que el hibridoma se genera fusionando esplenocitos aislados de un ratón inmunizado con un antígeno no murino con células de mieloma y explorando después los hibridomas resultantes de la fusión con respecto a clones de hibridoma que secretan un anticuerpo capaz de unirse con el antígeno.

Pueden generarse fragmentos de anticuerpo que reconocen epítomos particulares específicos por cualquier técnica conocida por expertos en la materia. Por ejemplo, pueden producirse fragmentos Fab y F(ab')₂ de la invención por escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Los fragmentos F(ab')₂ contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada. Además, los anticuerpos de la presente invención también pueden generarse usando diversos métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica.

En métodos de presentación en fagos, se presentan dominios de anticuerpo funcionales en la superficie de partículas de fago que portan las secuencias de polinucleótidos que las codifican. En particular, se amplifican las secuencias de ADN que codifican dominios VH y VL de bibliotecas de ADNc de animales (por ejemplo, bibliotecas de ADNc humano o murino de tejidos afectados). El ADN que codifica los dominios VH y VL se recombinan junto con un enlazador de scFv por PCR y se clonan en un vector fagémido. El vector se introduce por electroforación en *E. coli* y la *E. coli* se infecta con fago auxiliar. Los fagos usados en estos métodos son típicamente fagos filamentosos incluyendo fd y M 13 y los dominios VH y VL se fusionan habitualmente de forma recombinante con el gen III o gen VIII de fago. El fago que expresa un dominio en un antígeno que se une con un antígeno particular puede seleccionarse o identificarse con antígeno, por ejemplo, usando antígeno marcado o antígeno unido con o capturado en una superficie sólida o perla. Los ejemplos de métodos de presentación de fagos que pueden usarse para realizar los anticuerpos de la presente invención incluyen los desvelados en Brinkman *et al.*, 1995, J. Immunol. Methods 182:41-50; Ames *et al.*, 1995, J. Immunol. Methods 184:177-186; Kettleborough *et al.*, 1994, Eur. J. Immunol. 24:952-958; Persic *et al.*, 1997, Gene 187:9-18; Burton *et al.*, 1994, Advances in Immunology 57:191-280; solicitud internacional N.º PCT/GB91/01 134; publicaciones internacionales N.º WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982, WO 95/20401 y WO97/13844; y patentes de Estados Unidos N.º 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, 5.969.108, 6.33.187, 5.824.520 y 5.702.892.

Como se ha descrito en las referencias anteriores, después de la selección de fagos, las regiones codificantes de anticuerpo de los fagos pueden aislarse y usarse para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado, y expresarse en cualquier hospedador deseado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levadura y bacterias, por ejemplo, como se describe posteriormente. También pueden emplearse técnicas para producir de forma recombinante Fab, Fab' y F(ab')₂ usando métodos conocidos en este campo tales como los desvelados en la publicación de PCT N.º WO 92/22324; Mullinax *et al.*, 1992, BioTechniques 12(6):864-869; Sawai *et al.*, 1995, AJRI 34:26-34; y Better *et al.*, 1988, Science 240:1041-1043.

Para generar anticuerpos completos, pueden usarse cebadores de PCR incluyendo secuencias de nucleótidos de VH o VL, un sitio de restricción, y una secuencia flanqueante para proteger el sitio de restricción para amplificar las secuencias de VH o VL en clones de scFv. Utilizando técnicas de clonación conocidas por los expertos en la materia, los dominios VH amplificados por PCR pueden clonarse en vectores que expresan una región constante VH, por ejemplo, la región constante gamma 4 humana, y los dominios VL amplificados por PCR pueden clonarse en vectores que expresan una región constante VL, por ejemplo, regiones constantes kappa o lambda humanas. Los vectores para expresar los dominios VH o VL pueden comprender un promotor de EF-1 α , una señal de secreción, un sitio de clonación para el dominio variable, dominios constantes y un marcador de selección tal como neomicina. Los dominios VH y VL también pueden clonarse en un vector que exprese las regiones constantes necesarias. Los vectores de conversión de cadena pesada y los vectores de conversión de cadena ligera se cotransfectan después en líneas celulares para generar líneas celulares estables o transitorias que expresan anticuerpos de longitud completa, por ejemplo, pero sin limitaciones, IgG, usando técnicas conocidas por los expertos en la materia.

Para algunos usos, incluyendo uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos y ensayos de detección *in vitro*, puede ser apropiado usar anticuerpos humanizados o anticuerpos quiméricos. Son particularmente deseables anticuerpos completamente humanos y anticuerpos humanizados para tratamiento terapéutico de sujetos humanos. Pueden prepararse anticuerpos humanos por una diversidad de métodos conocidos en la técnica incluyendo métodos de presentación en fagos descritos anteriormente usando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. Véase también patentes de Estados Unidos N.º 4.444.887 y 4.716.111; y publicaciones

internacionales N.º WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741.

También pueden producirse anticuerpos humanos usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, los complejos de genes de inmunoglobulina de cadena pesada y cadena ligera pueden introducirse aleatoriamente o por recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Como alternativa, la región variable humana, región constante y región de diversidad pueden introducirse en células madre embrionarias de ratón además de los genes de cadena pesada y ligera humanos. Los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera de ratón pueden hacerse no funcionales por separado o simultáneamente con la introducción de loci de inmunoglobulina humana por recombinación homóloga. En particular, la delección homocigota de la región JH evita la producción de anticuerpos endógena. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y se microinyectan en blastocistos para producir ratones quiméricos. Los ratones quiméricos se crían después para producir una descendencia homocigota que expresa anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan de una manera normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o una parte de un polipéptido de la invención. Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno de los ratones inmunizados, transgénicos, usando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados por los ratones transgénicos se reordenan durante la diferenciación de linfocitos B, y posteriormente experimentan cambio de clase y mutación somática. Por lo tanto, usando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión de conjunto de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar (1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93). Para un análisis detallado de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir dichos anticuerpos, véase, por ejemplo, publicaciones internacionales N.º WO 98/24893, WO 96/34096 y WO 96/33735; y patentes de Estados Unidos N.º 5.413.923, 5.625.126, 5.633.425, 5.569.825, 5.661.016, 5.545.806, 5.814.318 y 5.939.598. Además, puede contactarse con compañías tales como Abgenix, Inc. (Freemont, CA) y Genpharm (San Jose, CA) para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando tecnología similar a la descrita anteriormente.

Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes partes del anticuerpo derivan de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos quiméricos. Véase, por ejemplo, Morrison, 1985, *Science* 229:1202; Oi *et al.*, 1986, *BioTechniques* 4:214; Gillies *et al.*, 1989, *J. Immunol. Methods* 125:191-202; y patente de Estados Unidos N.º 5.807.715, 4.816.567, 4.816.397 y 6.331.415.

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo o su variante o fragmento del mismo que es capaz de unirse con un antígeno predeterminado y que comprende una región marco conservada que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y una CDR que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana. 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 conservadas corresponden a las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. En una realización, un anticuerpo humanizado también comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Habitualmente, el anticuerpo contendrá 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. El anticuerpo humanizado puede seleccionarse de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Habitualmente el dominio constante es un dominio constante de fijación del complemento en el que se desea que el anticuerpo humanizado muestre actividad citotóxica, y la clase es típicamente IgG1. Cuando dicha actividad citotóxica no es deseable, el dominio constante puede ser de la clase IgG2. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y la selección de dominios constantes particulares para optimizar funciones efectoras deseadas está dentro de la experiencia habitual de la técnica. No es necesario que las regiones marco conservadas y CDR de un anticuerpo humanizado correspondan con precisión a las secuencias parentales, por ejemplo, la CDR donante o el marco conservado consenso pueden mutarse por sustitución, inserción o delección de al menos un resto de modo que el resto de CDR o marco conservado en ese sitio no corresponda al anticuerpo consenso o al importado. Dichas mutaciones, sin embargo, no serán extensivas. Habitualmente, al menos el 75 % de los restos de anticuerpo humanizado corresponderán a los de las secuencias marco conservado y CDR parentales, con más frecuencia 90 %, y más del 95 %. Puede producirse anticuerpo humanizado usando una diversidad de técnicas conocidas en este campo, incluyendo pero sin limitación, injerto de CDR (patente europea N.º EP 239.400; publicación internacional N.º WO 91/09967; y patentes de Estados Unidos N.º 5.225.539, 5.530.101 y 5.585.089), revestimiento o cambio de superficie (patentes europeas N.º EP 592.106 y EP 519.596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498; Studnicka *et al.*, 1994, *Protein Engineering* 7(6):805-814; y Roguska *et al.*, 1994, *PNAS* 91:969-973), redistribución de cadenas (patente de Estados Unidos N.º 5.565.332), y técnicas desveladas, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N.º 6.407.213, patente de Estados Unidos N.º 5.766.886, documento WO 9317105, Tan *et al.*, *J. Immunol.* 169:1119-25 (2002), Caldas *et al.*, *Protein Eng.* 13(5):353-60 (2000), Morea *et al.*, *Methods* 20(3):267-79 (2000), Baca *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272(16):10678-84 (1997), Roguska *et al.*, *Protein Eng.* 9(10):895-904 (1996), Couto *et al.*, *Cancer Res.* 55 (23 Supp):5973s-5977s (1995), Couto *et al.*, *Cancer Res.* 55(8):1717-22 (1995), Sandhu

- JS, *Gene* 150(2):409-10 (1994), y Pedersen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 235(3):959-73 (1994). Con frecuencia, los restos marco conservados en las regiones marco conservadas se sustituirán con el resto correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, preferentemente mejorar, la unión a antígeno. Estas sustituciones de marco conservado se identifican por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, pero sin limitación, por modelización de las interacciones de los restos de CDR y marco conservado para identificar restos de marco conservado importantes para la unión a antígeno y comparación de secuencias para identificar restos de marco conservado poco habituales en posiciones particulares (véase, por ejemplo, Queen *et al.*, patente de Estados Unidos N.º 5.585.089; y Riechmann *et al.*, 1988, *Nature* 332:323).
- 5 Pueden introducirse anticuerpos de único dominio, por ejemplo, anticuerpos que carecen de las cadenas ligeras, por métodos bien conocidos en la técnica. Véase Riechmann *et al.*, 1999, *J. Immuno.* 231:25-38; Nuttall *et al.*, 2000, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 1(3):253-263; Muylderan, 2001, *J. Biotechnol.* 74(4):277302; Patente de Estados Unidos N.º 6.005.079; y publicaciones internacionales N.º WO 94/04678, WO 94/25591, y WO 01/44301.
- 10 Además, los anticuerpos que se unen específicamente con un antígeno (por ejemplo IL-5R) pueden, a su vez, utilizarse para generar anticuerpos antiidiotípicos que "imitan" un antígeno usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Greenspan y Bona, 1989, *FASEB J.* 7(5):437-444; y Nissinoff, 1991, *J. Immunol.* 147(8):2429-2438).
- 15 La expresión recombinante de un anticuerpo de la invención (por ejemplo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo de la invención o un fragmento del mismo o un anticuerpo monocatenario de la invención) puede requerir la construcción de un vector de expresión que contenga un polinucleótido que codifica el anticuerpo. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo, cadena pesada o ligera de un anticuerpo, o fragmento del mismo, el vector para la producción de la molécula de anticuerpo puede producirse por tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en este campo. Por lo tanto, se describen en el presente documento métodos para preparar una proteína expresando un polinucleótido que contenga una secuencia de nucleótidos que codifique un anticuerpo. Métodos los cuales Sons, NY (1993); Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990); y en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli *et al.* (eds), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin *et al.*, 1981, *J. Mol. Biol.* 150:1.
- 20 Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo se pueden incrementar mediante la amplificación del vector (para consultar un artículo de revisión, véase Bebbington y Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Vol.3. (Academic Press, Nueva York, 1987)). Cuando un marcador en el sistema de vector que expresa el anticuerpo es amplificable, un incremento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula hospedadora incrementará el número de copias del gen marcador. Ya que la región amplificada está asociada se conocen bien por los expertos en la materia pueden usarse para construir vectores de expresión que contengan secuencias codificantes de anticuerpo y señales de control de la transcripción y la traducción apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. La invención, por lo tanto, proporciona vectores replicables que comprender una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpo de la invención, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, un dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo (incluyendo fragmento de anticuerpo del mismo) o una CDR de cadena pesada o ligera, unida operativamente con un promotor. Dichos vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véase, por ejemplo, publicación internacional N.º WO 86/05807; publicación internacional N.º WO 89/01036; y patente de Estados Unidos N.º 5.122.464) y el dominio variable del anticuerpo puede clonarse en dicho vector para expresión de la cadena pesada completa, la cadena ligera completa, o las cadenas tanto pesada como ligera completas.
- 25 El vector de expresión se transfiere a una célula hospedadora por técnicas convencionales y las células transfectadas se cultivan después por técnicas convencionales para producir un anticuerpo de la invención. Por lo tanto, la invención incluye células hospedadoras que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la invención o fragmentos del mismo, o una cadena pesada o ligera del mismo, o fragmento del mismo, o un anticuerpo monocatenario de la invención unido operativamente con un promotor heterólogo. En realizaciones específicas para la expresión de anticuerpos de doble cadena, pueden coexpresarse vectores que codifican las cadenas tanto pesada como ligera en la célula hospedadora para expresión de la molécula de inmunoglobina completa, como se detalla posteriormente.
- 30 Puede utilizarse una diversidad de sistemas de vector de expresión-hospedador para expresar las moléculas de anticuerpo de la invención (véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos N.º 5.807.715). Dichos sistemas de expresión-hospedador representan vehículos por los que las secuencias codificantes de interés pueden producirse y posteriormente purificarse, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, expresar una molécula de anticuerpo de la divulgación *in situ*. Estos incluyen pero sin limitación microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, pero sin limitación, *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago, ADN plasmínico o ADN cosmídico que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; levadura (por ejemplo, pero sin limitación, *Saccharomyces*,

Pichia) transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus (por ejemplo, pero sin limitación, baculovirus) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, pero sin limitación, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión plasmídicos recombinantes (por ejemplo, pero sin limitación, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; o sistema celulares de mamíferos (por ejemplo, pero sin limitación, células COS, CHO, BHK, 293, NSO y 3T3) que albergan construcciones de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, pero sin limitación, promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, pero sin limitación, el promotor tardío de adenovirus; el promotor de 7,5K de virus *vaccinia*). Se usan células bacterianas tales como *Escherichia coli*, y células eucariotas, especialmente para la expresión de molécula de anticuerpo recombinante completa, para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector tal como el elemento promotor de gen temprano intermedio principal de citomegalovirus humano es un sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foecking *et al.*, 1986, Gene 45:101; y Cockett *et al.*, 1990, Bio/Technology 8:2). En una realización específica, la expresión de secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos de la invención, derivados, análogos o fragmentos de los mismos está regulada por un promotor constitutivo, promotor inducible o promotor específico de tejido.

En sistemas bacterianos, varios vectores de expresión pueden seleccionarse provechosamente dependiendo del uso pretendido para la molécula de anticuerpo que se expresa. Por ejemplo, cuando va a producirse una gran cantidad de dicho anticuerpo, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirijan la expresión de altos niveles de productos proteicos de fusión que se purifiquen fácilmente. Dichos vectores incluyen, pero sin limitación, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther *et al.*, 1983, EMBO 12:1791), en el que la secuencia codificante de anticuerpo puede ligarse individualmente en el vector en fase con la región codificante de lac Z de modo que se produzca una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye e Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke y Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509); y similares. También pueden usarse vectores pGEX para expresar polipéptidos ajenos como proteínas de fusión con glutatión 5-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas por adsorción y unión con perlas de agarosa de glutatión de matriz seguido de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores de pGEX se diseñan para incluir sitios de escisión por proteasa de trombina o factor Xa, de modo que el producto génico diana clonado pueda liberarse del resto de GST.

En un sistema de insecto, se usa el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) para expresar genes ajenos. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante de anticuerpo puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo el gen de polihedrina) del virus y colocarse bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo el promotor de polihedrina).

En células hospedadoras de mamífero, pueden utilizarse varios sistemas de expresión basados en virus. En casos en los que se use un adenovirus como un vector de expresión, la secuencia codificante de anticuerpo de interés puede ligarse con un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, la secuencia líder tripartita y promotora tardía. Este gen quimérico puede insertarse después en el genoma de adenovirus por recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de anticuerpo en hospedadores infectados (por ejemplo, véase Logan y Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359). También pueden requerirse señales de inicio específicas para la traducción eficaz de secuencias codificantes de anticuerpo insertadas. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de inicio debe estar en fase con la fase de lectura de la secuencia codificante deseada para asegurar la traducción del inserto completo. Estas señales de control de la traducción exógenas y codones de inicio pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de expresión puede potenciarse mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción, etc. (véase, por ejemplo, Bittner *et al.*, 1987, Methods in Enzymol. 153:51-544).

Además, puede seleccionarse una cepa de célula hospedadora que module la expresión de las secuencias insertadas, o modifique y procese el producto génico de la manera específica deseada. Dichas modificaciones (por ejemplo, pero sin limitación, glucosilación) y procesamiento (por ejemplo, pero sin limitación, escisión) de productos proteicos puede ser importante para la función de la proteína. Diferentes células hospedadoras tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento postraduccional y la modificación de proteínas y productos génicos. Podrían seleccionarse líneas celulares o sistemas de hospedadores apropiados para asegurar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína ajena expresada. Para este fin, pueden usarse células hospedadoras eucariotas que posean la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario, glucosilación y fosforilación del producto génico. Dichas células hospedadoras de mamífero incluyen pero sin limitación células CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, NS0 (una línea celular de mieloma murina que no produce de forma endógena ninguna cadena de inmunoglobulina), CRL7030 y Hs578Bst.

Para producción de alto rendimiento, a largo plazo, de proteínas recombinantes, puede usarse expresión estable. Por ejemplo, pueden modificarse técnicamente líneas celulares que expresen de forma estable la molécula de anticuerpo. En lugar de usar vectores de expresión que contengan orígenes virales de replicación, las células hospedadoras pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN ajeno, puede permitirse que las células modificadas técnicamente crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido, y después se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite a las células integrar de forma estable el plásmido en sus cromosomas y crecer para formar focos que a su vez puedan clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método puede usarse provechosamente para modificar técnicamente líneas celulares que expresen la molécula del anticuerpo. Dichas líneas celulares modificadas técnicamente pueden ser particularmente útiles en la exploración y evaluación de composiciones que interaccionen directa o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

En una realización, la línea celular usada para expresar la molécula de unión a IL-5R es una célula que no fucosila la región Fc de la molécula de unión a IL-5R. Se encuentran ejemplos no limitantes de estos tipos de células en la patente de Estados Unidos N.º 6.946.292 y publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos N.º. 2006/0078991A1, 2004/0110282A1, 2006/0024800A1, 2005/0216958A1, 2004/0132140 y 2004/0259150. En una realización específica, la molécula de unión a IL-5R es un anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado, afucosilado, anti cadena α de IL-5R. En una realización específica adicional, el anticuerpo es MEDI-563 (también conocido como BIW-8405). En una realización específica adicional más, el anticuerpo no es MEDI-563.

Pueden usarse varios sistemas de selección, incluyendo, pero sin limitación, emplear los genes de timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler *et al.*, 1977, Cell 11:223), hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202), y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy *et al.*, 1980, Cell 22:8-17) en células tk-, hprt- o aprt-, respectivamente. Además, puede usarse resistencia a antimetabolitos como la base de selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler *et al.*, 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77:357; O'Hare *et al.*, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527); gpt, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan y Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 (Wu y Wu, 1991, Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, 1993, Science 260:926-932; y Morgan y Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217; May, 1993, TIB TECH 11(5): 155-2 15); e higo, que confiere resistencia a higromicina (Santerre *et al.*, 1984, Gene 30:147). Pueden aplicarse rutinariamente métodos conocidos habitualmente en la técnica de tecnología de ADN recombinante para seleccionar el clon recombinante deseado, y dichos métodos se describen, por ejemplo, en Ausubel *et al.* (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer y Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); y en los capítulos 12 y 13, Dracopoli *et al.* (eds), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin *et al.*, 1981, J. Mol. Biol. 150:1.

Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo pueden aumentarse por amplificación de vector (para una revisión véase Bebbington y Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol.3. (Academic Press, Nueva York, 1987)). Cuando un marcador en el sistema de vector que expresa anticuerpo es amplificable, el aumento del nivel de inhibidor presente en cultivo de células hospedadoras aumentará el número de copias del gen marcador. Ya que la región amplificada se asocia con el gen de anticuerpo, también aumentará la producción del anticuerpo (Crouse *et al.*, 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257).

La célula hospedadora puede cotransfectarse con dos vectores de expresión de la invención, codificando el primer vector un polipéptido derivado de cadena pesada y codificando el segundo vector un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten la expresión igual de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Como alternativa, puede usarse un único vector que codifica, y es capaz de expresar, polipéptidos tanto de cadena pesada como ligera. En dichas situaciones, la cadena ligera debería colocarse antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, 1986, Nature 322:52; y Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2 197). Las secuencias codificantes para las cadenas pesadas y ligeras pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez que se ha producido una molécula de anticuerpo de la invención por expresión recombinante, se puede purificar por cualquier método conocido en la técnica para purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía, (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad por el antígeno específico después de proteína A y cromatografía en columna por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o por cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de los mismos pueden fusionarse con secuencias polipeptídicas heterólogas descritas en el presente documento o conocidas de otro modo en la técnica para facilitar la purificación.

Para las moléculas de unión a IL-5R (por ejemplo anticuerpos, proteínas, polipéptidos, péptidos y proteínas de fusión) abarcadas por la invención, la dosificación administrada a un paciente es típicamente de 0,0001 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. Preferentemente, la dosificación administrada a un paciente es de entre

0,0001 mg/kg y 20 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 10 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 5 mg/kg, 0,0001 y 2 mg/kg, 0,0001 y 1 mg/kg, 0,0001 mg/kg con el gen del anticuerpo, la producción del anticuerpo también se incrementará (Crouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257).

La célula hospedadora puede cotransfectarse con dos vectores de expresión de la invención, codificando el primer vector un polipéptido derivado de cadena pesada y codificando el segundo vector un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten la expresión igual de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Como alternativa, puede usarse un único vector que codifica, y es capaz de expresar, polipéptidos tanto de cadena pesada como ligera. En dichas situaciones, la cadena ligera debería colocarse antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, 1986, Nature 322:52; y Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2 197). Las secuencias codificantes para las cadenas pesadas y ligeras pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez que se ha producido una molécula de anticuerpo de la invención por expresión recombinante, se puede purificar por cualquier método conocido en la técnica para purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía, (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad por el antígeno específico después de proteína A y cromatografía en columna por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o por cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de los mismos pueden fusionarse con secuencias polipeptídicas heterólogas descritas en el presente documento o conocidas de otro modo en la técnica para facilitar la purificación.

Para las moléculas de unión a IL-5R (por ejemplo anticuerpos, proteínas, polipéptidos, péptidos y proteínas de fusión) abarcadas por la invención, la dosificación administrada a un paciente es típicamente de 0,0001 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. Preferentemente, la dosificación administrada a un paciente es de entre 0,0001 mg/kg y 20 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 10 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 5 mg/kg, 0,0001 y 2 mg/kg, 0,0001 y 1 mg/kg, 0,0001 mg/kg µg/ml, al menos 50 µg/ml, al menos 100 µg/ml, al menos 125 µg/ml, al menos 150 µg/ml, al menos 175 µg/ml, al menos 200 µg/ml, al menos 225 µg/ml, al menos 250 µg/ml, al menos 275 µg/ml, al menos 300 µg/ml, al menos 325 µg/ml, al menos 350 µg/ml, al menos 375 µg/ml, o al menos 400 µg/ml de la molécula de unión a IL-5R y se administra una dosis posterior de una cantidad eficaz de una o más moléculas de unión a IL-5R de la invención para mantener un título de suero de al menos 0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, al menos, 2 µg/ml, al menos 5 µg/ml, al menos 6 µg/ml, al menos 10 µg/ml, al menos 15 µg/ml, al menos 20 µg/ml, al menos 25 µg/ml, al menos 50 µg/ml, al menos 100 µg/ml, al menos 125 µg/ml, al menos 150 µg/ml, al menos 175 µg/ml, al menos 200 µg/ml, al menos 225 µg/ml, al menos 250 µg/ml, al menos 275 µg/ml, al menos 300 µg/ml, al menos 325 µg/ml, al menos 350 µg/ml, al menos 375 µg/ml, o al menos 400 µg/ml. De acuerdo con estas realizaciones, pueden administrarse al sujeto 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más dosis posteriores.

En una realización específica, la invención proporciona métodos para prevenir, tratar, controlar o aliviar una enfermedad mediada por eosinófilos o uno o más síntomas de la misma, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto que lo necesita una dosis de al menos 10 µg, preferentemente al menos 15 µg, al menos 20 µg, al menos 25 µg, al menos 30 µg, al menos 35 µg, al menos 40 µg, al menos 45 µg, al menos 50 µg, al menos 55 µg, al menos 60 µg, al menos 65 µg, al menos 70 µg, al menos 75 µg, al menos 80 µg, al menos 85 µg, al menos 90 µg, al menos 95 µg, al menos 100 µg, al menos 105 µg, al menos 110 µg, al menos 115 µg, o al menos 120 µg de una o más terapias (por ejemplo, agentes terapéuticos o profilácticos), terapias de combinación o composiciones de la invención. En otra realización, la invención proporciona un método para prevenir, tratar, controlar y/o aliviar una enfermedad o un trastorno mediado por eosinófilos o uno o más síntomas del mismo, comprendiendo dichos métodos administrar a un sujeto que lo necesite una dosis de al menos 10 µg, preferentemente al menos 15 µg, al menos 20 µg, al menos 25 µg, al menos 30 µg, al menos 35 µg, al menos 40 µg, al menos 45 µg, al menos 50 µg, al menos 55 µg, al menos 60 µg, al menos 65 µg, al menos 70 µg, al menos 75 µg, al menos 80 µg, al menos 85 µg, al menos 90 µg, al menos 95 µg, al menos 100 µg, al menos 105 µg, al menos 110 µg, al menos 115 µg, o al menos 120 µg de una o más moléculas de unión a IL-5R, terapias de combinación, o composiciones de la invención una vez cada 3 días, preferentemente, una vez cada 4 días, una vez cada 5 días, una vez cada 6 días, una vez cada 7 días, una vez cada 8 días, una vez cada 10 días, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, o una vez al mes.

La presente invención proporciona métodos para prevenir, tratar, controlar o prevenir un trastorno o una enfermedad mediado por eosinófilos o uno o más síntomas del mismo, comprendiendo dicho método: (a) administrar a un sujeto que lo necesite una o más dosis de una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de una o más moléculas de unión a IL-5R, terapias de combinación o composiciones de la invención; y (b) controlar el nivel/concentración en plasma de dichas moléculas de unión a IL-5R administradas en dicho sujeto después de la administración de un cierto número de dosis de dichas terapias (por ejemplo, agentes terapéuticos o profilácticos). Además, preferentemente, dicho cierto número de dosis es 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 dosis de una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de una o más moléculas de unión a IL-5R, composiciones o terapias de combinación de la invención.

En una realización específica, la invención proporciona un método para prevenir, tratar, controlar y/o aliviar un trastorno o una enfermedad mediado por eosinófilos o uno o más síntomas del mismo, comprendiendo dicho

método: (a) administrar al sujeto que lo necesite una dosis de al menos 10 µg (preferentemente al menos 15 µg, al menos 20 µg, al menos 25 µg, al menos 30 µg, al menos 35 µg, al menos 40 µg, al menos 45 µg, al menos 50 µg, al menos 55 µg, al menos 60 µg, al menos 65 µg, al menos 70 µg, al menos 75 µg, al menos 80 µg, al menos 85 µg, al menos 90 µg, al menos 95 µg, o al menos 100 µg) de una o más terapias (por ejemplo, agentes terapéuticos o profilácticos) de la invención; y (b) administrar una o más dosis posteriores a dicho sujeto cuando el nivel en plasma de la molécula de unión a IL-5R administrada en dicho sujeto sea menor de 0,1 µg/ml, preferentemente menor de 0,25 µg/ml, menor de 0,5 µg/ml, menor de 0,75 µg/ml, o menor de 1 µg/ml. En otra realización, la invención proporciona un método para prevenir, tratar, controlar y/o aliviar un trastorno o una enfermedad mediado por eosinófilos o uno o más síntomas del mismo, comprendiendo dicho método: (a) administrar a un sujeto que lo necesita una o más dosis de al menos 10 µg (preferentemente al menos 15 µg, al menos 20 µg, al menos 25 µg, al menos 30 µg, al menos 35 µg, al menos 40 µg, al menos 45 µg, al menos 50 µg, al menos 55 µg, al menos 60 µg, al menos 65 µg, al menos 70 µg, al menos 75 µg, al menos 80 µg, al menos 85 µg, al menos 90 µg, al menos 95 µg, o al menos 100 µg) de una o más moléculas de unión a IL-5R de la invención; (b) controlar el nivel en plasma de las moléculas de unión a IL-5R administradas en dicho sujeto después de la administración de un cierto número de dosis; y (c) administrar una dosis posterior de moléculas de unión a IL-5R de la invención cuando el nivel en plasma de la molécula de unión a IL-5R administrada en dicho sujeto sea menor de 0,1 µg/ml, preferentemente menor de 0,25 µg/ml, menor de 0,5 µg/ml, menor de 0,75 µg/ml, o menor de 1 µg/ml. En ciertas realizaciones de la divulgación, dicho cierto número de dosis es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 dosis de una cantidad eficaz de una o más moléculas de unión a IL-5R de la invención.

Las terapias (por ejemplo, agentes terapéuticos o profilácticos), distintos de las moléculas de unión a IL-5R de la invención, que se han usado o se están usando en la actualidad para prevenir, tratar, controlar y/o aliviar una enfermedad proliferativa o uno o más síntomas de la misma pueden administrarse en combinación con una o más moléculas de unión a IL-5R de acuerdo con los métodos de la invención para tratar, controlar, prevenir y/o aliviar un trastorno o una enfermedad mediado por eosinófilos o uno o más síntomas del mismo. Preferentemente, las dosificaciones de agentes profilácticos o terapéuticos usados en terapias de combinación de la invención son menores que las que se han usado o se están usando en la actualidad para prevenir, tratar, controlar y/o aliviar un trastorno o una enfermedad mediado por eosinófilos o uno o más síntomas del mismo. Las dosificaciones recomendadas de agentes usados actualmente para la prevención, tratamiento, control o alivio de una enfermedad proliferativa o uno o más síntomas de la misma pueden obtenerse de cualquier referencia en la técnica incluyendo, pero sin limitación, Hardman *et al.*, eds., 2001, Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Basis of Therapeutics, 10^a ed., McGraw-Hill, Nueva York; Physician's Desk Reference (PDR) 58^a ed., 2004, Medical Economics Co., Inc., Montvale, NJ.

En diversas realizaciones, las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) se administran con menos de 5 minutos de separación, menos de 30 minutos de separación, 1 hora de separación, aproximadamente 1 hora de separación, aproximadamente 1 a aproximadamente 2 horas de separación, aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas de separación, aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas de separación, aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas de separación, aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas de separación, aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas de separación, aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas de separación, aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas de separación, aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas de separación, aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas de separación, aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas de separación, aproximadamente 12 horas a 18 horas de separación, 18 horas a 24 horas de separación, 24 horas a 36 horas de separación, 36 horas a 48 horas de separación, 48 horas a 52 horas de separación, 52 horas a 60 horas de separación, 60 horas a 72 horas de separación, 72 horas a 84 horas de separación, 84 horas a 96 horas de separación, o 96 horas a 120 horas de separación. En otras realizaciones, se administran dos o más terapias dentro de la misma visita del paciente.

En ciertas realizaciones, una o más moléculas de unión a IL-5R de la invención y una o más terapias adicionales (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) se administran de forma cíclica. La terapia cíclica implica la administración de una primera terapia (por ejemplo, un primer agente profiláctico o terapéutico) durante un periodo de tiempo, seguido de la administración de una segunda terapia (por ejemplo, un segundo agente profiláctico o terapéutico) durante un periodo de tiempo, opcionalmente, seguido de la administración de una tercera terapia (por ejemplo, agente profiláctico o terapéutico) durante un periodo de tiempo y así sucesivamente, y repetir esta administración secuencial, es decir, el ciclo para reducir el desarrollo de resistencia a una de las terapias, para evitar o reducir los efectos secundarios de una de las terapias y/o para mejorar la eficacia de las terapias.

En ciertas realizaciones, la administración de la misma molécula de unión a IL-5R de la invención puede repetirse y las administraciones pueden separarse por al menos 1 día, 2 días, 3 días, 5 días, 10 días, 15 días, 30 días, 45 días, 2 meses, 75 días, 3 meses, o al menos 6 meses. En otras realizaciones, la administración de la misma terapia (por ejemplo, agente profiláctico o terapéutico) distinta de una molécula de unión a IL-5R de la invención puede repetirse y la administración puede separarse por al menos 1 día, 2 días, 3 días, 5 días, 10 días, 15 días, 30 días, 45 días, 2 meses, 75 días, 3 meses, o al menos 6 meses.

En una realización específica, la molécula de unión a IL-5R se administra como una única dosis intravenosa de

0,03 mg/kg.

- La presente invención proporciona métodos para prevenir, tratar, controlar o prevenir un trastorno o una enfermedad mediado por eosinófilos o uno o más síntomas del mismo, comprendiendo dicho método: (a) administrar al sujeto que lo necesite una o más dosis de una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de una o más moléculas de unión a IL-5R, terapias de combinación o composiciones de la invención; y (b) controlar al menos un indicador o síntoma de enfermedad en el sujeto antes de y después de la administración de una o más dosis de dichas terapias (por ejemplo, agentes terapéuticos o profilácticos).
- En una realización, el sujeto padece EPOC.
- En una realización, el sujeto padece asma persistente leve o intermitente leve como se define por el informe de panel de expertos de 2002 del NAEPP.
- En una realización, el indicador o síntoma de enfermedad en el sujeto se controla antes de y después de la administración de una única dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En otra realización, el indicador o síntoma de enfermedad en el sujeto se controla antes de y después la administración de múltiples dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R.
- En una realización, el indicador o síntoma de enfermedad es una mutación de síntoma de asma autoevaluada. Un ejemplo no limitante de una puntuación de síntoma de asma es una puntuación autoevaluada registrada diariamente por el sujeto en casa. La puntuación clasifica los síntomas del asma durante las últimas 24 horas, basándose en la gravedad de los síntomas matutinos, nocturnos y durante el día. Los síntomas y las puntuaciones asignadas se describen en la Tabla 1. La puntuación máxima diaria es de 9, la mínima es de 0. Los sujetos se autoevalúan y registran de manera continua.

Tabla I. Clave de puntuación de síntoma de asma. Nocturno dura desde irse a la cama hasta despertarse por la mañana. Matutino dura desde despertarse hasta una hora después de despertarse. Durante el día comienza 1 hora después de despertarse y termina en el momento de irse a la cama.

	Síntomas nocturnos
0	No me desperté debido a problemas respiratorios.
1	Me desperté una vez debido a mis problemas respiratorios, pero no usé mi medicación de rescate.
2	Me desperté una vez debido a mis problemas de respiración, pero mi medicación de rescate controló mis síntomas.
3	Me desperté más de una vez debido a mis problemas respiratorios, pero mi medicación de rescate controló mis síntomas.
4	Tuve dificultad para dormir debido a mis problemas respiratorios incluso aunque usé mis medicaciones de rescate.
	Síntomas matutinos
0	No
1	Sí
	Síntomas durante el día
0	Sin síntomas en absoluto; actividad no restringida.
1	Los síntomas provocaron poca o ninguna incomodidad; actividad no restringida.
2	Los síntomas provocaron alguna incomodidad; en ocasiones limitando la actividad extenuante.
3	Los síntomas provocaron incomodidad moderada; en ocasiones limitando la actividad rutinaria.
4	Los síntomas se produjeron en reposo, provocando incomodidad notable, y habitualmente actividad rutinaria limitada.

En una realización, un sujeto tiene una puntuación de síntomas de asma de X antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R y una puntuación de síntomas de asma de X-Y después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R, en la que X es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9, en la que Y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9, y en la que la puntuación postadministración nunca está por debajo de 0.

En una realización, un sujeto tiene una puntuación de síntomas de asma de entre 0 y 9 antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una puntuación de síntomas de asma entre 0 y 3, entre 1 y 4, entre 2 y 5, entre 3 y 5, entre 4 y 7, entre 5 y 8 o entre 6 y 9 antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una puntuación de síntomas de asma de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una puntuación de síntomas de asma de 1 antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una puntuación de síntomas de asma de 2 antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una puntuación de síntomas de asma de 3 antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una puntuación de síntomas de asma de 4 antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una puntuación de síntomas de asma de 5 antes de la administración de una o más dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una puntuación de síntomas de asma de 6 antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una puntuación de síntomas de asma de 7 antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una puntuación de síntomas de asma de 8 antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una puntuación de síntomas de asma de 9 antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R.

En una realización, un sujeto tiene una puntuación de síntomas de asma de entre 0 y 9 después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una puntuación de síntomas de asma entre 0 y 3, entre 1 y 4, entre 2 y 5, entre 3 y 5, entre 4 y 7, entre 5 y 8 o entre 6 y 9 después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una puntuación de síntomas de asma de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una puntuación de síntomas de asma de 1 después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una puntuación de síntomas de asma de 2 después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una puntuación de síntomas de asma de 3 después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una puntuación de síntomas de asma de 4 después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una puntuación de síntomas de asma de 5 después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una puntuación de síntomas de asma de 6 después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una puntuación de síntomas de asma de 7 después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una puntuación de síntomas de asma de 8 después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una puntuación de síntomas de asma de 9 después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R.

En una realización, la puntuación de síntomas de asma de un sujeto es menor después de la administración de una o más dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R que antes de la administración de una o más dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R en la que la puntuación después de la administración nunca es menor de 0. En una realización específica, la puntuación de síntomas de asma es 1 punto menor. En una realización específica, la puntuación de síntomas de asma es 2 puntos menor. En una realización específica, la puntuación de síntomas de asma es 3 puntos menor. En una realización específica, la puntuación de síntomas de asma es 4 puntos menor. En una realización específica, la puntuación de síntomas de asma es 5 puntos menor. En una realización específica, la puntuación de síntomas de asma es 6 puntos menor. En una realización específica, la puntuación de síntomas de asma es 7 puntos menor. En una realización específica, la puntuación de síntomas de asma es 8 puntos menor. En una realización específica, la puntuación de síntomas de asma es al menos 1 punto menor. En una realización específica, la puntuación de síntomas de asma es al menos 2 puntos menor. En una realización específica, la puntuación de síntomas de asma es al menos 3 puntos menor. En una realización específica, la puntuación de síntomas de asma es al menos 4 puntos menor. En una realización específica, la puntuación de síntomas de asma es al menos 5 puntos menor. En una realización específica, la puntuación de síntomas de asma es al menos 6 puntos menor. En una realización específica, la puntuación de síntomas de asma es al menos 7 puntos menor. En una realización específica, la puntuación de síntomas de asma es al menos 8 puntos menor.

En una realización, el indicador o síntoma de enfermedad es óxido nítrico exhalado fraccional (FENO). FENO puede medirse de acuerdo con las recomendaciones combinadas de la Sociedad Respiratoria Europea y la Sociedad Torácica Americana (Sociedad Torácica Americana, Sociedad Respiratoria Europea. (2005) ATS/ERS Recommendations for Standardized Procedures for the Online y Offline Measurements of Exhaled Lower Respiratory Nitric Oxide y Nasal Nitric Oxide, 2005. Am J Respir Crit Care Med. 171: 912-930). Las mediciones de FENO pueden realizarse usando el NIOX a un caudal de 50 ml/s (patrón de ATS).

En una realización, un sujeto tiene un FENO de entre 20 y 500 ppb antes de la administración de una o más dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un FENO entre 20 y 500 ppb, entre 20 y 400 ppb, entre 20 y 300 ppb, entre 20 y 200 ppb, entre 50 y 500 ppb, entre 100 y 500 ppb, entre 150 y 500 ppb, entre 200 y 500 ppb, entre 20 y 50 ppb, entre 50 y 100 ppb, entre 100 y 200 ppb, entre 200 y 300 ppb, entre 300 y 500 ppb antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un FENO de al menos 50 ppb, al menos 100 ppb, al menos 150 ppb, al menos 200 ppb, al menos 250 ppb, al menos 300 ppb, al menos 350 ppb, al menos 400 ppb antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un FENO de 50 ppb antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un FENO de 100 ppb antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un FENO de 150 ppb antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un FENO de 200 ppb antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un FENO de 250 ppb antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un FENO de 300 ppb antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un FENO de 350 ppb antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un FENO de 400 ppb antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R.

En una realización, un sujeto tiene un FENO de entre 20 y 500 ppb después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un FENO entre 20 y 500 ppb, entre 20 y 400 ppb, entre 20 y 300 ppb, entre 20 y 200 ppb, entre 50 y 500 ppb, entre 100 y 500 ppb, entre 150 y 500 ppb, entre 200 y 500 ppb, entre 20 y 50 ppb, entre 50 y 100 ppb, entre 100 y 200 ppb, entre 200 y 300 ppb, entre 300 y 500 ppb después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un FENO de como máximo 50 ppb, como máximo 100 ppb, como máximo 150 ppb, como máximo 200 ppb, como máximo 250 ppb, como máximo 300 ppb, como máximo 350 ppb, como máximo 400 ppb después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un FENO de como máximo 20 ppb después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un FENO de como máximo 50 ppb después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un FENO de como máximo 100 ppb después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un FENO de como máximo 150 ppb después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un FENO de como máximo 200 ppb después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un FENO de como máximo 250 ppb después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un FENO de como máximo 300 ppb después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un FENO de como máximo 350 ppb después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un FENO de como máximo 400 ppb después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R.

En una realización, el FENO de un sujeto es menor después de la administración de una o más dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R que antes de la administración de una o más dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R, en la que el FENO nunca es menor de 0 ppb. En una realización específica, el FENO es al menos 50 ppb menor. En una realización específica, el FENO es al menos 100 ppb menor. En una realización específica, el FENO es al menos 150 ppb menor. En una realización específica, el FENO es al menos 200 ppb menor. En una realización específica, el FENO es al menos 250 ppb menor. En una realización específica, el FENO es al menos 300 ppb menor. En una realización específica, el FENO es al menos 10 % menor. En una realización específica, el FENO es al menos 20 % menor. En una realización específica, el FENO es al menos 30 % menor. En una realización específica, el FENO es al menos 40 % menor. En una realización específica, el FENO es al menos 50 % menor. En una realización específica, el FENO es al menos 60 % menor. En una realización específica, el FENO es al menos 70 % menor. En una realización específica, el FENO es al menos 80 % menor. En una realización específica, el FENO es al menos 90 % menor. En una realización específica, el FENO es 10 % menor. En una realización específica, el FENO es 20 % menor. En una realización específica, el FENO es 30 % menor. En una realización específica, el FENO es 40 % menor. En una realización específica, el FENO es 50 % menor. En una realización específica, el FENO es 60 % menor. En una realización específica, el FENO es 70 % menor. En una realización específica, el FENO es 80 % menor. En una realización específica, el FENO es 90 % menor.

En una realización, el indicador o síntoma de enfermedad es proteína catiónica de eosinófilos (ECP). Los niveles de ECP en suero pueden evaluarse usando cualquier método conocido por los expertos en la materia, por ejemplo, pero sin limitación, ensayo de ELISA, radioinmunoensayo. Los niveles de ECP en suero pueden medirse por uno cualquiera de los ensayos disponibles en el mercado.

En una realización, un sujeto tiene un ECP en suero de entre 20 y 500 ng/ml antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una ECP en suero entre 20 y

aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 4 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 6 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 2 semanas, al menos aproximadamente 3 semanas, al menos aproximadamente 4 semanas, al menos aproximadamente 5 semanas, al menos aproximadamente 6 semanas, al menos aproximadamente 7 semanas, al menos aproximadamente 8 semanas, al menos aproximadamente 9 semanas, al menos aproximadamente 10 semanas, al menos aproximadamente 12 semanas, al menos aproximadamente 14 semanas, al menos aproximadamente 16 semanas, al menos aproximadamente 20 semanas, o al menos aproximadamente 25 semanas.

En una realización, el indicador o síntoma de enfermedad es ensayo de exposición a metacolina (MCT). El MCT puede realizarse de acuerdo con las directrices de la Sociedad Torácica Americana (ATS) (Guidelines for Methacholine y Exercise Testing - 1999. (2000) Am J Respir Crit Care Med. 161:309-329) en presencia de un médico que tiene experiencia en el control del broncoespasmo y con agentes terapéuticos apropiados inmediatamente disponibles. Brevemente, el espirómetro usado se calibra de acuerdo con las directrices del ATS. El nebulizador usado debe producir un tamaño de partícula con mediana de masa de diámetro aerodinámico (MMAD) de 1-4 micrómetros y flujo de $0,13 \pm 10\%$ ml/min. Se usa metacolina de una fuente aprobada por la FDA y se diluye con solución salina normal estéril. Puede realizarse exposición de inhalación usando 2 minutos de respiración tidal o el método de dosímetro de cinco respiraciones como se describe en la publicación referida. Se administran concentraciones de metacolina de acuerdo con la práctica establecida del investigador, pero dentro del intervalo de 0,06 mg/dl a 25,0 mg/dl. Se mide FEV₁ 30 y 90 segundos después de la compleción de cada dosis y se registra el mayor de los dos valores. Se administran concentraciones crecientes hasta que el FEV₁ se ha visto caer al menos 20 % desde el valor de línea basal. PC20 es la concentración de metacolina que conduce a al menos 20 % de caída en FEV₁ desde el valor de línea basal. Después de la compleción de la dosis final puede proporcionarse al sujeto albuterol por inhalador o nebulizador de dosis medida a discreción del investigador principal.

En una realización, un sujeto tiene una PC20 de entre 0,06 y 25 mg/dl antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una PC20 de entre 0,06 y 25 mg/dl, entre 0,1 y 10 mg/dl, entre 0,06 y 3 mg/dl, entre 0,06 y 2 mg/dl, entre 0,06 y 1 mg/dl, entre 0,1 y 3 mg/dl, entre 0,1 y 2 mg/dl, entre 0,1 y 1 mg/dl, entre 0,2 y 10 mg/dl, entre 0,5 y 10 mg/dl, entre 1 y 10 mg/dl, entre 0,1 y 5 mg/dl, entre 0,2 y 5 mg/dl, entre 0,5 y 5 mg/dl, entre 0,1 y 2 mg/dl, entre 0,2 y 2 mg/dl, entre 0,5 y 2 mg/dl, entre 0,06 y 0,1 mg/dl, entre 0,1 y 0,2 mg/dl, entre 0,2 y 0,5 mg/dl, entre 0,5 y 1 mg/dl, entre 1 y 2 mg/dl, entre 2 y 5 mg/dl, entre 5 y 10 mg/dl antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una PC20 de como máximo 0,1 mg/dl, como máximo 0,2 mg/dl, como máximo 0,4 mg/dl, como máximo 0,5 mg/dl, como máximo 1 mg/dl, como máximo 2 mg/dl, como máximo 5 mg/dl, como máximo 10 mg/dl antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una PC20 de 10 mg/dl antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una PC20 de 5 mg/dl antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una PC20 de 2 mg/dl antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una PC20 de 1 mg/dl antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una PC20 de 0,5 mg/dl antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una PC20 de 0,2 mg/dl antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una PC20 de 0,1 mg/dl antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R.

En una realización, un sujeto tiene una PC20 de entre 0,5 y 25 mg/dl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una PC20 de entre 1 y 25 mg/dl, entre 2 y 25 mg/dl, entre 5 y 25 mg/dl, entre 10 y 25 mg/dl, entre 1 y 10 mg/dl, entre 2 y 10 mg/dl, entre 2 y 10 mg/dl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una PC20 de al menos 1 mg/dl, al menos 2 mg/dl, al menos 5 mg/dl, al menos 10 mg/dl, al menos 20 mg/dl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una PC20 de al menos 0,2 mg/dl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una PC20 de al menos 0,3 mg/dl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una PC20 de al menos 0,4 mg/dl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una PC20 de al menos 0,5 mg/dl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una PC20 de al menos 0,7 mg/dl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una PC20 de al menos 1 mg/dl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una PC20 de al menos 2 mg/dl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una PC20 de al menos 5 mg/dl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una PC20 de al menos 10 mg/dl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una PC20 de al menos 20 mg/dl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene una PC20 de al menos 25 mg/dl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R.

En una realización, la PC20 de un sujeto es mayor después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R que antes de la administración de una o más dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización específica, la PC20 es al menos 0,3 mg/dl mayor. En una realización específica, la PC20 es al menos 0,5 mg/dl mayor. En una realización específica, la PC20 es al menos 0,7 mg/dl mayor. En una realización específica, la PC20 es al menos 1 mg/dl mayor. En una realización específica, la PC20 es al menos 3 mg/dl mayor. En una realización específica, la PC20 es al menos 5 mg/dl mayor. En una realización específica, la PC20 es al menos 10 mg/dl mayor. En una realización específica, la PC20 es al menos 15 mg/dl mayor. En una realización específica, la PC20 es al menos 20 mg/dl mayor. En una realización específica, la PC20 es al menos 2 veces mayor. En una realización específica, la PC20 es al menos 4 veces mayor. En una realización específica, la PC20 es al menos 8 veces mayor. En una realización específica, la PC20 es al menos 10 mayor. En una realización específica, la PC20 es al menos 12 veces mayor. En una realización específica, la PC20 es al menos 15 veces mayor. En una realización específica, la PC20 es al menos 20 veces mayor. En una realización específica, la PC20 es 2 veces mayor. En una realización específica, la PC20 es 4 veces mayor. En una realización específica, la PC20 es 8 veces mayor. En una realización específica, la PC20 es 10 veces mayor. En una realización específica, la PC20 es 15 veces mayor. En una realización específica, la PC20 es 60 % mayor. En una realización específica, la PC20 es 20 veces mayor.

En una realización, el indicador o síntoma de enfermedad es el recuento de eosinófilos en circulación. El recuento de eosinófilos en circulación puede evaluarse usando cualquier método conocido por los expertos en la materia, por ejemplo, pero sin limitación, histología, citometría de flujo. El recuento de eosinófilos en circulación puede medirse por uno cualquiera de los kits disponibles en el mercado.

En una realización, un sujeto tiene un recuento de eosinófilos en circulación de entre 50 y 1000 células/microl antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de eosinófilos en circulación de entre 50 y 1000 células/microl, entre 100 y 1000 células/microl, entre 150 y 1000 células/microl, entre 200 y 1000 células/microl, entre 250 y 1000 células/microl, entre 300 y 1000 células/microl, entre 400 y 1000 células/microl, entre 500 y 1000 células/microl, entre 50 y 500 células/microl, entre 100 y 500 células/microl, entre 100 y 400 células/microl, entre 150 y 500 células/microl, entre 200 y 500 células/microl antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de eosinófilos en circulación de al menos 50 células/microl, al menos 100 células/microl, al menos 150 células/microl, al menos 200 células/microl, al menos 250 células/microl, al menos 300 células/microl, al menos 400 células/microl, al menos 500 células/microl antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de eosinófilos en circulación de 50 células/microl antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de eosinófilos en circulación de 100 células/microl antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de eosinófilos en circulación de 150 células/microl antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de eosinófilos en circulación de 200 células/microl antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de eosinófilos en circulación de 250 células/microl antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de eosinófilos en circulación de 300 células/microl antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de eosinófilos en circulación de 350 células/microl antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de eosinófilos en circulación de 400 células/microl antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de eosinófilos en circulación de 500 células/microl antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R.

En una realización, un sujeto tiene un recuento de eosinófilos en circulación de entre 1 y 400 células/microl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de eosinófilos en circulación de entre 1 y 200 células/microl, entre 1 y 100 células/microl, entre 1 y 50 células/microl, entre 1 y 40 células/microl, entre 10 y 200 células/microl, entre 10 y 100 células/microl, entre 10 y 40 células/microl, entre 20 y 200 células/microl, entre 20 y 100 células/microl, entre 20 y 50 células/microl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de eosinófilos en circulación de como máximo 1 célula/microl, como máximo 5 células/microl, como máximo 10 células/microl, como máximo 20 células/microl, como máximo 30 células/microl, como máximo 40 células/microl, como máximo 50 células/microl, como máximo 60 células/microl, como máximo 80 células/microl, como máximo 100 células/microl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de eosinófilos en circulación de como máximo 1 célula/microl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de eosinófilos en circulación de como máximo 5 células/microl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de eosinófilos en circulación de como máximo 10 células/microl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de eosinófilos en circulación de como máximo 20 células/microl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a

IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de eosinófilos en circulación de como máximo 30 células/microl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de eosinófilos en circulación de como máximo 40 células/microl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de eosinófilos en circulación de como máximo 50 células/microl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de eosinófilos en circulación de como máximo 60 células/microl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de eosinófilos en circulación de como máximo 80 células/microl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R.

En una realización, el recuento de eosinófilos en circulación de un sujeto es menor después de la administración de una o más dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R que antes de la administración de una o más dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R, en el que el recuento de eosinófilos en circulación nunca es menor de 0 células/microl. En una realización específica, el recuento de eosinófilos en circulación es al menos 50 células/microl menor. En una realización específica, el recuento de eosinófilos en circulación es al menos 100 células/microl menor. En una realización específica, el recuento de eosinófilos en circulación es al menos 150 células/microl menor. En una realización específica, el recuento de eosinófilos en circulación es al menos 200 células/microl menor. En una realización específica, el recuento de eosinófilos en circulación es al menos 250 células/microl menor. En una realización específica, el recuento de eosinófilos en circulación es al menos 300 células/microl menor. En una realización específica, el recuento de eosinófilos en circulación es al menos 10 % menor. En una realización específica, el recuento de eosinófilos en circulación es al menos 20 % menor. En una realización específica, el recuento de eosinófilos en circulación es al menos 30 % menor. En una realización específica, el recuento de eosinófilos en circulación es al menos 40 % menor. En una realización específica, el recuento de eosinófilos en circulación es al menos 50 % menor. En una realización específica, el recuento de eosinófilos en circulación es al menos 60 % menor. En una realización específica, el recuento de eosinófilos en circulación es al menos 70 % menor. En una realización específica, el recuento de eosinófilos en circulación es al menos 80 % menor. En una realización específica, el recuento de eosinófilos en circulación es al menos 90 % menor. En una realización específica, el recuento de eosinófilos en circulación es al menos 95 % menor. En una realización específica, el recuento de eosinófilos en circulación es al menos 99 % menor. En una realización específica, el recuento de eosinófilos en circulación es 10 % menor. En una realización específica, el recuento de eosinófilos en circulación es 20 % menor. En una realización específica, el recuento de eosinófilos en circulación es 30 % menor. En una realización específica, el recuento de eosinófilos en circulación es 40 % menor. En una realización específica, el recuento de eosinófilos en circulación es 50 % menor. En una realización específica, el recuento de eosinófilos en circulación es 60 % menor. En una realización específica, el recuento de eosinófilos en circulación es 70 % menor. En una realización específica, el recuento de eosinófilos en circulación es 80 % menor. En una realización específica, el recuento de eosinófilos en circulación es 90 % menor. En una realización específica, el recuento de eosinófilos en circulación es 95 % menor. En una realización específica, el recuento de eosinófilos en circulación es 99 % menor.

En una realización, un sujeto no tiene recuento de eosinófilos en circulación detectable después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización específica, el recuento de eosinófilos en circulación permanece indetectable durante al menos aproximadamente 1 día, al menos aproximadamente 2 días, al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 4 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 6 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 2 semanas, al menos aproximadamente 3 semanas, al menos aproximadamente 4 semanas, al menos aproximadamente 5 semanas, al menos aproximadamente 6 semanas, al menos aproximadamente 7 semanas, al menos aproximadamente 8 semanas, al menos aproximadamente 9 semanas, al menos aproximadamente 10 semanas, al menos aproximadamente 12 semanas, al menos aproximadamente 14 semanas, al menos aproximadamente 16 semanas, al menos aproximadamente 20 semanas, o al menos aproximadamente 25 semanas.

En una realización, el indicador o síntoma de enfermedad es % de eosinófilos en esputo inducido. El % de eosinófilos en esputo inducido puede evaluarse usando cualquier método conocido por un experto en la materia, por ejemplo, pero sin limitación, los métodos descritos en Belda *et al.* (2000) *Am J Respir Crit Care Med* 161:475-478. El % de eosinófilos en esputo inducido puede determinarse por uno cualquiera de los kits disponibles en el mercado.

En una realización, un sujeto tiene un % de eosinófilos en esputo inducido de entre 0,1 % y 10 % antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un % de eosinófilos en esputo inducido de entre 0,1 % y 2 %, entre 0,1 % y 5 %, entre 0,5 % y 2 %, entre 0,5 % y 5 %, entre 0,5 % y 10 %, entre 1 % y 2 %, entre 1 % y 5 %, entre 1 % y 10 %, entre 2 % y 5 %, entre 2 % y 10 %, entre 3 % y 5 %, entre 3 % y 10 %, entre 1,5 % y 5 %, entre 2,5 % y 5 %, antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un % de eosinófilos en esputo inducido de al menos 0,1 %, al menos 0,5 %, al menos 1 %, al menos 1,5 %, al menos 2 %, al menos 2,5 %, al menos 3 %, al menos 4 %, al menos 5 %, al menos 6 %, al menos 7 %, al menos 8 %, al menos 9 %, al menos 10 % antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un % de eosinófilos en esputo inducido de 0,5 % antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un % de eosinófilos en esputo inducido de 1 % antes de la

al menos aproximadamente 20 semanas, o al menos aproximadamente 25 semanas.

En una realización, el indicador o síntoma de enfermedad es recuento de basófilos en circulación. El recuento de basófilos en circulación puede evaluarse usando cualquier método conocido por un experto en la materia, por ejemplo, pero sin limitación, citometría de flujo. El recuento de basófilos en circulación puede medirse por uno cualquiera de los kits disponibles en el mercado.

En una realización, un sujeto tiene un recuento de basófilos en circulación de entre 5 y 500 células/microl antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de basófilos en circulación de entre 50 y 500 células/microl, entre 10 y 500 células/microl, entre 20 y 500 células/microl, entre 30 y 500 células/microl, entre 40 y 500 células/microl, entre 50 y 500 células/microl, entre 10 y 400 células/microl, entre 10 y 300 células/microl, entre 10 y 200 células/microl, entre 10 y 100 células/microl, entre 20 y 100 células/microl, entre 30 y 100 células/microl, entre 10 y 75 células/microl antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de basófilos en circulación de al menos 5 células/microl, al menos 10 células/microl, al menos 15 células/microl, al menos 20 células/microl, al menos 30 células/microl, al menos 50 células/microl, al menos 60 células/microl, al menos 100 células/microl antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de basófilos en circulación de 5 células/microl antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de basófilos en circulación de 10 células/microl antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de basófilos en circulación de 15 células/microl antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de basófilos en circulación de 20 células/microl antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de basófilos en circulación de 30 células/microl antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de basófilos en circulación de 50 células/microl antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de basófilos en circulación de 60 células/microl antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de basófilos en circulación de 100 células/microl antes de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R.

En una realización, un sujeto tiene un recuento de basófilos en circulación de entre 1 y 100 células/microl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de basófilos en circulación entre 1 y 100 células/microl, entre 1 y 50 células/microl, entre 1 y 30 células/microl, entre 1 y 20 células/microl, entre 1 y 10 células/microl, entre 5 y 100 células/microl, entre 5 y 50 células/microl, entre 5 y 20 células/microl, entre 5 y 10 células/microl, entre 10 y 30 células/microl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de basófilos en circulación de como máximo 1 célula/microl, como máximo 5 células/microl, como máximo 10 células/microl, como máximo 20 células/microl, como máximo 30 células/microl, como máximo 50 células/microl, como máximo 100 células/microl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de basófilos en circulación de como máximo 1 célula/microl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de basófilos en circulación de como máximo 5 células/microl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de basófilos en circulación de como máximo 10 células/microl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de basófilos en circulación de como máximo 20 células/microl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de basófilos en circulación de como máximo 30 células/microl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de basófilos en circulación de como máximo 40 células/microl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización, un sujeto tiene un recuento de basófilos en circulación de como máximo 50 células/microl después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R.

En una realización, el recuento de basófilos en circulación de un sujeto es menor después de la administración de una o más dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R que antes de la administración de una o más dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R, en el que el recuento de basófilos en circulación nunca es menor de 0 células/microl. En una realización específica, el recuento de basófilos en circulación es al menos 10 células/microl menor. En una realización específica, el recuento de basófilos en circulación es al menos 20 células/microl menor. En una realización específica, el recuento de basófilos en circulación es al menos 30 células/microl menor. En una realización específica, el recuento de basófilos en circulación es al menos 50 células/microl menor. En una realización específica, el recuento de basófilos en circulación es al menos 75 células/microl menor. En una realización específica, el recuento de basófilos en circulación es al menos 100 células/microl menor. En una realización específica, el recuento de basófilos en circulación es al menos 10 % menor. En una realización específica, el recuento de basófilos en circulación es al menos 20 % menor. En una realización específica, el recuento de basófilos en circulación es al menos 30 % menor. En una realización específica, el recuento de basófilos

en circulación es al menos 40 % menor. En una realización específica, el recuento de basófilos en circulación es al menos 50 % menor. En una realización específica, el recuento de basófilos en circulación es al menos 60 % menor. En una realización específica, el recuento de basófilos en circulación es al menos 70 % menor. En una realización específica, el recuento de basófilos en circulación es al menos 80 % menor. En una realización específica, el recuento de basófilos en circulación es al menos 90 % menor. En una realización específica, el recuento de basófilos en circulación es al menos 95 % menor. En una realización específica, el recuento de basófilos en circulación es al menos 99 % menor. En una realización específica, el recuento de basófilos en circulación es 10 % menor. En una realización específica, el recuento de basófilos en circulación es 20 % menor. En una realización específica, el recuento de basófilos en circulación es 30 % menor. En una realización específica, el recuento de basófilos en circulación es 40 % menor. En una realización específica, el recuento de basófilos en circulación es 50 % menor. En una realización específica, el recuento de basófilos en circulación es 60 % menor. En una realización específica, el recuento de basófilos en circulación es 70 % menor. En una realización específica, el recuento de basófilos en circulación es 80 % menor. En una realización específica, el recuento de basófilos en circulación es 90 % menor. En una realización específica, el recuento de basófilos en circulación es 95 % menor. En una realización específica, el recuento de basófilos en circulación es 99 % menor.

En una realización, un sujeto no tiene recuento de basófilos en circulación después de la administración de la o las dosis de una o más moléculas de unión a IL-5R. En una realización específica, el nivel de recuento de basófilos en circulación permanece indetectable durante al menos aproximadamente 1 día, al menos aproximadamente 2 días, al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 4 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 6 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 2 semanas, al menos aproximadamente 3 semanas, al menos aproximadamente 4 semanas, al menos aproximadamente 5 semanas, al menos aproximadamente 6 semanas, al menos aproximadamente 7 semanas, al menos aproximadamente 8 semanas, al menos aproximadamente 9 semanas, al menos aproximadamente 10 semanas, al menos aproximadamente 12 semanas, al menos aproximadamente 14 semanas, al menos aproximadamente 16 semanas, al menos aproximadamente 20 semanas, o al menos aproximadamente 25 semanas.

Ejemplos

La invención se describe ahora con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan para el fin de ilustrar solamente y la invención no debería interpretarse de ninguna manera como limitada a estos ejemplos sino que debería más bien interpretarse que abarca todas y cada una de las variaciones que resulten evidentes como resultado de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento.

EJEMPLO 1

MEDI-563, un anticuerpo anti receptor de interleucina-5, se tolera bien e induce eosinopenia sanguínea reversible en asmáticos leves en un ensayo de fase 1

Antecedentes: se cree que los eosinófilos desempeñan un papel clave en la patogénesis del asma. La interleucina-5 (IL-5) es una citosina principal en la biología de eosinófilos, y la expresión de su receptor (IL-5R) está restringida en gran medida a eosinófilos, basófilos y mastocitos. La eficacia subóptima de terapias dirigidas a IL-5 en asma se ha atribuido a un empobrecimiento incompleto de eosinófilos en el tejido pulmonar. El empobrecimiento de eosinófilos pulmonares completo debería proporcionar información adicional acerca del papel de estas células en el asma y podría representar una estrategia terapéutica nueva.

Objetivos: para evaluar la seguridad y actividad biológica de MEDI-563 (previamente conocido como BIW-8405), se desarrolló un anticuerpo monoclonal IgG1 afucosilado humano anti cadena alfa de IL-5R. MEDI-563 se desarrolló por BioWa, Inc. Mediante tecnología patentada de Potelligent® que potencia significativamente la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. MEDI-563 neutraliza la actividad de IL-5 y agota eosinófilos tisulares en modelos preclínicos con un perfil toxicológico aceptable.

Métodos: se admitió a seis sujetos con asma leve y ausencia de terapia de corticosteroides en la primera cohorte del estudio BIW-8405-001, un estudio primero en seres humanos abierto con MEDI-563. Los pacientes recibieron una única dosis intravenosa de MEDI 563 0.03 mg/kg y se les realizó seguimiento durante 84 días.

Resultados: MEDI-563 se toleró bien, y no se presentaron acontecimientos adversos graves. Todos los acontecimientos adversos (AE) fueron leves, y el AE más frecuentemente presentado fue fatiga el día de dosificación después de la administración (3/6 sujetos). Los eosinófilos en circulación se redujeron por debajo de los límites de detección a las 24-48 horas de dosificación en los 6 sujetos (incluirá valor medio antes de la dosificación). Este efecto duró 8-12 semanas, y los eosinófilos se hicieron detectables en algunos sujetos el día 58 después de la dosificación y alcanzaron >70 % de niveles de línea basal el día 84 después de la dosificación en todos los sujetos analizados. Los basófilos en circulación siguieron una tendencia similar. Posiblemente ligado al mecanismo esperado de acción de MEDI-563, los niveles de neutrófilos experimentaron una reducción ligera y transitoria en un periodo de 72 horas después de la dosificación, alcanzando niveles de neutropenia leve en 2/6 sujetos que se resolvieron en un periodo de 3 días. La administración de MEDI-563 se asoció con aumentos inmediatos (en un

periodo de 6 horas), modestos ($<10\times$ línea basal) y transitorios (<1 semana de duración) en proteína sensible a C en suero (2/6 sujetos) e IL-6 (2/3).

Conclusiones: una única dosis IV de 0.03 mg/kg de MEDI-563 induce una eosinopenia sanguínea robusta, con un perfil de seguridad aceptable hasta la fecha.

EJEMPLO 2

Citotoxicidad medida por célula dependiente de anticuerpo

Se coincuraron células efectoras KC1333 (linfocitos NK humanos que sobreexpresaban FcγRIIIa y FcεRIg humanos) durante 4 horas con la línea celular CTLL-2 diana (linfoma de ratona genéticamente modificado para sobreexpresar IL-5Ra humano) a una relación de 5 efectores: 1 diana, en presencia de MEDI-563 o anticuerpo de control. Se evaluó la citotoxicidad media por anticuerpos usando un ensayo de viabilidad celular Calcein AM. Los resultados se resumen en la figura 9A. Usando una metodología similar, se analizó un control adicional (MEDI-563 fucosilado). Los resultados se resumen en la figura 9B.

EJEMPLO 3

Evaluación por resonancia de plasmón superficial de la unión en equilibrio de MEDI-563 a IL-5R

Se obtuvo un dominio extracelular de IL-5Ra humano soluble, sin vehículo, de una fuente comercial (R+D Systems). El huIL-5Ra recombinante se inmovilizó directamente en una microplaca sensora mediante enlaces de amina usando un protocolo convencional. La interacción de MEDI-563 con huIL-5Ra inmovilizado a lo largo del tiempo se evaluó mediante el cambio en el índice refractario, del que se calcularon los valores k_{on} , k_{off} , y K_D usando técnicas convencionales. Los resultados se resumen en la figura 10.

EJEMPLO 4

Evaluación por resonancia de plasmón superficial de la unión en equilibrio de MEDI-563 a FcγR

Se inmovilizó directamente MEDI-563 en una microplaca sensora mediante enlaces de amina usando un protocolo convencional. Las interacciones de FcγR humanos solubles (MedImmune) con MEDI-563 inmovilizado a lo largo del tiempo se evaluaron por el cambio en el índice refractario, a partir del que se calcularon los valores k_{on} , k_{off} , y K_D usando técnicas convencionales. Los resultados se resumen en la figura 11.

EJEMPLO 5

Inmunohistoquímica de IL-5Rα

Se fijó tejido de pólipo nasal resecado en formaldehído durante 24 horas y se incluyó en parafina. Se tiñeron secciones consecutivas con respecto a IL-5Rα, IL-9R, CCR3, y c-kit humanos usando anticuerpos policlonales dirigidos a IL-5R disponibles en el mercado (R+D Systems, Santa Cruz Biotechnology) usando técnicas convencionales. Se fijó tejido pulmonar de ratones transgénicos IL-9 o ratones de control FVB de cepa coincidente de tipo silvestre en formaldehído durante 24 horas y se incluyeron en parafina. Las secciones se analizaron con respecto a la expresión de IL-9R (pAb, Santa Cruz Biotechnology) e IL-5R (pAb, R+D Systems) usando técnicas de inmunohistoquímica convencionales. Los resultados se resumen en las figuras 12 y 13.

EJEMPLO 6

MEDI-563 se une con eosinófilos en sangre completa de donantes sanos

Se aislaron granulocitos de sangre completa humana de donantes normales por centrifugación de gradiente de densidad. Se usaron reactivos de anticuerpo primario marcados directamente para el análisis de la expresión de CD16 (fluorocromo FITC) y MEDI-563 F(Ab)² (fluorocromo Alexa-647). Se añadió un cóctel de CD16-FITC más MEDI-563-Alexa647, o CD16-FITC más un anticuerpo de control de isotipo marcado con Alexa647, a la preparación de granulocitos a 1 microgramo por cada 10^6 células. Después de incubación durante 45 minutos en hielo, las células se lavaron tres veces en solución salina fría, y se evaluó la unión del anticuerpo a la superficie celular por citometría de flujo. Se analizaron los eosinófilos, que son negativos para CD16. Se expresa la unión de MEDI-563 frente al anticuerpo de control de isotipo en población de granulocitos negativa para CD16. Los resultados se resumen en la figura 15

EJEMPLO 7

Tinción de IL-5Rα de leucocitos de ratón por citometría de flujo

Se aislaron leucocitos de sangre, médula ósea, pulmones y bazo de ratones transgénicos para IL-5. Se tiñeron suspensiones celulares en PBS que contenía FCS 1 %. Para reducir la unión no específica, las células se incubaron con Fc Block (BD Biosciences) durante 15 minutos antes de la tinción. Los anticuerpos usados fueron anti CCR3 de ratón (R&D systems), anti Siglec F de ratón (BD Biosciences) y anti IL-5R de ratón (H7). Las células se tiñeron durante 30 minutos en hielo, se aclararon dos veces y se fijaron en tampón cytofix (BD Biosciences). Se realizaron análisis citométricos de flujo usando un LSR11 (Becton Dickinson) con software FACS Diva (Becton Dickinson). Los resultados se analizaron usando el software FlowJo (TreeStar Inc.). Los resultados se resumen en las figuras 16A y 16B.

EJEMPLO 8

Medi-563 agota las células mononucleares positivas para IL-5Ra de la médula ósea

Las células mononucleares de médula ósea congeladas (BM MNC; Lonza) se descongelaron, se lavaron, se sembraron en placas y se incubaron durante 2 horas a 37 °C. Se recogieron las células mononucleares de médula ósea no adherentes (NA BM MNC) de las placas después de la incubación. Se realizó ensayo de ADCC coincubando durante 18 horas 100.000 NA BM MNC y 50.000 células efectoras KC 1333 por pocillo en 200 µl de FBS/RPMI 1640 10 % en placa TC de 96 pocillos en presencia de anticuerpo de Medi-563 10 µg/ml. Se realizaron reacciones de control negativo usando el anticuerpo de control de isotipo R347 aFuc de especificidad irrelevante. Las células efectoras KC 1333 usadas en el ensayo de ADCC se pintaron con CFDA SE. Después de la incubación de 18 horas, las células de cada reacción se lavaron tres veces con medio templado y se inmunotiñeron para citometría de flujo. Las células positivas para IL-5Ra se detectaron por tinción de anticuerpo primario KM 1257/anticuerpo secundario específico IgG Fcg anti Mu de cabra conjugado con PE. Se realizó tinción de control de las muestras con anticuerpo primario de control de isotipo coincidente 1A7 en combinación con el anticuerpo secundario específico de IgG Fcg anti Mu de cabra conjugado con PE. Se realizó inmunotinción y citometría de flujo usando los protocolos convencionales. El número de células positivas para IL-5Ra que permanecen en una muestra después de ADCC se determinó contando el número de células positivas para KM1257 en una selección de linfocitos. Los procedimientos de inmunotinción y citometría de flujo se calibraron usando la línea celular CTLL-2 que expresaba un transgén de IL-5Ra humano. La ADCC mediada por MEDI-563 agotó sustancialmente todas las células positivas para IL-5Ra de las muestras de NA BM MNC. Los resultados se resumen en las figuras 17A y 17B.

EJEMPLO 9

Agotamiento mediado por MEDI-563 de eosinófilos de sangre periférica

Se admitieron dos cohortes de seis sujetos con asma leve en un estudio abierto de MEDI-563. Los sujetos de las cohortes 1 y 2 recibieron una única dosis intravenosa de 0,03 mg/kg y 0,1 mg/kg de MEDI-563, respectivamente, y sus niveles de eosinófilos en sangre periférica se enumeraron en la exploración, el día 0 antes de la dosificación y a intervalos regulares hasta el día 84 y en el seguimiento. Se detectaron eosinófilos en circulación por citometría de flujo. Los eosinófilos en circulación se redujeron por debajo del límite de detección a las 24 horas de dosificación en los seis sujetos de ambas cohortes. La eosinopenia inducida por MEDI-563 duró 8-12 semanas. En la cohorte 1, después de la administración de una única dosis de MEDI-563 0,03 mg/kg, de los cinco sujetos que completaron el estudio de 84 días, los eosinófilos se hicieron detectables en 1 sujeto el día 58, en 3 sujetos el día 84; el quinto sujeto no tuvo ningún eosinófilo en circulación detectable el día 84. En la cohorte 2, después de la administración de una única dosis de MEDI-563 0,1 mg/kg, ninguno de los sujetos tuvo eosinófilos en circulación detectables el día 84. Los eosinófilos en sangre periférica fueron detectables, sin embargo, en los seis sujetos de la cohorte 2 en un examen de seguimiento posterior. Se presentan los niveles de eosinófilos en sangre periférica detectados en las cohortes 1 y 2 en diversos intervalos temporales después de la administración de una única dosis de MEDI-563 en las figuras 18A y 18B.

EJEMPLO 10

Inmunohistoquímica de IL-5Ra

Se tiñeron secciones pulmonares de un sujeto humano sano con MEDI-563 usando técnicas histoquímicas convencionales. Los resultados se resumen en la figura 19. Las células que expresan IL-5Ralfa aparecen en negro en la imagen.

Se tiñeron muestras tisulares pulmonares obtenidas de biopsia bronquial o transbronquial de pacientes asmáticos con MEDI-563 usando técnicas histoquímicas convencionales. Los resultados se resumen en la figura 20. Las células que expresan IL-5Ralfa aparecen en gris oscuro/negro en la imagen.

Ejemplo 11

MEDI-563 se dirige eficazmente a basófilos y eosinófilos aislados en un ensayo de ADCC *in vitro*.

Se aislaron basófilos y eosinófilos de donantes sanos con un kit disponible en el mercado (kit de selección negativa de NK/eosinófilos/basófilos RoboSep, Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá). La expresión de IL-5Ralfa de las células aisladas se determinó por citometría de flujo. Las células se tiñeron por anticuerpo MEDI-563 o un anticuerpo de control de isotipo de especificidad irrelevante después de protocolos convencionales. Las células

inmunoteñidas se analizaron por citometría de flujo. Se muestran perfiles de tinción en la figura 21. Tanto los basófilos como los eosinófilos aislados presentaron un nivel de tinción con MEDI-563 mayor que el observado con el anticuerpo de control de isotipo. Se muestra el patrón de tinción de una línea celular que expresa un transgén de IL-5Ralfa/beta humano como un control positivo.

La actividad de MEDI-563 fucosilado y afucosilado se determinó en un ensayo de ADCC *in vitro* usando eosinófilos y linfocitos NK autólogos aislados. Los eosinófilos y los linfocitos NK se aislaron de donantes sanos usando kits disponibles en el mercado (kit de selección negativa de NK/eosinófilos/basófilos RoboSep, Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá). El ensayo de ADCC se realizó con linfocitos NK y eosinófilos aislados como efectores y células diana a una relación 5:1. Las concentraciones de anticuerpos ensayadas varían de 10^{-15} a 10^{-7} M. La citotoxicidad se midió después de 24 horas de incubación usando un ensayo de anexina V basado en citometría de flujo. La actividad ADCC de MEDI-563 afucosilado fue varios órdenes de magnitud mayor que la del anticuerpo MEDI-563 fucosilado. El valor EC50 de MEDI-563 afucosilado fue 0,965 pM en este ensayo. Los resultados de un experimento representativo se muestran en la figura 22.

La actividad de MEDI-563 afucosilado se determinó en un ensayo de ADCC *in vitro* usando basófilos y linfocitos NK autólogos aislados. Los basófilos y linfocitos NK se aislaron de donantes sanos usando kits disponibles en el mercado (kit de selección negativa de NK/eosinófilos/basófilos RoboSep, Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá). El ensayo de ADCC se realizó con linfocitos NK y eosinófilos aislados como efectores y células diana a una relación 5:1. Las concentraciones de anticuerpos ensayadas varían de 10^{-15} a 10^{-11} M. La citotoxicidad se midió después de 24 horas de incubación determinando las células positivas para anexina V por citometría de flujo. El valor de EC50 de MEDI-563 afucosilado fue de 0,561 pM en este ensayo. Los resultados de un experimento representativo se muestran en la figura 23.

Ejemplo 12

Los eosinófilos no liberan gránulos citotóxicos en ensayo de ADCC mediado por MEDI-563

Se determinó la desgranulación de eosinófilos expuestos a ADCC dirigida a MEDI-563 midiendo la liberación de EDN (neurotoxina derivada de eosinófilos) al sobrenadante. Las condiciones de ADCC *in vitro* usadas fueron similares a las descritas en el ejemplo 11. Se usaron eosinófilos y linfocitos NK o células PBMC aislados de donantes sanos como células diana y efectoras, respectivamente. Se realizaron ensayos usando MEDI-563 fucosilado; MEDI-563 afucosilado o el anticuerpo de control de isotipo R347 afucosilado. Se consiguió desgranulación máxima exponiendo los eosinófilos a tritón X-100 1 %; se detectó concentración de EDN > 220 ng/ml tras desgranulación máxima de las células. Los resultados del experimento representativo se muestran en la figura 24. Los niveles de EDN permanecieron por debajo de 25 ng/ml (línea basal) después de ADCC mediada por MEDI-563. La concentración de MEDI-563 (33 o 100 mg/ml) o el estado de fucosilación del anticuerpo no afectaron significativamente a los niveles de desgranulación.

Ejemplo 13

Mapeo de epítomos de MEDI-563

MEDI-563 se une específicamente con células transgénicas que expresan la proteína de IL-5Ralfa humana. MEDI-563 no se une con células que expresan una proteína de IL-5Ralfa de ratón. Véase figuras 25B y 26C. La secuencia de aminoácidos de las proteínas de IL5-Ralfa de ratón y humanas son altamente similares. La especificidad epitópica de MEDI-563 se determinó analizando las características de unión de MEDI-563 con un gran panel de proteínas IL-5Ralfa quiméricas de ratón-ser humano (figuras 25-27). Los experimentos utilizaron células transgénicas que expresaban las proteínas de IL-5Ralfa quiméricas en su superficie celular. Se generaron construcciones transgénicas y se expresaron usando métodos moleculares convencionales. La unión de anticuerpo con una proteína de IL-5Ralfa quimérica expresada en la superficie de células transgénicas se determinó por citometría de flujo. Se muestran perfiles de tinción fluorescentes en las figuras 25-27. "Policlonal" y "MEDI-563" indican perfiles de tinción observados usando un anticuerpo anti IL-5Ralfa humano policlonal y MEDI-563, respectivamente. Aunque MEDI-563 es específico para un único epítipo de la proteína de IL-5Ralfa humana, el anticuerpo policlonal reconoce múltiples epítomos de IL-5Ralfa humano (figuras 25B y 26C). La "tinción dual" indica el perfil de tinción fluorescente para los anticuerpos policlonal (eje x) y MEDI-563 (eje Y).

En primer lugar, el epítipo de MEDI-563 se mapeó en la región D1 del dominio extracelular de IL-5Ralfa. IL-5Ralfa comprende 3 dominios extracelulares (D1, D2 y D3), un dominio transmembrana y un dominio intracelular (figura 25A). Debido a que MEDI-563 reconoce IL-5Ralfa en células intactas, su epítipo debe localizarse en uno de los dominios extracelulares. Para mapear el epítipo de MEDI-563 en uno de los tres dominios extracelulares, se generaron células transgénicas que expresaban proteínas de IL-5Ralfa quiméricas que comprendían dominios

extracelulares de ratón y ser humano usando métodos de clonación molecular convencionales. Se muestra una representación esquemática de las proteínas quiméricas ensayadas en la figura 25A. Las variantes de "anulación" fueron proteínas de IL-5Ralfa quiméricas que comprendían un único dominio extracelular de ratón en un fondo de otro modo humano. Las variantes de "introducción" fueron proteínas de IL-5Ralfa quiméricas que comprendían un

La figura 25B-C muestra el resultado de un experimento representativo. Tanto MEDI-563 como el anticuerpo policlonal tiñeron las células transgénicas que expresaban la proteína de IL-5Ralfa humana; ninguno de los anticuerpos tiñó células transgénicas que expresaban IL-5Ralfa de ratón (figura 25B). MEDI-563 no se unió con células transgénicas que expresaban un transgén de IL-5Ralfa quimérico que comprendía los dominios extracelulares D1 de ratón y D2-D3 humanos (figura 25C; "anulación de D1"). MEDI-563 se unió específicamente con células transgénicas que expresaban un transgén de IL-5Ralfa quimérico que comprendía dominios extracelulares D2 o D3 de ratón en un fondo humano (figura 23C; "anulación de D2 o D3"). MEDI-563 se unió específicamente con células transgénicas que expresaban un transgén de IL-5Ralfa quimérico que comprendía los dominios extracelulares D1 humano y D2-D3 de ratón (figura 25D; "introducción de D1"). MEDI-563 no se unió con células transgénicas que expresaban un transgén quimérico basado en IL-5Ralfa de ratón que comprendía el dominio extracelular D2 o D3 humano (figura 25D; "introducción de D2 o D3"). Todas las células que expresaban una proteína de IL-5Ralfa quimérica que comprendía al menos un dominio extracelular de la proteína humana se tiñeron por el anticuerpo policlonal anti IL-5Ralfa humano lo que mostró que la diferencia en el patrón de tinción de MEDI-563 entre las células transgénicas no se debía a una diferencia en el nivel de expresión de proteínas quiméricas.

En segundo lugar, el epítipo de MEDI-563 se mapeó en el segmento B del dominio extracelular D1 de IL-5Ralfa humano (figura 26). El dominio extracelular D1 de IL-5Ralfa se dividió en tres segmentos (figura 26A, segmentos A, B y C). Se generó una serie de transgenes de IL-5Ralfa quiméricos de ser humano-ratón que comprendían diversas combinaciones de segmentos humanos y de ratón del dominio extracelular D1; las proteínas quiméricas usadas en este estadio comprendían todas las secuencias humanas fuera del dominio extracelular D1. Los transgenes de "anulación" fueron construcciones de IL-5Ralfa quiméricas que comprendían un único segmento de ratón del dominio extracelular D1 en un fondo en lo demás humano. Los transgenes de "introducción" fueron construcciones de IL-5Ralfa quiméricas que comprendían un único segmento humano del dominio extracelular D1 en un fondo de D1 de ratón-D2 humano-D3 de ratón-TM de ratón (figura 26B). La figura 26C muestra el resultado de un experimento de control. MEDI-563 reconoció específicamente células transgénicas que expresaban (i) un transgén de IL-5Ralfa humano o (ii) un transgén quimérico de IL-5Ralfa de ratón que comprendía un dominio extracelular D1 humano ("IL-5Ra humano" e "introducción de D1"). MEDI-563 no se unió con células transgénicas que expresaban (i) transgén del receptor IL-5Ralfa de ratón o (ii) un transgén de IL-5Ralfa quimérico humano que comprendió dominio extracelular D1 de ratón ("IL-5Ra de ratón", "anulación de D1"). Las figuras 26D y E muestran el resultado de un experimento de mapeo representativo. MEDI-563 no se unió con células transgénicas que expresaban un transgén de IL-5Ralfa quimérico que comprendía un segmento B de ratón del dominio extracelular D1 en un fondo en lo demás humano ("anulación de B"). MEDI-563 se unió específicamente con células transgénicas que expresaban un transgén de IL-5Ralfa quimérico que comprendía el segmento A o C de ratón del dominio extracelular D1 en un fondo humano ("anulación de A", "anulación de C"). La figura 26E muestra un ejemplo de los resultados obtenidos con las construcciones de introducción. MEDI-563 se unió específicamente con células transgénicas que expresaban un transgén de IL-5Ralfa quimérico que comprendía el segmento B humano del dominio extracelular D1 en un fondo de D1 de ratón-D2 humano-D3 de ratón-TM de ratón ("introducción de B"). MEDI-563 no se unió con células transgénicas que expresaban un transgén de IL-5Ralfa quimérico que comprendía un segmento A o C humano del dominio extracelular D1 en un fondo de D1 de ratón-D2 humano-D3 de ratón-TM de ratón ("introducción de A o C"). todas las células que expresaban una proteína de IL-5Ralfa quimérica se tiñeron con el anticuerpo policlonal anti IL-5Ralfa humano que mostraba que la diferencia en el patrón de tinción de MEDI-563 entre las células transgénicas no se debía a una diferencia en el nivel de expresión de proteínas quiméricas.

En tercer lugar, el epítipo de MEDI-563 se mapeó en restos de aminoácidos particulares dentro del segmento B1 del dominio extracelular D1 de IL-5Ralfa humano. Se expresó en células transgénicas una serie de variantes de receptor IL-5Ralfa que comprendían al menos un resto de aminoácido mutante dentro del segmento B1 del dominio extracelular D1. La posición de restos mutantes se seleccionó comparando la secuencia de aminoácidos de ratón y humana. Se muestra un esquema de las proteínas variantes ensayadas en la figura 27A. Las variantes de IL-5Ralfa "de anulación" fueron proteínas humanas mutantes que comprendían al menos una sustitución que intercambiaba un resto de ratón por el resto humano correspondiente. Por ejemplo, la variante de "anulación DE" fue una proteína de IL-5Ralfa humana que comprendía la sustitución de los aminoácidos D56E y E58D. las variantes de IL-5Ralfa de "introducción" fueron proteínas quiméricas que comprendían D1 de ratón, D2 humano, D3 de ratón y TM de ratón en las que el dominio D1 de ratón comprendía una versión mutante del segmento B de ratón que tenía al menos una sustitución que intercambiaba un resto humano por el resto de ratón correspondiente. Por ejemplo, la variante de "introducción de DE" fue una proteína de IL-5Ralfa quimérica que comprendía el segmento B de ratón mutante en un fondo de D1 de ratón-D2 humano-D3 de ratón-TM de ratón en el que el segmento B de ratón mutante comprendía las sustituciones de aminoácidos E56D y D58E. La figura 27B muestra un ejemplo de los resultados obtenidos usando las construcciones de anulación. MEDI-563 no se unió con células transgénicas que expresaban una proteína de IL-5Ralfa humana mutante que comprendía las sustituciones de aminoácidos K53Q, D56E, E58D, 161K ("anulación de KDEI"). MEDI-563 se unió específicamente con células transgénicas que expresaban una proteína de

IL-5Ralfa humana mutante que comprendía las sustituciones de aminoácidos N40H, N42D, Q46H ("anulación de NNQ") o D56E, E58D ("anulación de DE"), o N40H, N42D, D56E, E58D ("anulación de NNDE"). La figura 27C muestra un ejemplo de los resultados obtenidos usando las construcciones de introducción. MEDI-563 se unió específicamente con células transgénicas que expresaban una proteína de IL-5Ralfa variante que comprendía un segmento B de ratón mutante de D1 que tenía las sustituciones de aminoácidos Q53K, E56D, D58E, K61I ("introducción de KDEI"). La figura 27D muestra un ejemplo de los resultados obtenidos usando las construcciones de anulación. MEDI-563 no se unió con células transgénicas que expresaban una proteína de IL-5Ralfa humana mutante que comprendía la sustitución de aminoácidos 161K ("anulación de I61"). MEDI-563 se unió específicamente con células transgénicas que expresaban una proteína de IL-5Ralfa humana mutante que comprendía la sustitución de aminoácidos K53Q ("anulación de K53"). (E) la figura 27E muestra un ejemplo de los resultados obtenidos usando las construcciones de introducción. MEDI-563 se unió específicamente con células transgénicas que expresaban una proteína de IL-5Ralfa variante que comprendía un segmento B de ratón mutante de D1 que tenía la sustitución de aminoácidos K61I ("introducción de I61"). MEDI-563 no se unió con células transgénicas que expresaban una proteína de IL-5Ralfa variante que comprendía un segmento B de ratón mutante de D1 que tenía las sustituciones de aminoácidos Q53K ("introducción de K53"). Todas las células que expresaban una proteína de IL-5Ralfa quimérica se tiñeron por el anticuerpo policlonal anti IL-5Ralfa humano que mostraba que la diferencia del patrón de tinción de MEDI-563 entre las células transgénicas no se debía a una diferencia en el nivel de expresión de proteínas quiméricas.

Ejemplo 14

Agotamiento *in vivo* de eosinófilos de diversos tejidos.

Se evaluó la potencia de un anticuerpo afucosilado anti IL-5Ra de ratón (afuc H7) para agotar selectivamente eosinófilos de diversos tejidos *in vivo* en comparación con H7 fucosilado (fuc H7).

Métodos: anticuerpo monoclonal H7: las regiones variables de H7 se injertaron en Fc hIgG 1. Fuc H7 se expresó en células CHO de tipo silvestre y afuc H7 en células CHO deficientes en PUT8.

Afinidades de anticuerpo (KD): se midieron las afinidades usando tecnología de resonancia de plasmón superficial.

Ratones: se usaron ratones transgénicos para IL-5, y ratones BALB/c a las 6-8 semanas de edad.

Agotamiento de eosinófilos en ratones IL-5Tg: se dosificó a ratones con 0,01-10 mg/kg de H7 afuc y fuc i.p. y se analizaron los números de eosinófilos 48 horas después.

Inducción de la inflamación de las vías respiratorias alérgica: se sensibilizaron ratones BALB/c a OVA en alumbre y se expusieron a OVA los días 17-22. Los ratones se dosificaron con 0,1 mg/kg de H7 afuc i.p. el día 22 y se realizó análisis 1 hora, 24 horas y 72 horas después de la exposición final. Esto correspondió a 25, 48 y 96 horas después del tratamiento con anticuerpo.

Aislamiento de leucocitos:

i) Sangre. Se recogió sangre por punción cardiaca y se mantuvo en tubos heparinizados. Los leucocitos sanguíneos se fenotiparon usando un analizador de hematología Sysmex (Sysmex Corp.), o por citometría de flujo.

ii) Lumen de las vías respiratorias. Las vías respiratorias se lavaron con PBS 3X0,6 ml. Las muestras de BAL se centrifugaron a 1200 rpm, se retiraron los sobrenadantes y las células se resuspendieron en RPMI. Las células se contaron usando un contador Coulter Z2 (Beckman-Coulter), y se fenotiparon por citometría de flujo.

iii) Tejido pulmonar. Se incubó un lóbulo de pulmón a 37 °C durante 1 hora en reactivo de digestión Liberase (18 mg/ml) [Blenzyme 2; Roche], DNase 25 µg/ml [tipo 1; Roche] en RPMI/FCS 10 %. Las células recuperadas se filtraron a través de un tamiz de nailon de 70 µm (Falcon), se lavaron dos veces y se contaron y se fenotiparon como para BAL.

iv) Médula ósea. Se aislaron fémures de ratones donantes, y la médula se retiró por lavado con una jeringa unida a una aguja de calibre 25 que contenía PBS (sin calcio/magnesio). Se prepararon suspensiones celulares individuales lavando la médula arriba y abajo suavemente en una jeringa unida a una aguja del calibre 22. Las células de la médula ósea se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos, se lavaron dos veces con PBS sin aditivos, se resuspendieron en RPMI, se contaron y se fenotiparon por citometría de flujo.

v) Bazos. Los bazo se retiraron y se prepararon suspensiones celulares individuales usando tamices de nailon de 70 µm. Los leucocitos se resuspendieron en RPMI, se contaron y se fenotiparon como para BAL.

Citometría de flujo. Las células se fenotiparon usando análisis citométrico de flujo. Los anticuerpos usados fueron anti ratón CD4, CD19, CD11b, Siglec-F, Gr-1, IL-5R, c-kit (BD Biosciences), FcγR1 (eBiosciences), y CCR-3 (R and D Systems), y sus controles de isotipo relevantes. Las muestras se analizaron usando un citómetro de flujo LSR II y software FACS DIVA (BD Biosciences). Los resultados se analizaron adicionalmente usando FlowJo (TreeStar Corp.).

Identificación de eosinófilos: los eosinófilos se identificaron por análisis citométrico de flujo como células con alta dispersión lateral que se tiñeron positivamente para CCR3 y Siglec-F.

Resultados: IL-5R se expresó selectivamente por eosinófilos en médula ósea, sangre, bazo y tejido pulmonar de ratones IL-5Tg. La expresión de IL-5R se restringió a eosinófilos y no se detectó en ningún otro tipo celular, incluyendo mastocitos o basófilos. El anticuerpo anti IL-5R agota selectivamente eosinófilos en el bazo, tejido pulmonar y sangre de ratones IL-5Tg. Ni anti IL-5R fucosilado ni afucosilado agotaron: neutrófilos (Gr-Ihi);

macrófagos/monocitos (CD11b+); linfocitos T (CD3+); linfocitos B (CD19+). H7 tanto afuc como fuc agotó eosinófilos en bazo, tejido pulmonar y sangre de ratones IL-5Tg. No se detectó agotamiento en la médula ósea. H7 afuc fue más potente en la retirada de eosinófilos en comparación con H7 fuc, especialmente a dosis de anticuerpo menores.

- 5 H7 Afuc también agotó selectivamente eosinófilos en un modelo de exposición a alérgeno. H7 afuc agotó eosinófilos en el lumen de las vías respiratorias, tejido pulmonar, sangre y medula ósea. El empobrecimiento fue mayor en todos los compartimentos 72 horas después de la exposición final (96 horas después del suministro de anticuerpo).

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> Biowa, Inc.
MedImmune LLC
Koike, Masamichi
Spitalny, George
- 15 Wheeler, Alistair
White, Barbara
- <120> MÉTODOS PARA REDUCIR LOS NIVELES DE EOSINÓFILOS
- 20 <130> IR400PCT
- <150> 60/924.422
<151> 14-05-2007
- 25 <150> 60/924.832
<151> 01-06-2007
- <150> 60/935.005
<151> 20-07-2007
- 30 <150> 61/064.612
<151> 14-03-2008
- <160> 6
- 35 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
- 40 <400> 1

ES 2 666 165 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 Gly Thr Ser Glu Asp Ile Ile Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr His Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 2
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2

ES 2 666 165 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 Gly Thr Ser Glu Asp Ile Ile Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr His Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 3
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3

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

<210> 4
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 5
<211> 400
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 5

Asp Leu Leu Pro Asp Glu Lys Ile Ser Leu Leu Pro Pro Val Asn Phe
1 5 10 15

Thr Ile Lys Val Thr Gly Leu Ala Gln Val Leu Leu Gln Trp Lys Pro
20 25 30

Asn Pro Asp Gln Glu Gln Arg Asn Val Asn Leu Glu Tyr Gln Val Lys
35 40 45

Ile Asn Ala Pro Lys Glu Asp Asp Tyr Glu Thr Arg Ile Thr Glu Ser
50 55 60

Lys Cys Val Thr Ile Leu His Lys Gly Phe Ser Ala Ser Val Arg Thr
65 70 75 80

Ile Leu Gln Asn Asp His Ser Leu Leu Ala Ser Ser Trp Ala Ser Ala
85 90 95

Glu Leu His Ala Pro Pro Gly Ser Pro Gly Thr Ser Ile Val Asn Leu
100 105 110

Thr Cys Thr Thr Asn Thr Thr Glu Asp Asn Tyr Ser Arg Leu Arg Ser
115 120 125

Tyr Gln Val Ser Leu His Cys Thr Trp Leu Val Gly Thr Asp Ala Pro
130 135 140

Glu Asp Thr Gln Tyr Phe Leu Tyr Tyr Arg Tyr Gly Ser Trp Thr Glu
145 150 155 160

5

10

Glu Cys Gln Glu Tyr Ser Lys Asp Thr Leu Gly Arg Asn Ile Ala Cys
 165 170 175
 Trp Phe Pro Arg Thr Phe Ile Leu Ser Lys Gly Arg Asp Trp Leu Ala
 180 185 190
 Val Leu Val Asn Gly Ser Ser Lys His Ser Ala Ile Arg Pro Phe Asp
 195 200 205
 Gln Leu Phe Ala Leu His Ala Ile Asp Gln Ile Asn Pro Pro Leu Asn
 210 215 220
 Val Thr Ala Glu Ile Glu Gly Thr Arg Leu Ser Ile Gln Trp Glu Lys
 225 230 235 240
 Pro Val Ser Ala Phe Pro Ile His Cys Phe Asp Tyr Glu Val Lys Ile
 245 250 255
 His Asn Thr Arg Asn Gly Tyr Leu Gln Ile Glu Lys Leu Met Thr Asn
 260 265 270
 Ala Phe Ile Ser Ile Ile Asp Asp Leu Ser Lys Tyr Asp Val Gln Val
 275 280 285
 Arg Ala Ala Val Ser Ser Met Cys Arg Glu Ala Gly Leu Trp Ser Glu
 290 295 300
 Trp Ser Gln Pro Ile Tyr Val Gly Asn Asp Glu His Lys Pro Leu Arg
 305 310 315 320
 Glu Trp Phe Val Ile Val Ile Met Ala Thr Ile Cys Phe Ile Leu Leu
 325 330 335
 Ile Leu Ser Leu Ile Cys Lys Ile Cys His Leu Trp Ile Lys Leu Phe
 340 345 350
 Pro Pro Ile Pro Ala Pro Lys Ser Asn Ile Lys Asp Leu Phe Val Thr
 355 360 365
 Thr Asn Tyr Glu Lys Ala Gly Ser Ser Glu Thr Glu Ile Glu Val Ile
 370 375 380
 Cys Tyr Ile Glu Lys Pro Gly Val Glu Thr Leu Glu Asp Ser Val Phe
 385 390 395 400

<210> 6
 <211> 398
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 6

ES 2 666 165 T3

Asp Leu Leu Asn His Lys Lys Phe Leu Leu Leu Pro Pro Val Asn Phe
 1 5 10 15
 Thr Ile Lys Ala Thr Gly Leu Ala Gln Val Leu Leu His Trp Asp Pro
 20 25 30
 Asn Pro Asp Gln Glu Gln Arg His Val Asp Leu Glu Tyr His Val Lys
 35 40 45
 Ile Asn Ala Pro Gln Glu Asp Glu Tyr Asp Thr Arg Lys Thr Glu Ser
 50 55 60
 Lys Cys Val Thr Pro Leu His Glu Gly Phe Ala Ala Ser Val Arg Thr
 65 70 75 80
 Ile Leu Lys Ser Ser His Thr Thr Leu Ala Ser Ser Trp Val Ser Ala
 85 90 95
 Glu Leu Lys Ala Pro Pro Gly Ser Pro Gly Thr Ser Val Thr Asn Leu
 100 105 110
 Thr Cys Thr Thr His Thr Val Val Ser Ser His Thr His Leu Arg Pro
 115 120 125
 Tyr Gln Val Ser Leu Arg Cys Thr Trp Leu Val Gly Lys Asp Ala Pro
 130 135 140
 Glu Asp Thr Gln Tyr Phe Leu Tyr Tyr Arg Phe Gly Val Leu Thr Glu
 145 150 155 160
 Lys Cys Gln Glu Tyr Ser Arg Asp Ala Leu Asn Arg Asn Thr Ala Cys
 165 170 175
 Trp Phe Pro Arg Thr Phe Ile Asn Ser Lys Gly Phe Glu Gln Leu Ala
 180 185 190
 Val His Ile Asn Gly Ser Ser Lys Arg Ala Ala Ile Lys Pro Phe Asp
 195 200 205
 Gln Leu Phe Ser Pro Leu Ala Ile Asp Gln Val Asn Pro Pro Arg Asn
 210 215 220
 Val Thr Val Glu Ile Glu Ser Asn Ser Leu Tyr Ile Gln Trp Glu Lys
 225 230 235 240
 Pro Leu Ser Ala Phe Pro Asp His Cys Phe Asn Tyr Glu Leu Lys Ile
 245 250 255
 Tyr Asn Thr Lys Asn Gly His Ile Gln Lys Glu Lys Leu Ile Ala Asn
 260 265 270

Lys Phe Ile Ser Lys Ile Asp Asp Val Ser Thr Tyr Ser Ile Gln Val
 275 280 285
 Arg Ala Ala Val Ser Ser Pro Cys Arg Met Pro Gly Arg Trp Gly Glu
 290 295 300
 Trp Ser Gln Pro Ile Tyr Val Gly Lys Glu Arg Lys Ser Leu Val Glu
 305 310 315 320
 Trp His Leu Ile Val Leu Pro Thr Ala Ala Cys Phe Val Leu Leu Ile
 325 330 335
 Phe Ser Leu Ile Cys Arg Val Cys His Leu Trp Thr Arg Leu Phe Pro
 340 345 350
 Pro Val Pro Ala Pro Lys Ser Asn Ile Lys Asp Leu Pro Val Val Thr
 355 360 365
 Glu Tyr Glu Lys Pro Ser Asn Glu Thr Lys Ile Glu Val Val His Cys
 370 375 380
 Val Glu Glu Val Gly Phe Glu Val Met Gly Asn Ser Thr Phe
 385 390 395

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal humanizado que se une con IL-5R para uso en la reducción de los números de basófilos en un sujeto humano por administración parenteral de dicho anticuerpo a dicho sujeto a de 0,01 a 0,25 mg/kg y en el que dicho anticuerpo comprende las secuencias de aminoácidos de SEC ID N°: 1 y 3 y una región Fc de inmunoglobulina que no comprende fucosa.
- 10 2. El anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo se une específicamente con la cadena α de IL-5R.
3. El anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que la reducción de basófilos de sangre periférica es reversible.
- 15 4. El anticuerpo para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el número de basófilos de sangre periférica de la circulación del sujeto humano se reduce a un nivel que está entre 0 y 10 basófilos/mm³.
- 20 5. El anticuerpo para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que hay una reducción después de la administración en el recuento de basófilos absoluto de al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 55, al menos 60, al menos 65 o al menos 70 basófilos/mm³.
- 25 6. El anticuerpo para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho recuento de basófilos absoluto previo a la administración del sujeto es de entre 5 y 500 basófilos/mm³.
- 30 7. El anticuerpo para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho recuento de basófilos absoluto previo a la administración del sujeto es de al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 30, al menos 50, al menos 60 o al menos 100 basófilos/mm³.

MEDI-563 induce normalización de ECP en suero

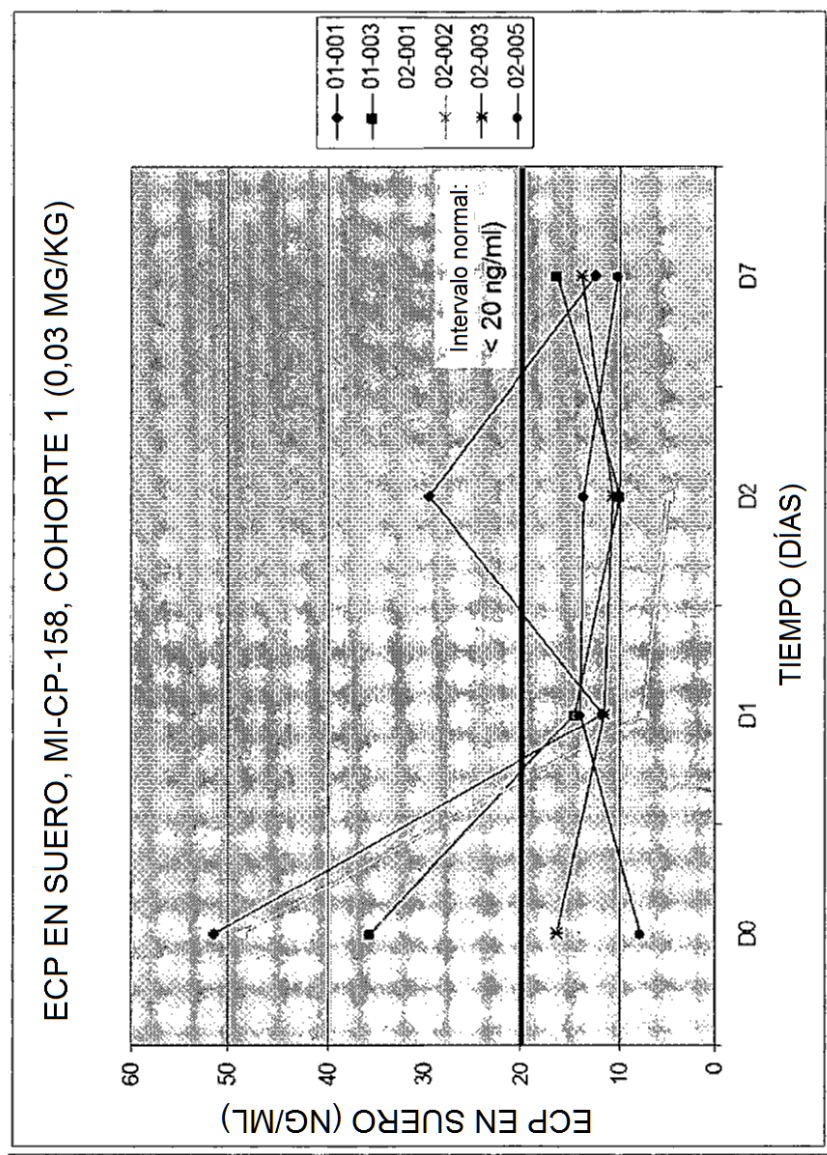


Fig. 1

Agotamiento de basófilos periféricos reversible

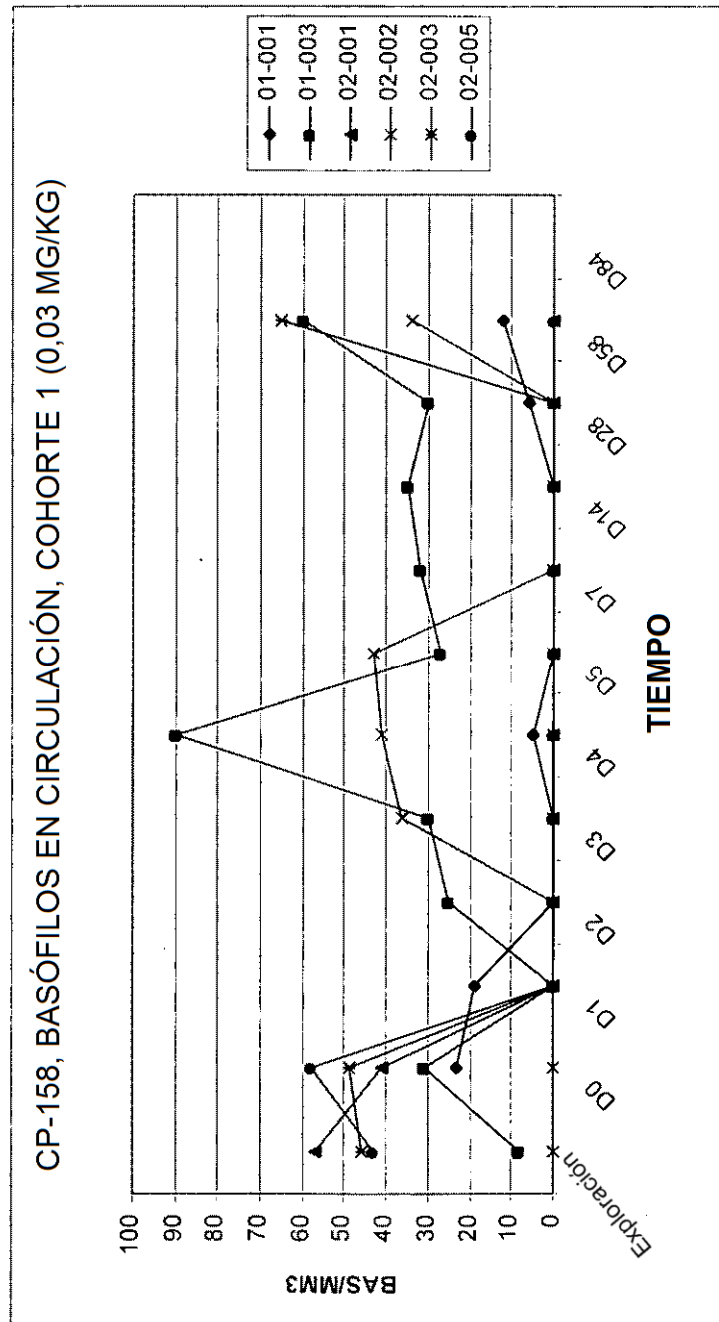
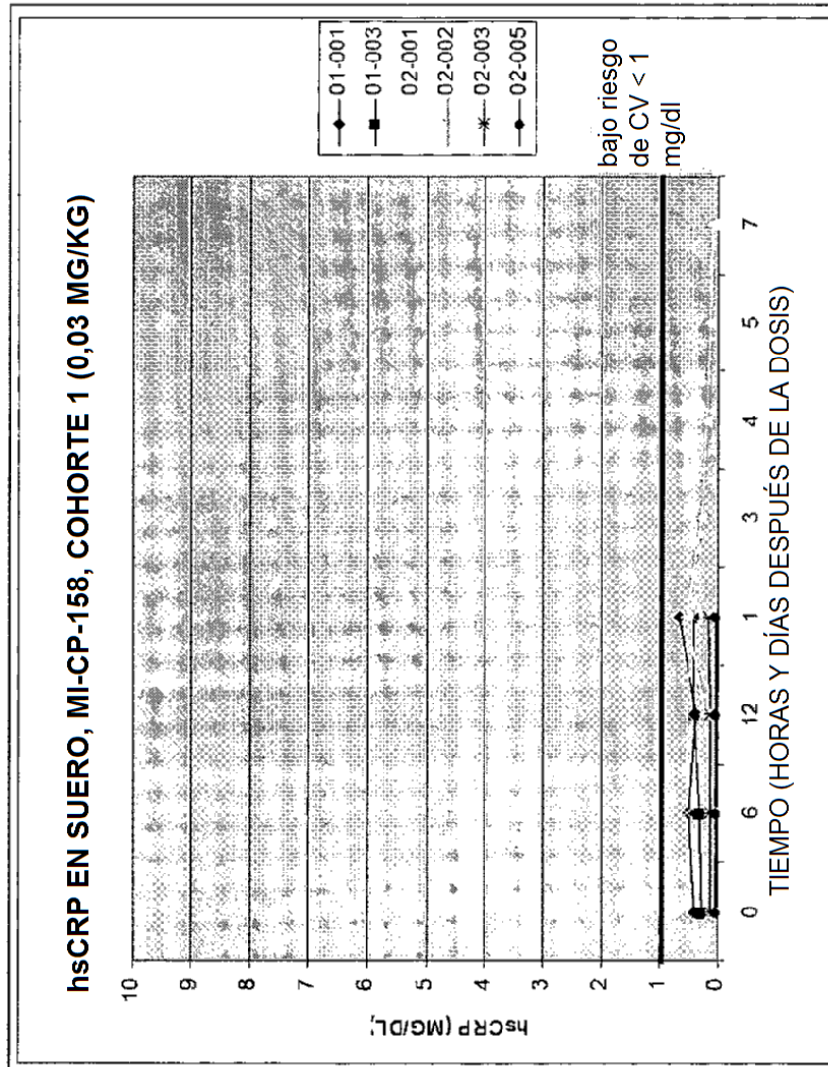


Fig. 2

Sin aumento en hsCRP en suero con 0,03 mg/kg de Medi-563



hsCRP:

> 10 mg/dl,
Inflamación

Riesgo de CV
(mg/dl):

Bajo < 1

Medio 1-3

Alto 3-10

Tormenta de citocinas:

hsCRP,
10-25 mg/dl

Fig. 3

Aumento mínimo y transitorio en IL-6 en suero con MEDI-563

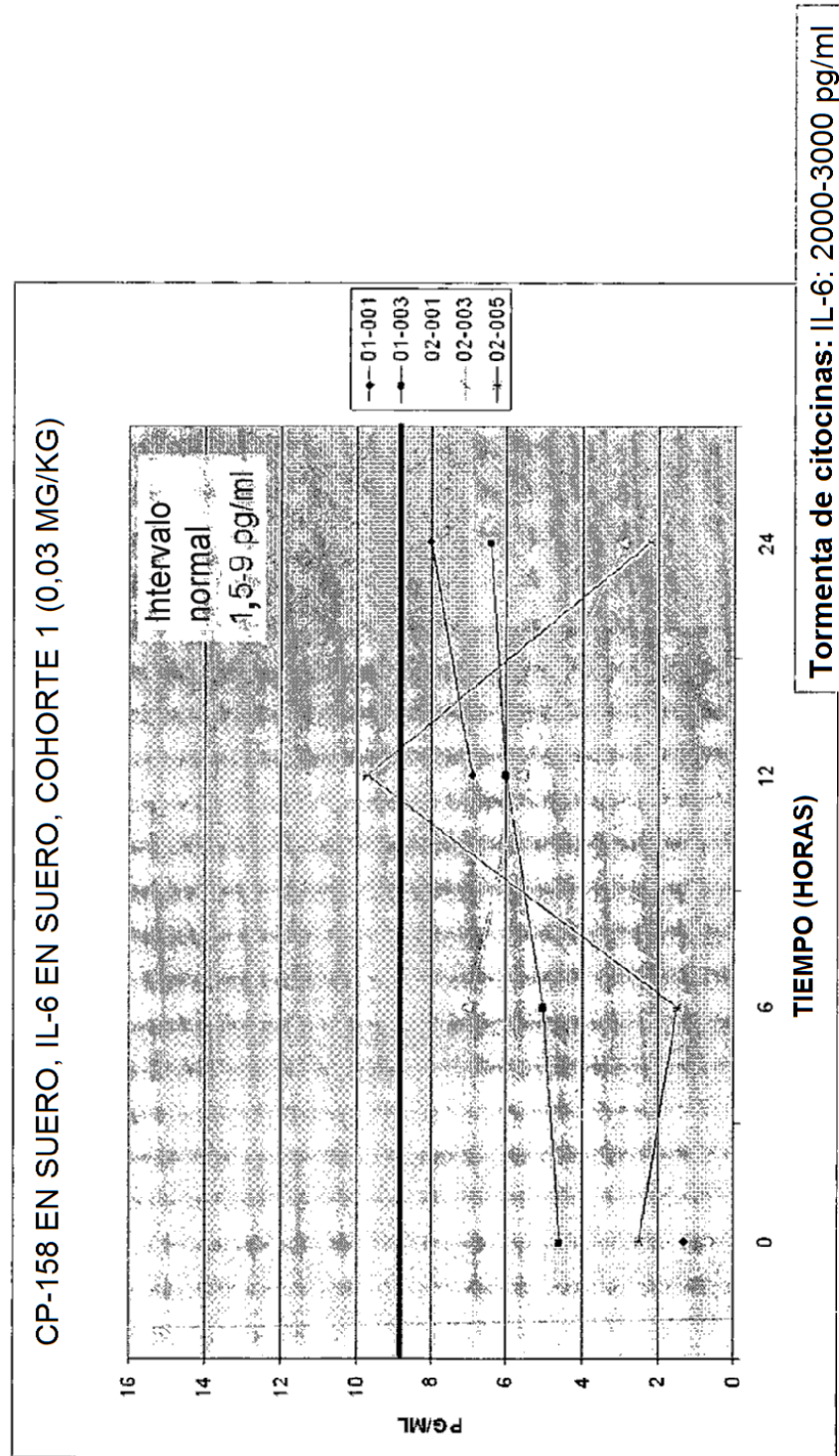


Fig. 4

Reducción variable de neutrófilos en circulación

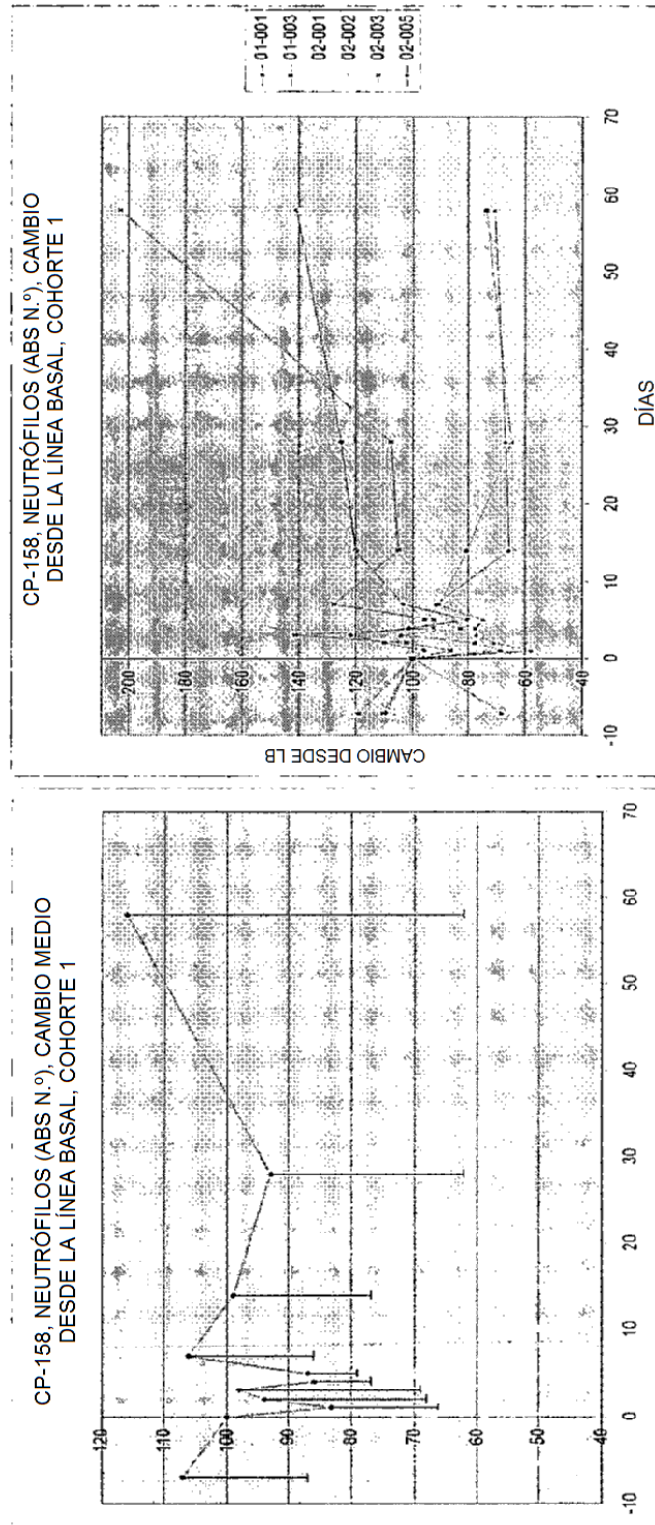


Fig. 5

Reducción variable de linfocitos en circulación

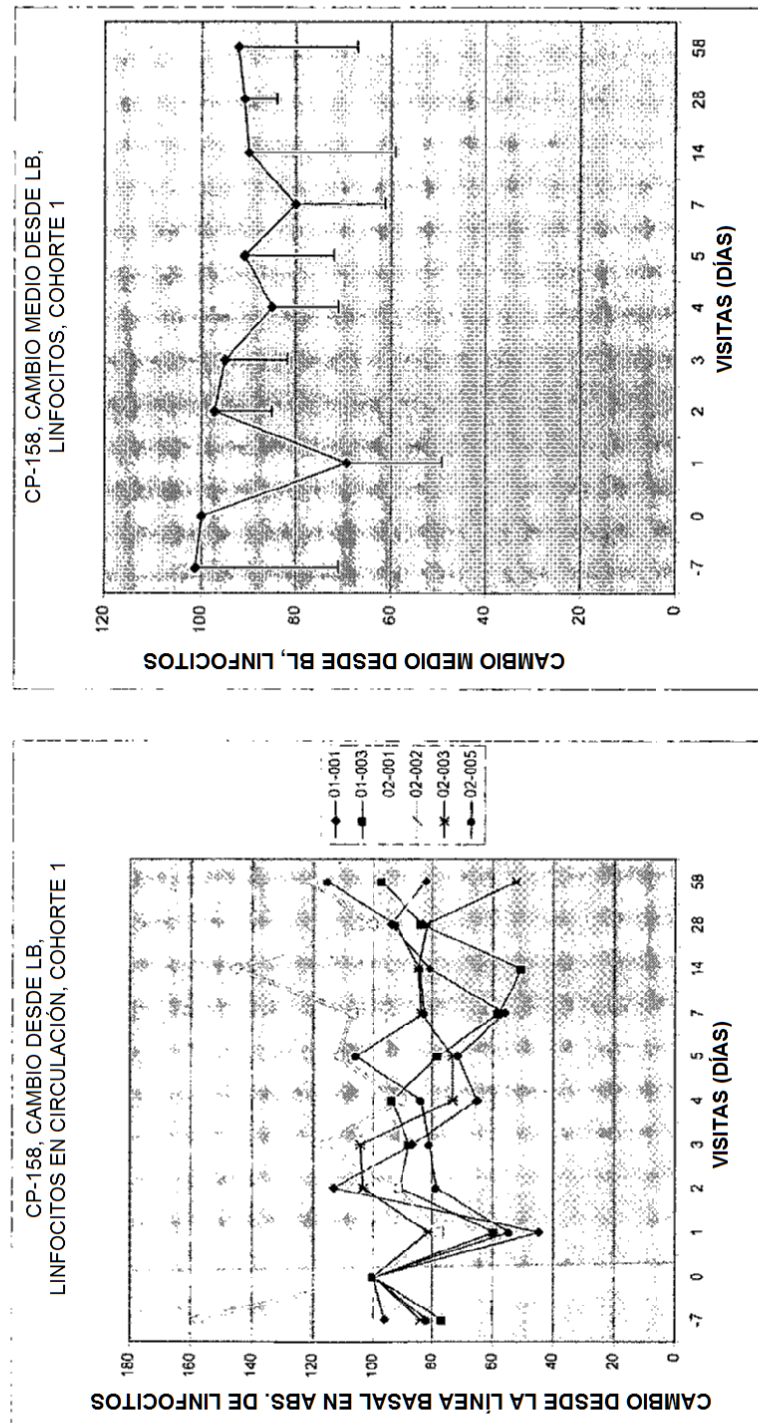


Fig. 6

Reducción uniforme y moderada del % de NK en D1

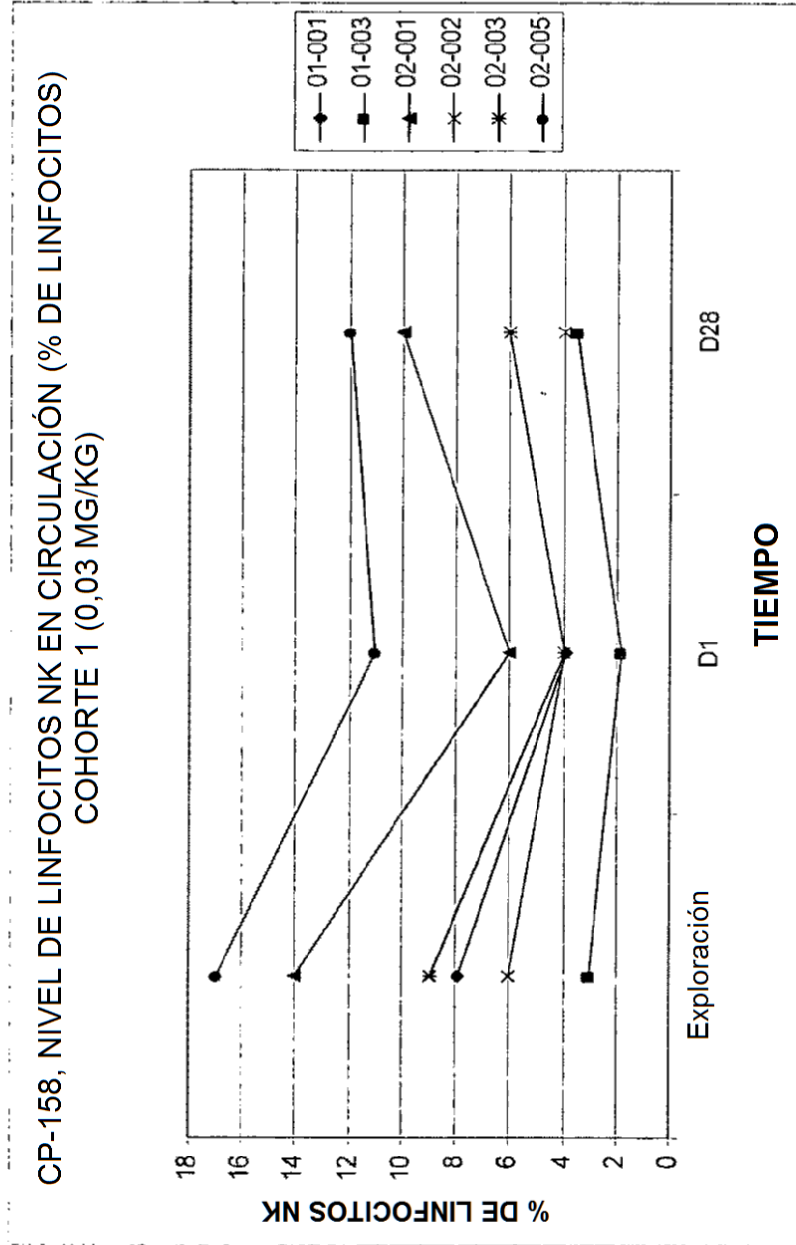


Fig. 7

FE_{NO} reducido en sujetos con mayor línea basal

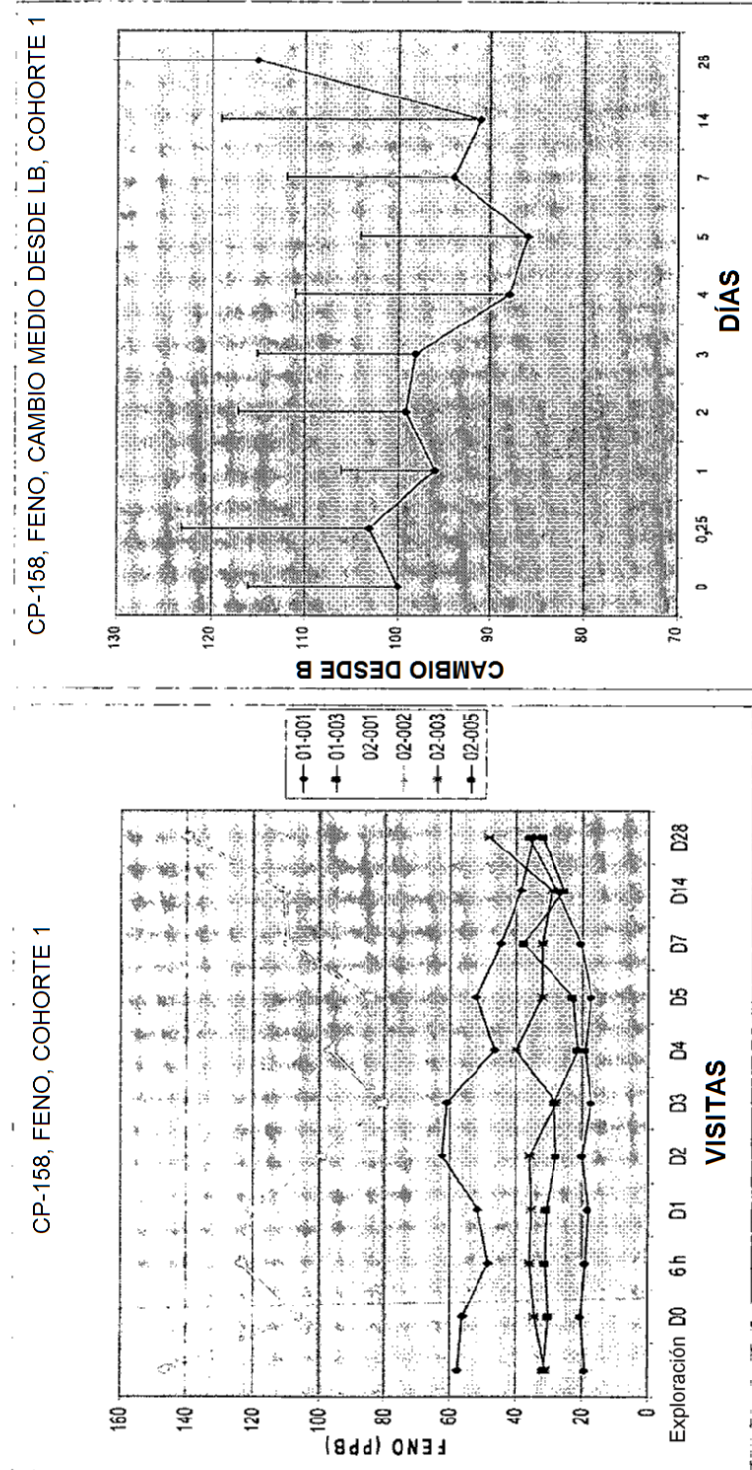


Fig. 8

Ensayo de Citotoxicidad

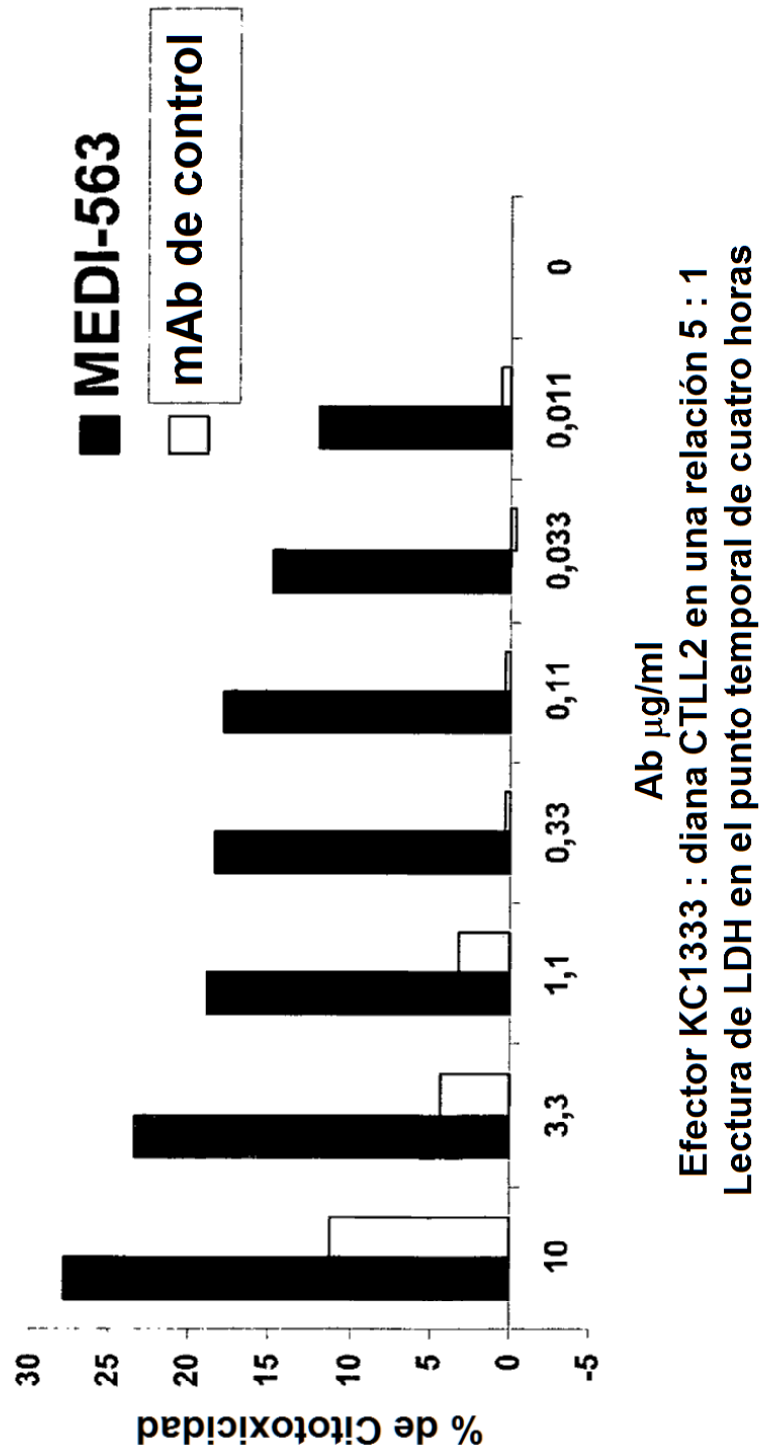
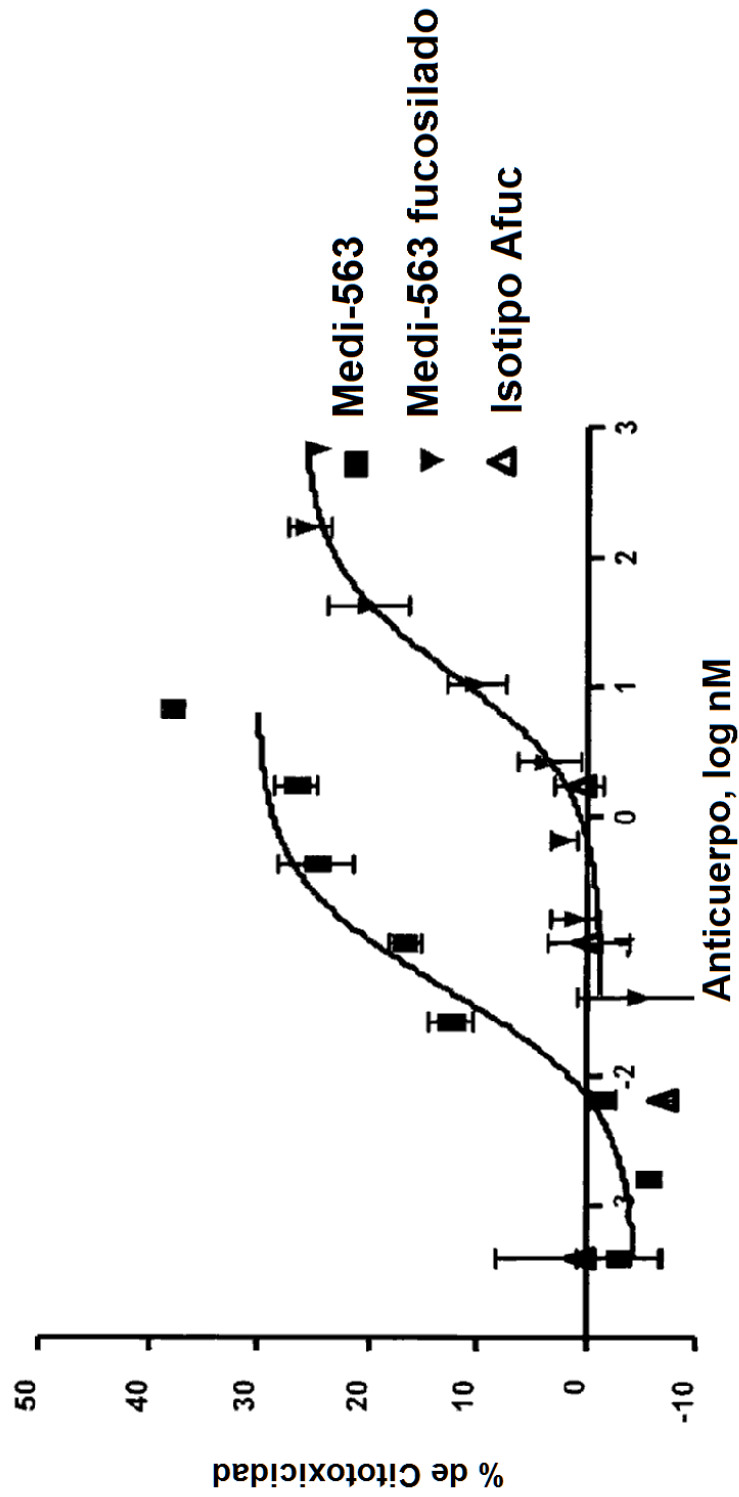


Fig. 9A

Destrucción de Células Diana Potenciada por Medi-563



CE50 Medi-563 = 40 pM

CE50 fucosilado = 10 pM

~ 250 veces

Fig. 9B

Unión de MEDI-563 con rhIL-5Ra

	<u>Formato</u>	<u>Instrumento</u>	<u>kon (1/Ms)</u>	<u>koff (1/s)</u>	<u>K_D (nM)</u>
			(xe+5)	(xe-3)	
Experimento 0	Captura	3000	7,4	2,1	2,9
Experimento 1	rhIL-5Ra-down	3000	5,16* (5,06/5,26)	1,11* (0,79/1,42)	2,13* (1,57/2,69)
Experimento 2	Captura	T100	3,03* (2,79/3,27)	1,92* (1,82/2,02)	6,35* (6,52/6,18)

Fig. 10

Unión de MEDI-563 con rhuFcγRs

Reactivo de ensayo	[Lote]	Receptor de Fc	Lote de Fc	K _D (nM)
BIW8405	5mg/ml	huFcγRIIb -	5/7/07	5730
BIW8405	5mg/ml	huFcγRIIIA - 158F	5/1/06	4760
BIW8405	5mg/ml	huFcγRIIIA - 158V	R22K ZZ3401-03	46
BIW8405	5mg/ml	huFcRI -	3/7/06	16
BIW8405	5mg/ml	huFcRIIA -	3/7/06	1290
BIW8405	5mg/ml	muFcγRIIb -	KB031407	1100
BIW8405	5mg/ml	muFcγRIII -	KS032307	4930
BIW8405	5mg/ml	muFcγRIV -	KS032307	32
Control	5mg/ml	huFcγRIIb -	5/7/07	14500
Control	5mg/ml	huFcγRIIIA - 158F	5/1/06	0
Control	5mg/ml	huFcγRIIIA - 158V	R22K ZZ3401-03	574
Control	5mg/ml	huFcRI -	3/7/06	19
Control	5mg/ml	huFcRIIA -	3/7/06	1280
Control	5mg/ml	muFcγRIIb -	KB031407	1470
Control	5mg/ml	muFcγRIII -	KS032307	6360
Control	5mg/ml	muFcγRIV -	KS032307	329

Fig. 11

Expresión de IL-5R en pulmón de ratón IL-9tg

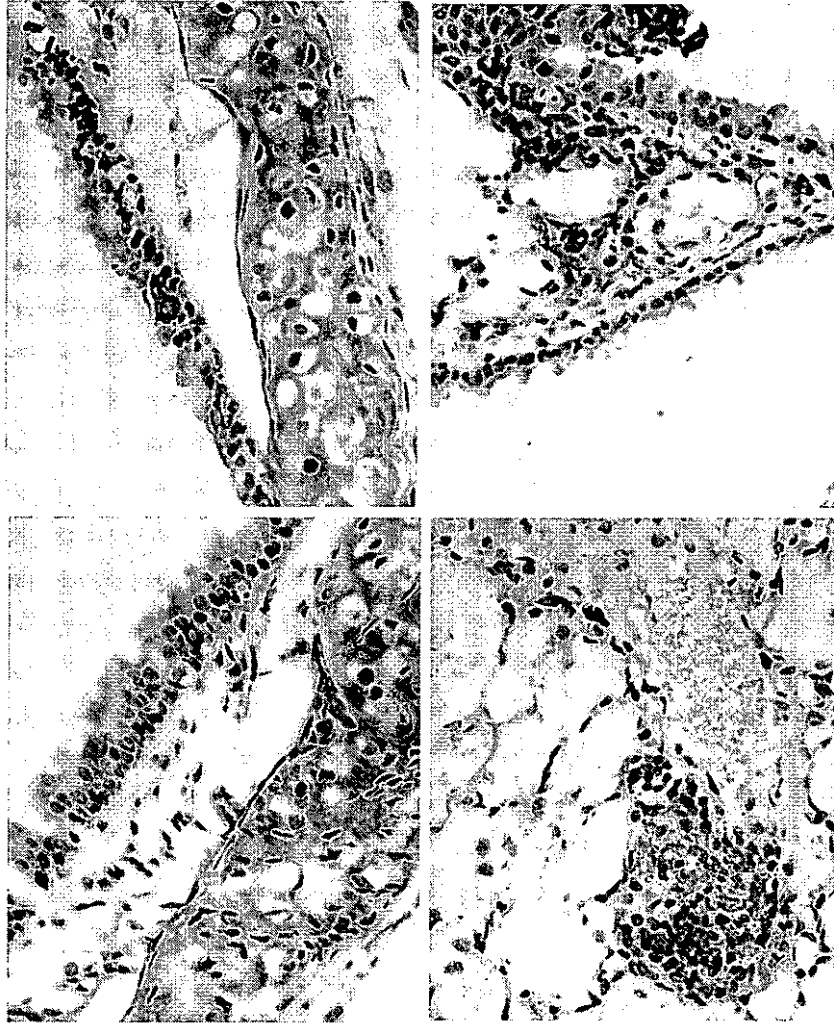


Fig. 12

Expresión de IL-5R en pólipos nasales

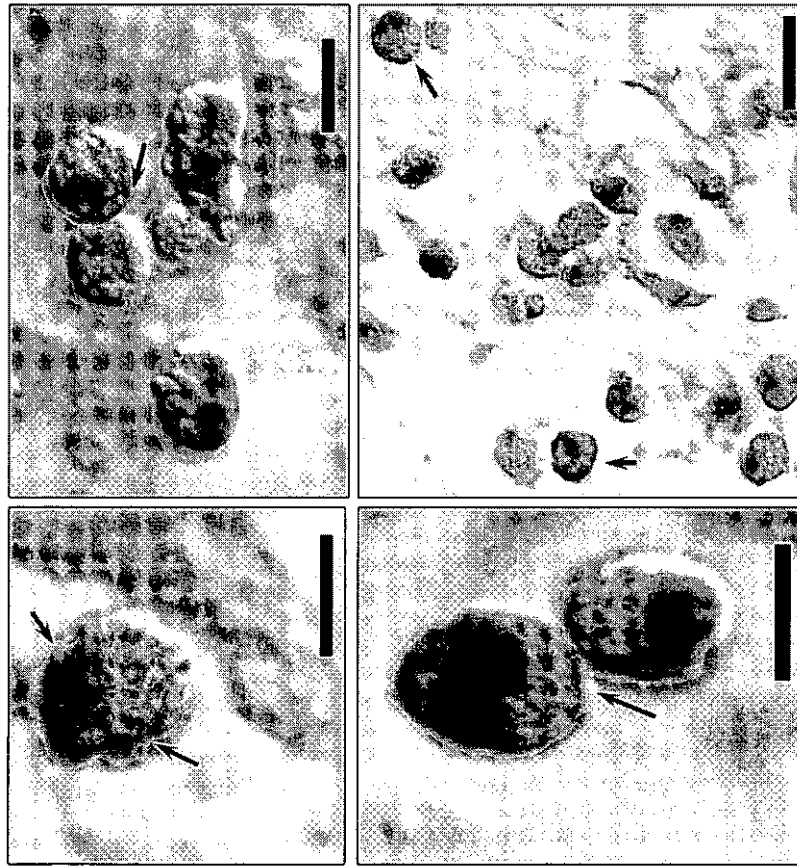


Fig. 13

Neutropenia mínima transitoria en 2/6 sujetos

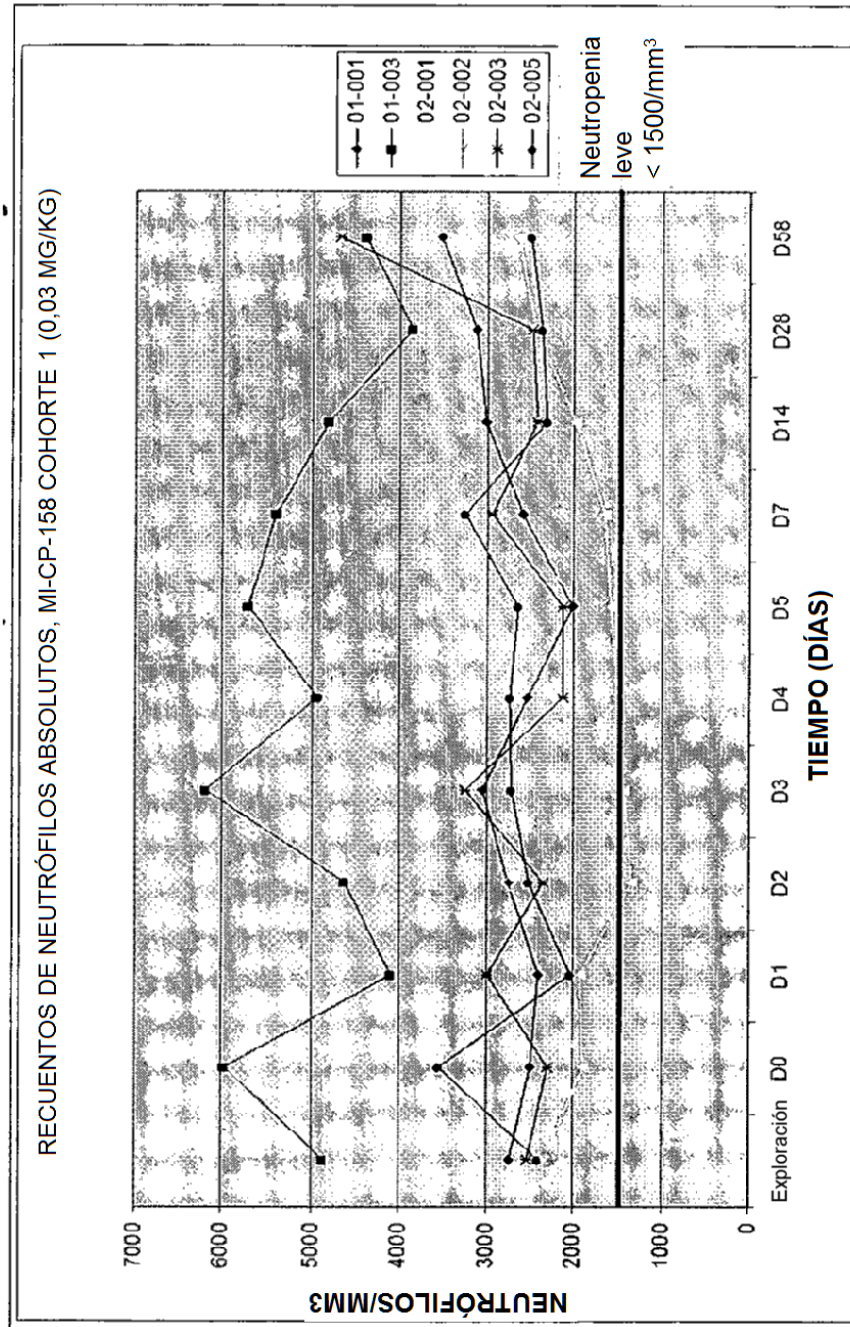


Fig. 14

Medi-563 se une con eosinófilos en sangre completa de donantes sanos

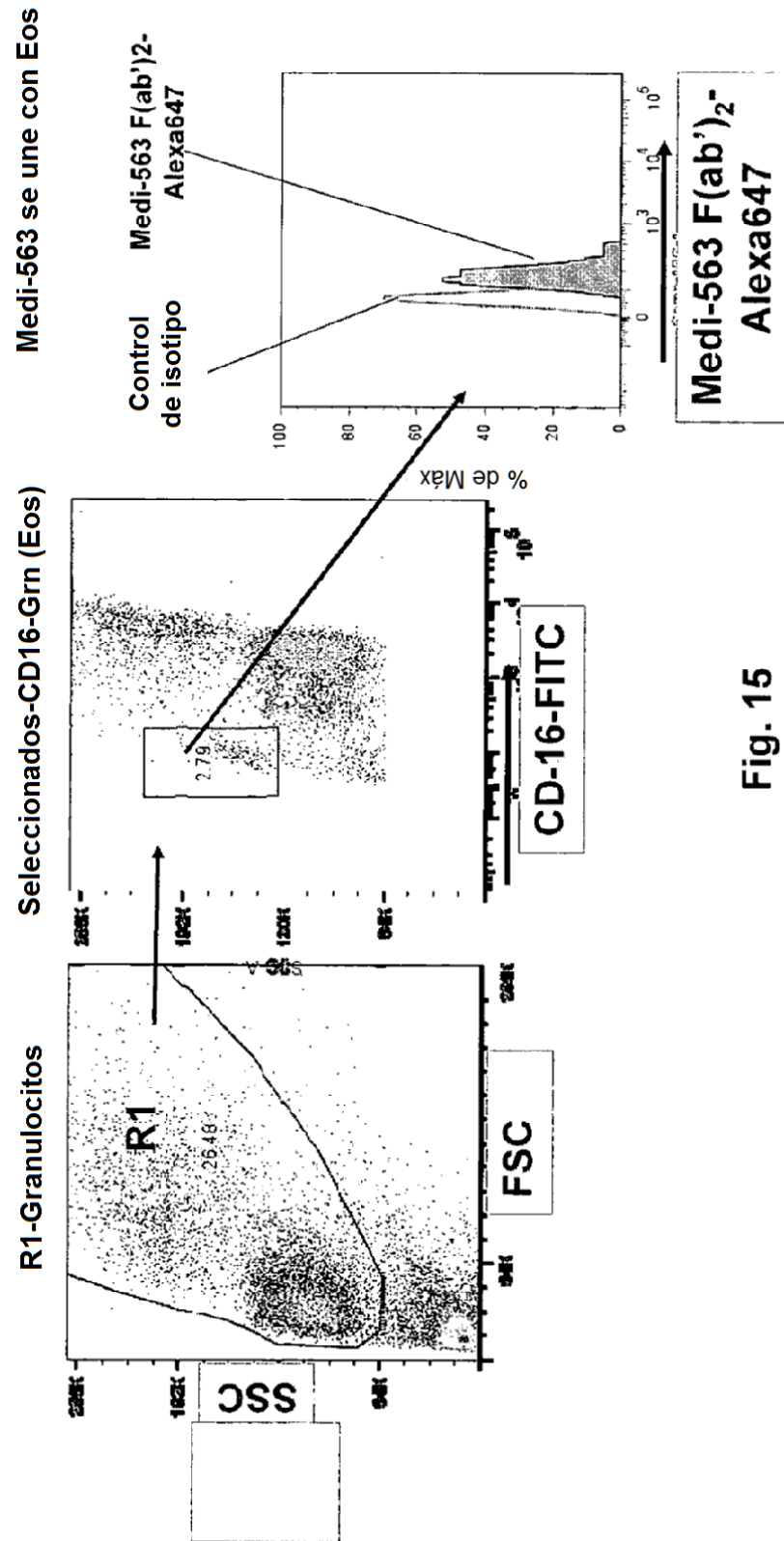


Fig. 15

Análisis de FACS de leucocitos de ratones transgénicos para IL-5

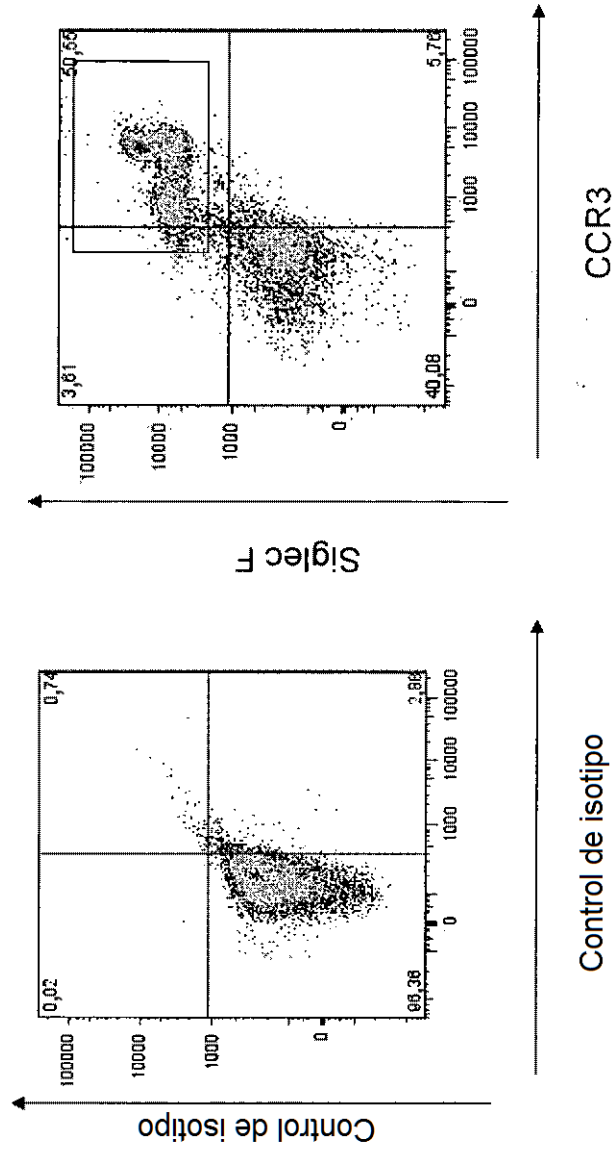


Fig. 16A

Análisis de FACS de leucocitos de ratones transgénicos para IL-5

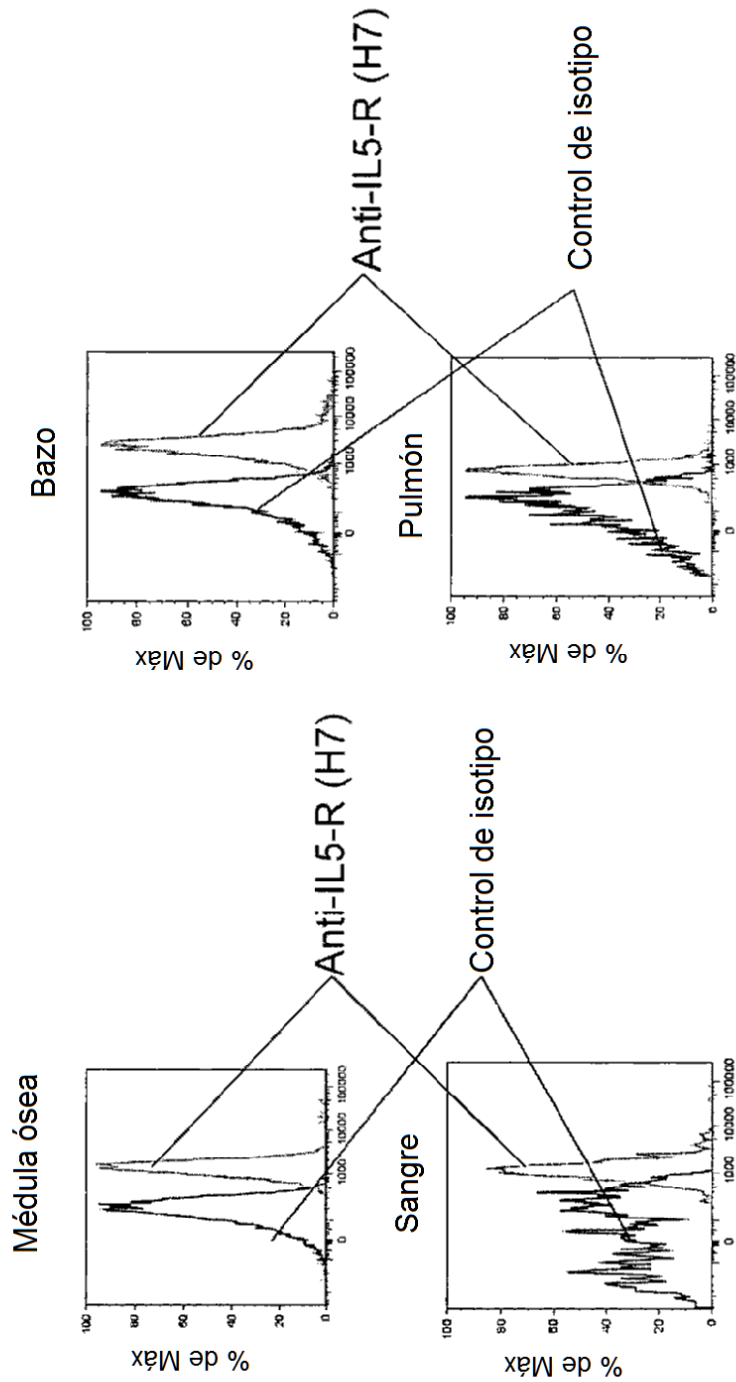


Fig. 16B

Medi-563 agota células mononucleares positivas para IL-5Ra de médula ósea

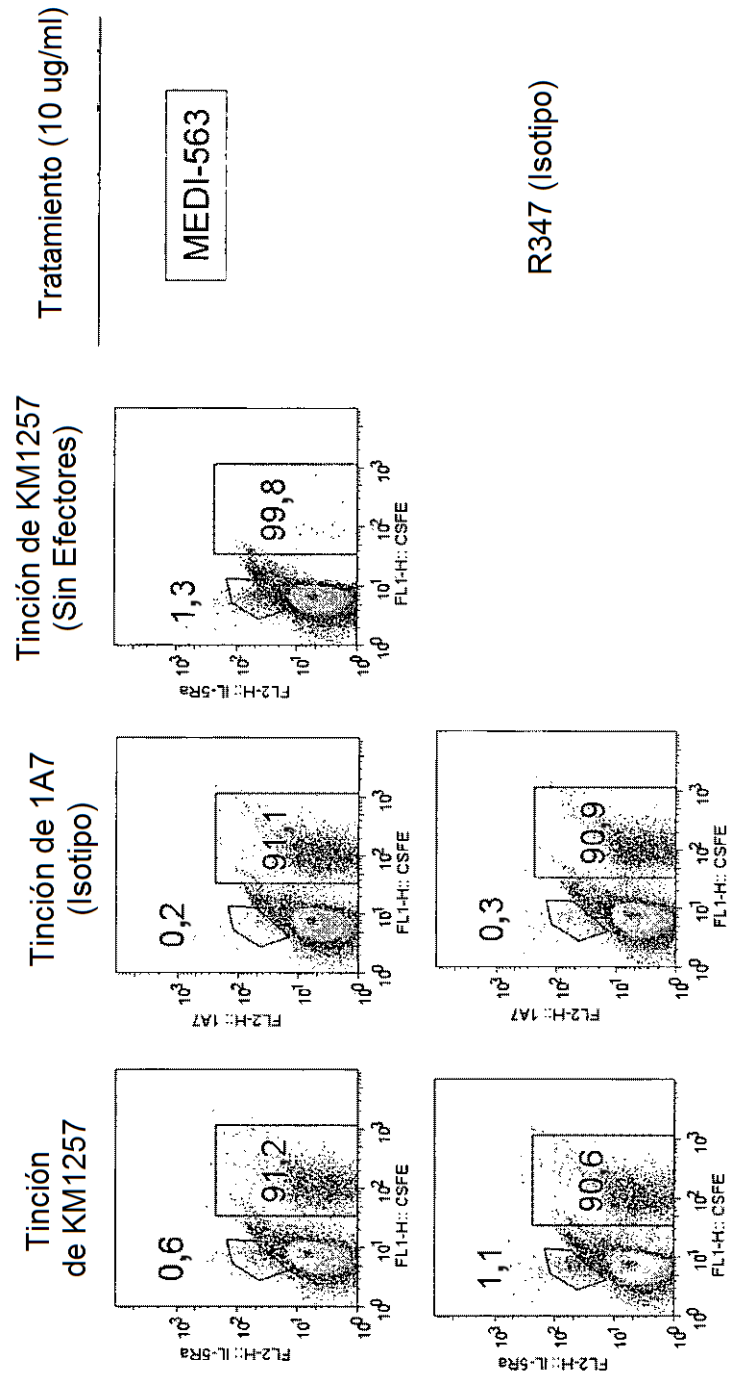
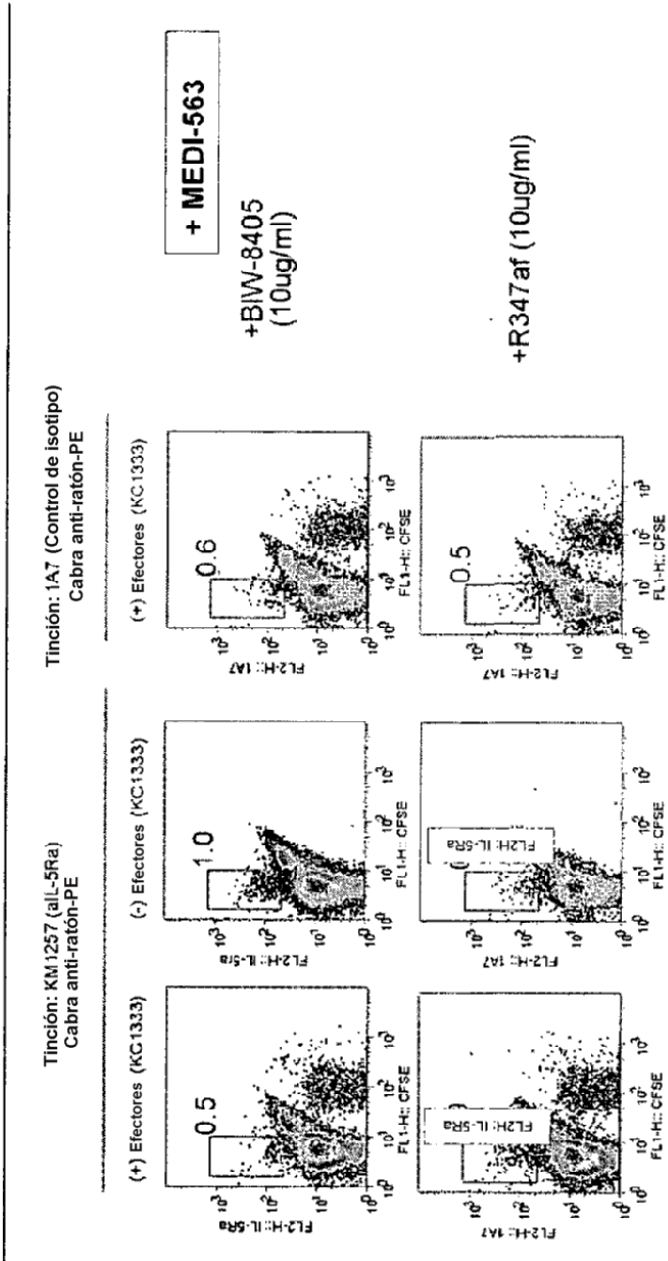


Fig. 17A

Medi-563 agota células mononucleares positivas para IL-5Ra de médula ósea

Ensayo de BM MNC ADCC n.º 2
(MEDI-563)



50.000 KC1333 marcadas con CFSE
100.000 dianas BM MNC

Fig. 17B

MEDI 563 agota eosinófilos de sangre periférica

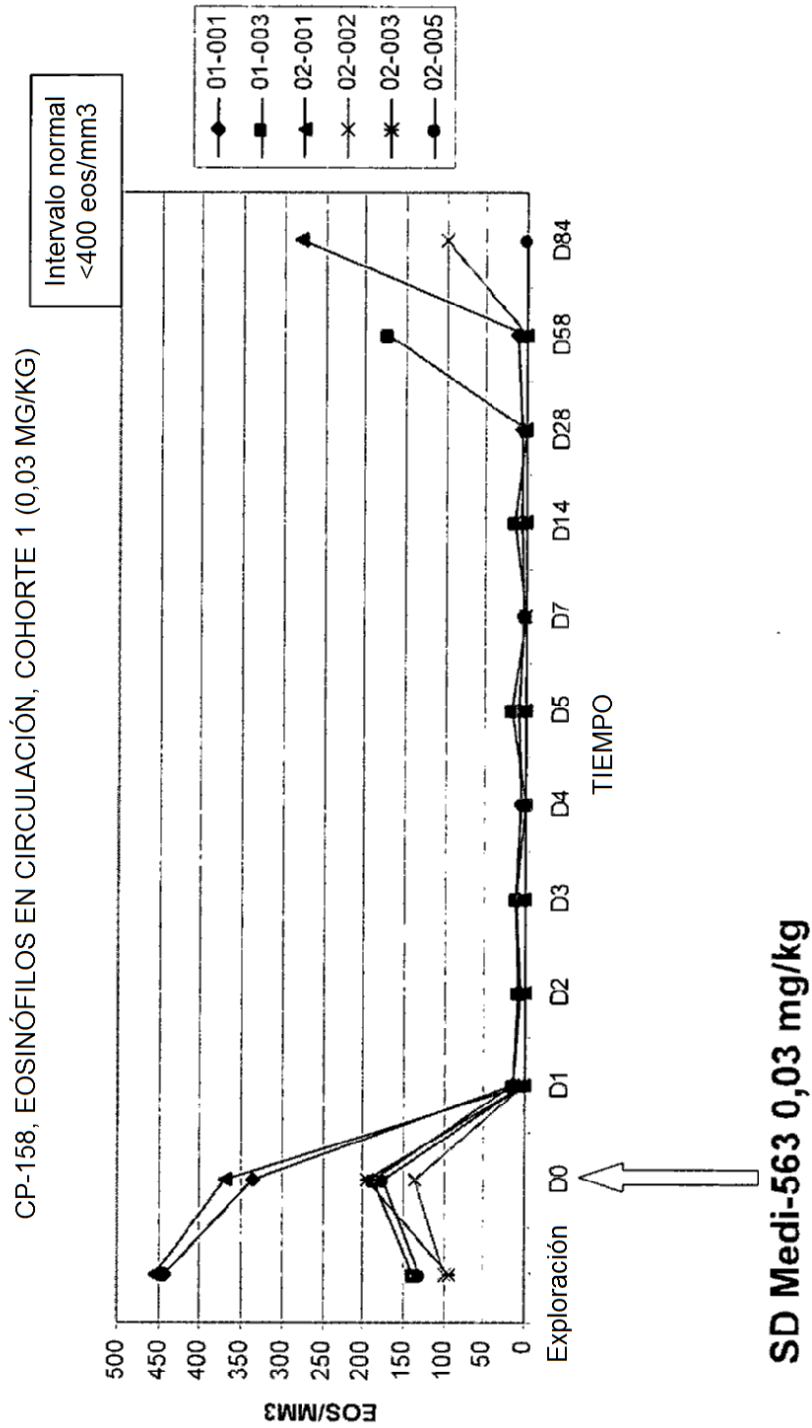
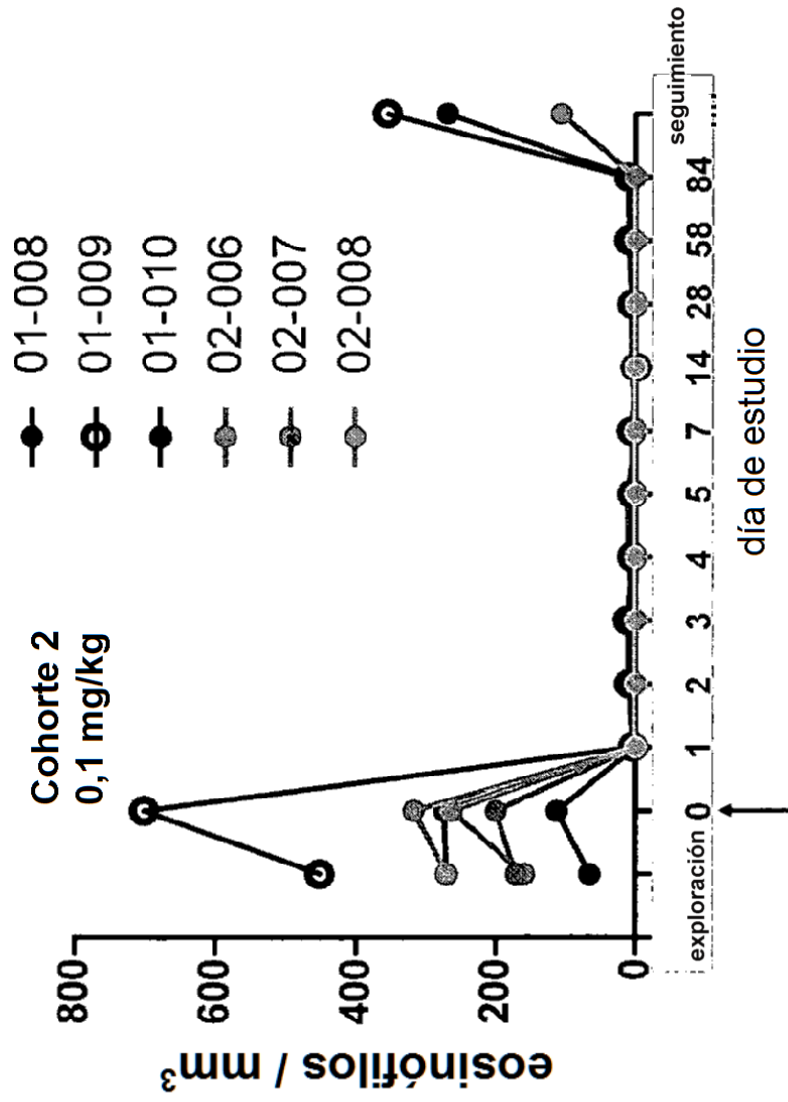


Fig. 18A

MEDI 563 agota eosinófilos de sangre periférica



MEDI 563 se une con eosinófilos en pulmón humano normal

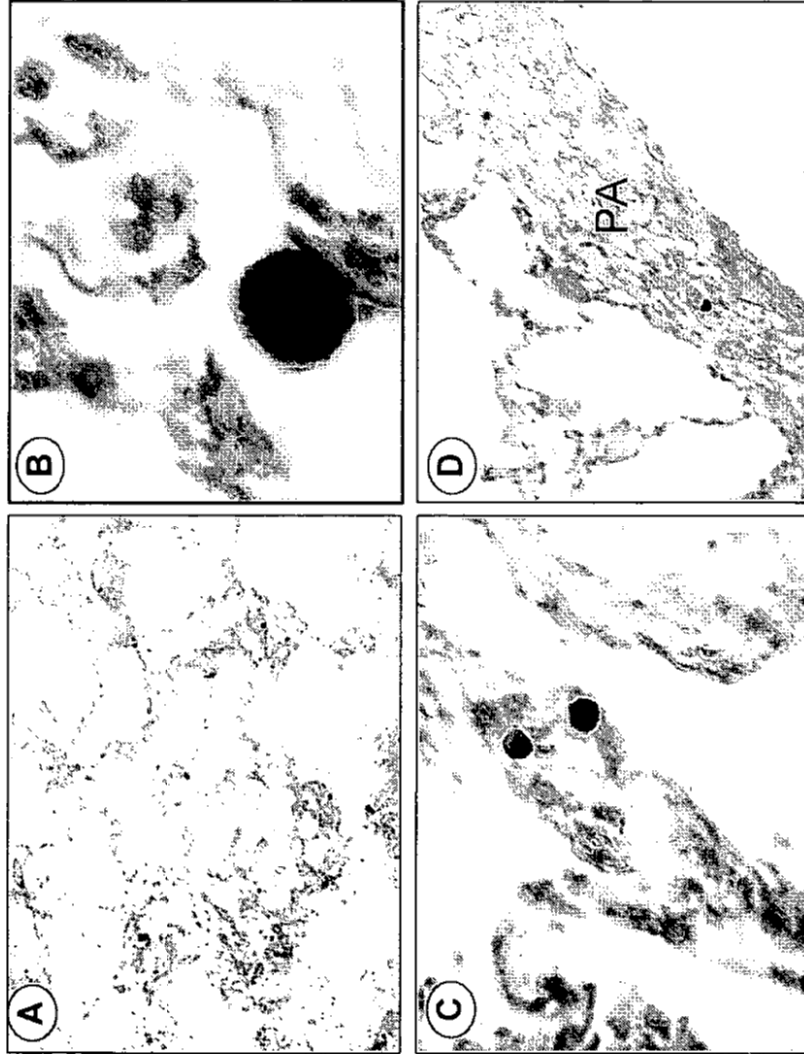


Fig. 19

MEDI 563 tiñe todos los eosinófilos en biopsias de pulmón asmático

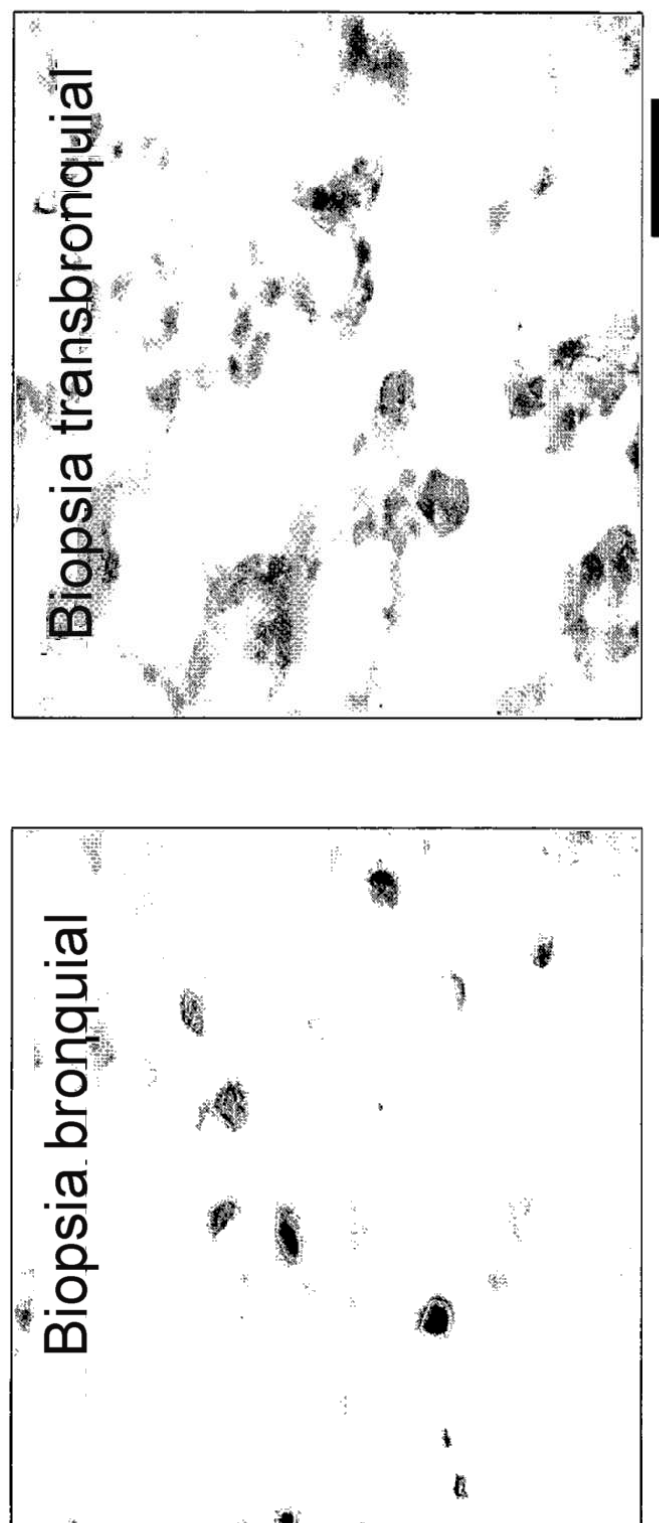


Fig. 20

Expresión de IL-5Ra en células 1° purificadas de donantes sanos

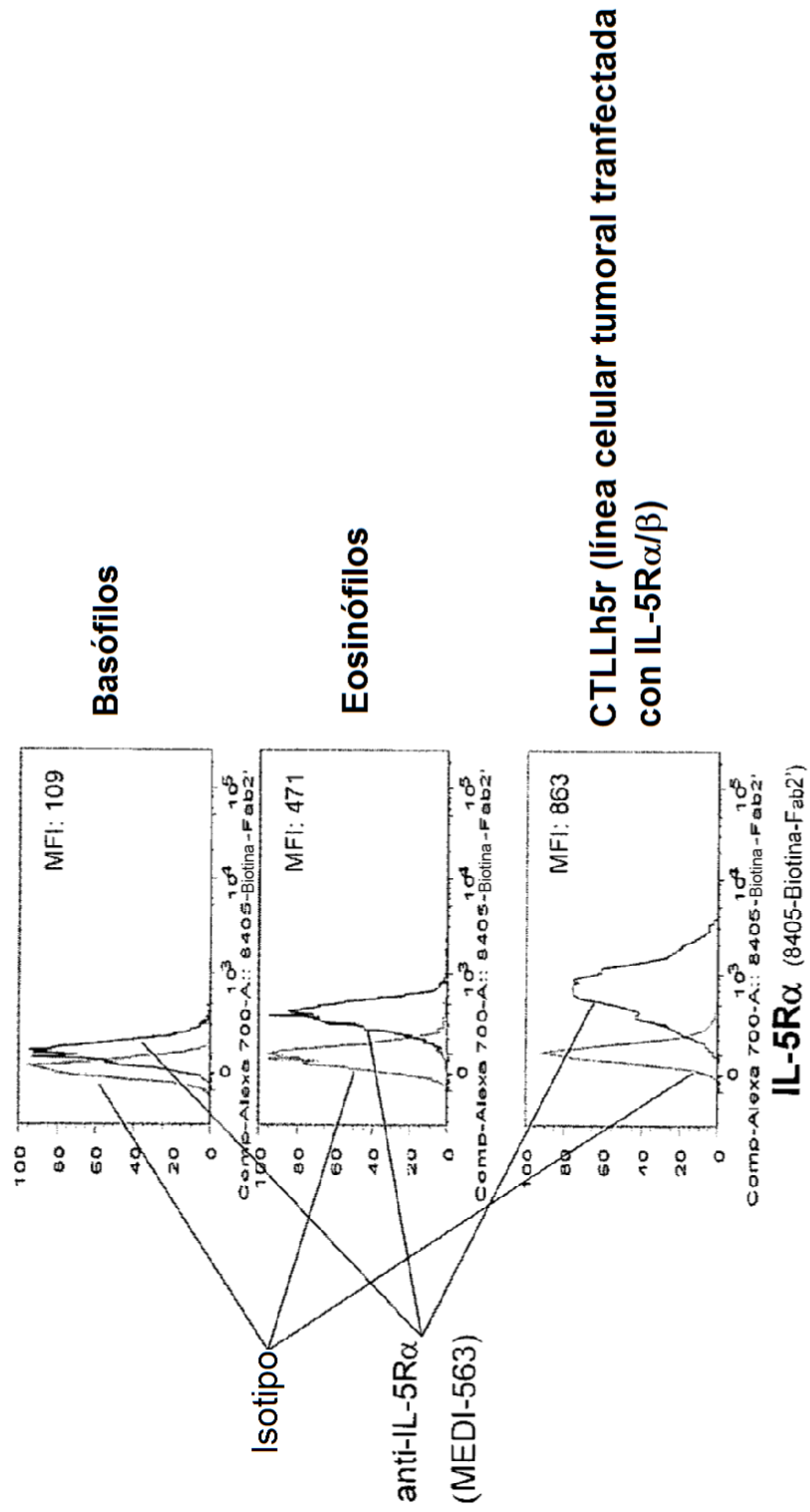


Fig. 21

Eosinófilos y linfocitos NK 1° autólogos:
MEDI-563 afucosilado frente a fucosilado

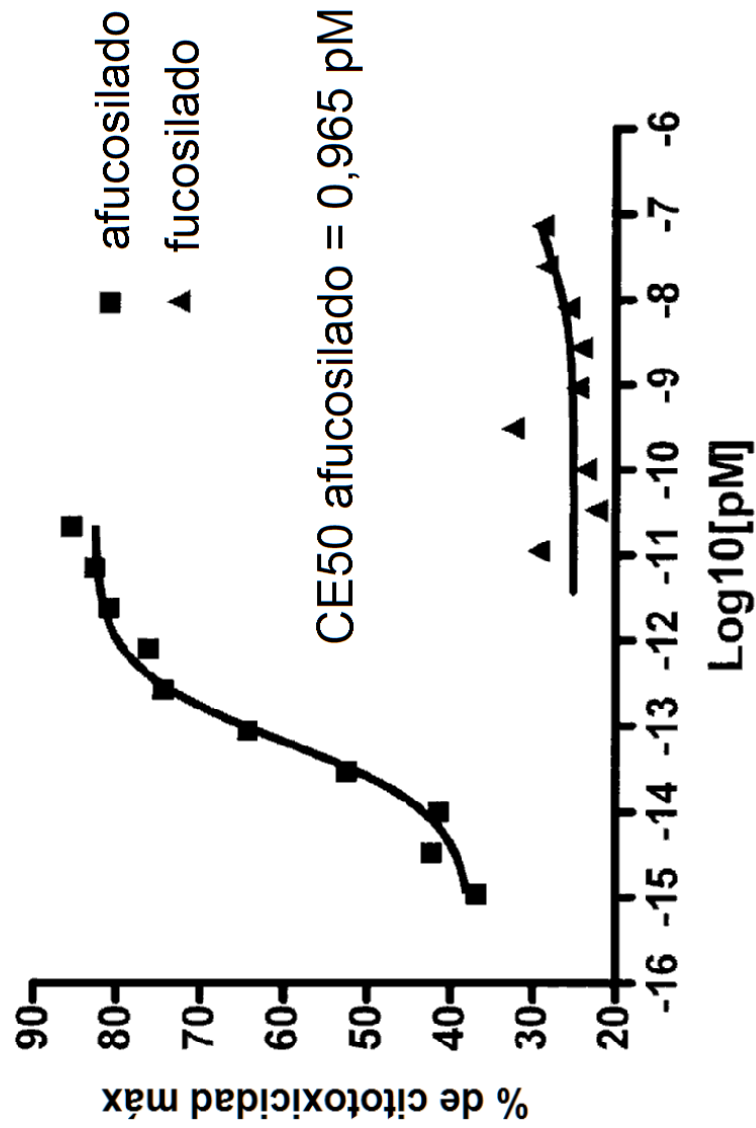


Fig. 22

Basófilos y linfocitos NK 1º autólogos: MEDI-563 afucosilado

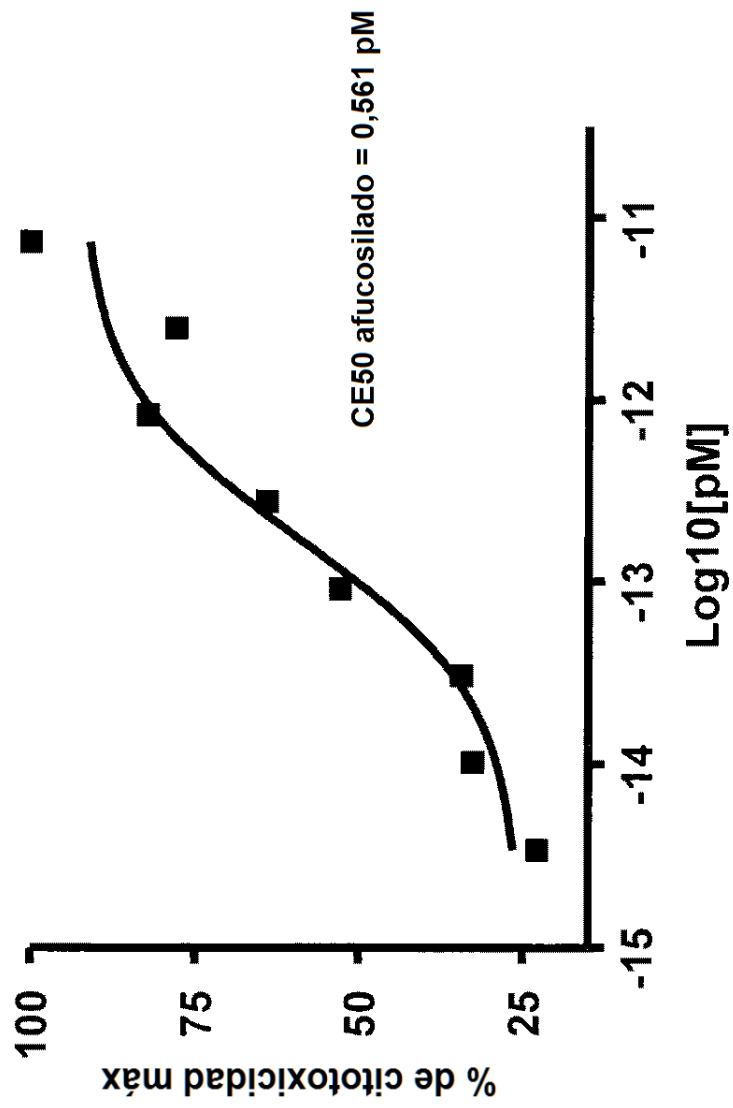


Fig. 23

Los eosinófilos no liberan gránulos citotóxicos en ADCC mediado por Medi-563

EDN (neurotoxina derivada de eosinófilos) en sobrenadantes de ensayo de ADCC con eosinófilos de donante 435 y efectores de NK o PBMC

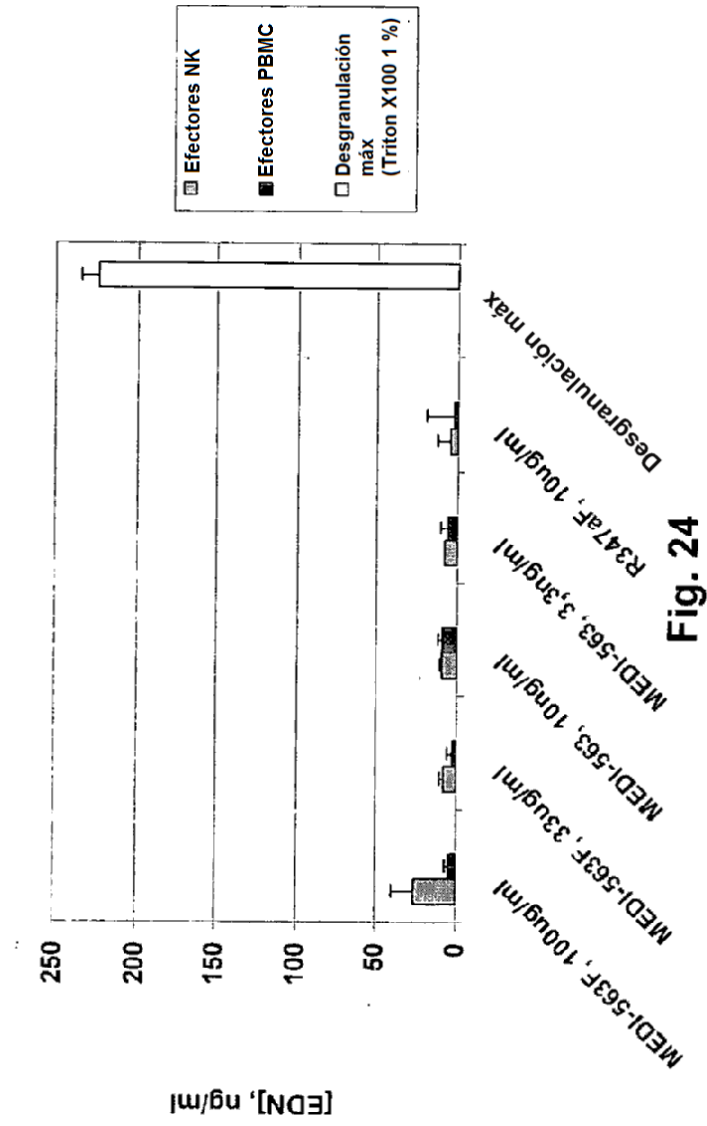


Fig. 24

Modificación técnica de mutantes de intercambio para localizar el epítipo de unión a MEDI-563

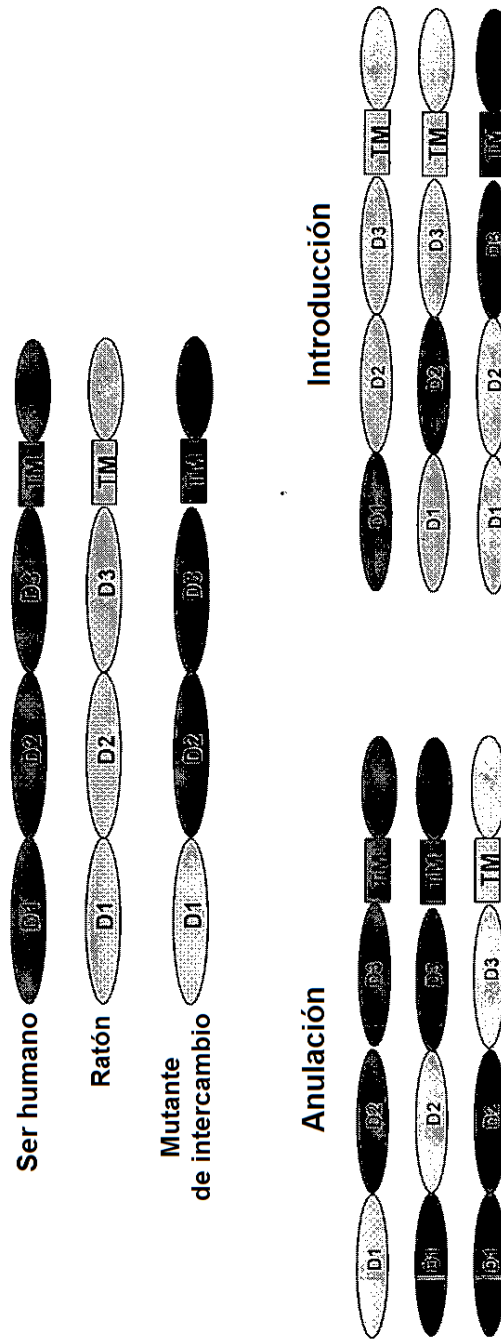


Fig. 25A

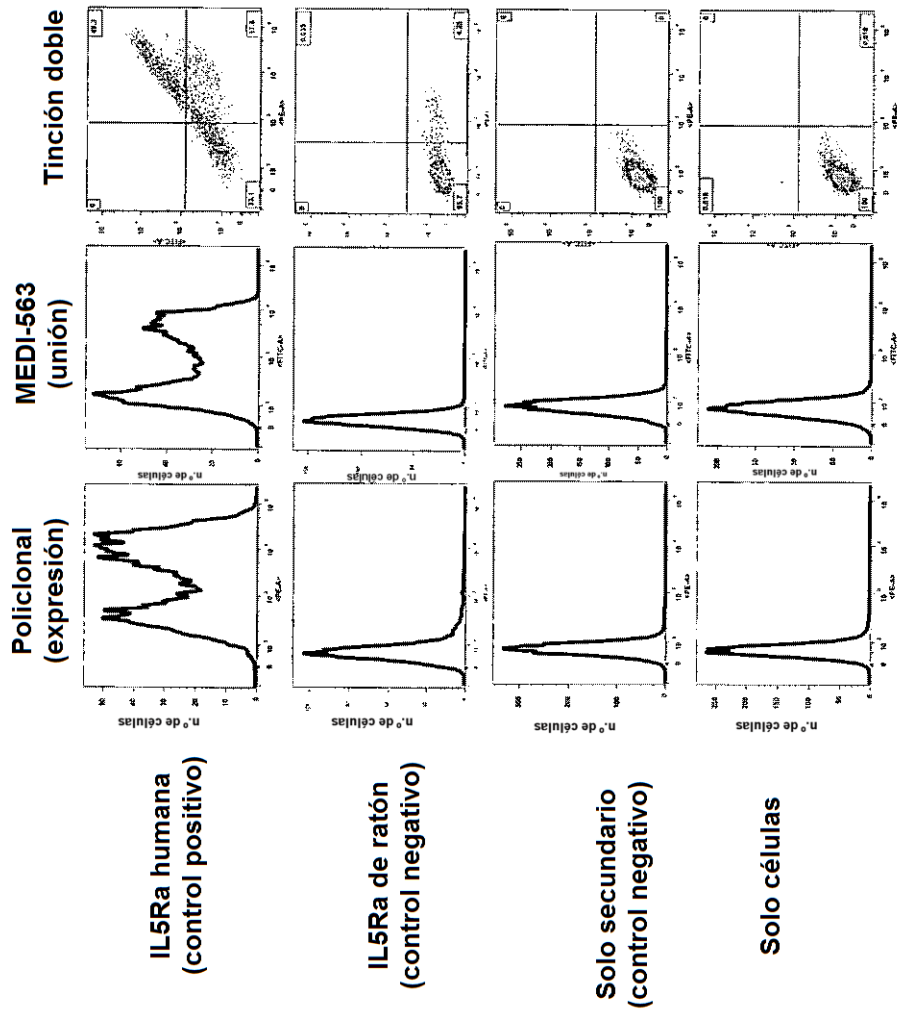


Fig. 25B

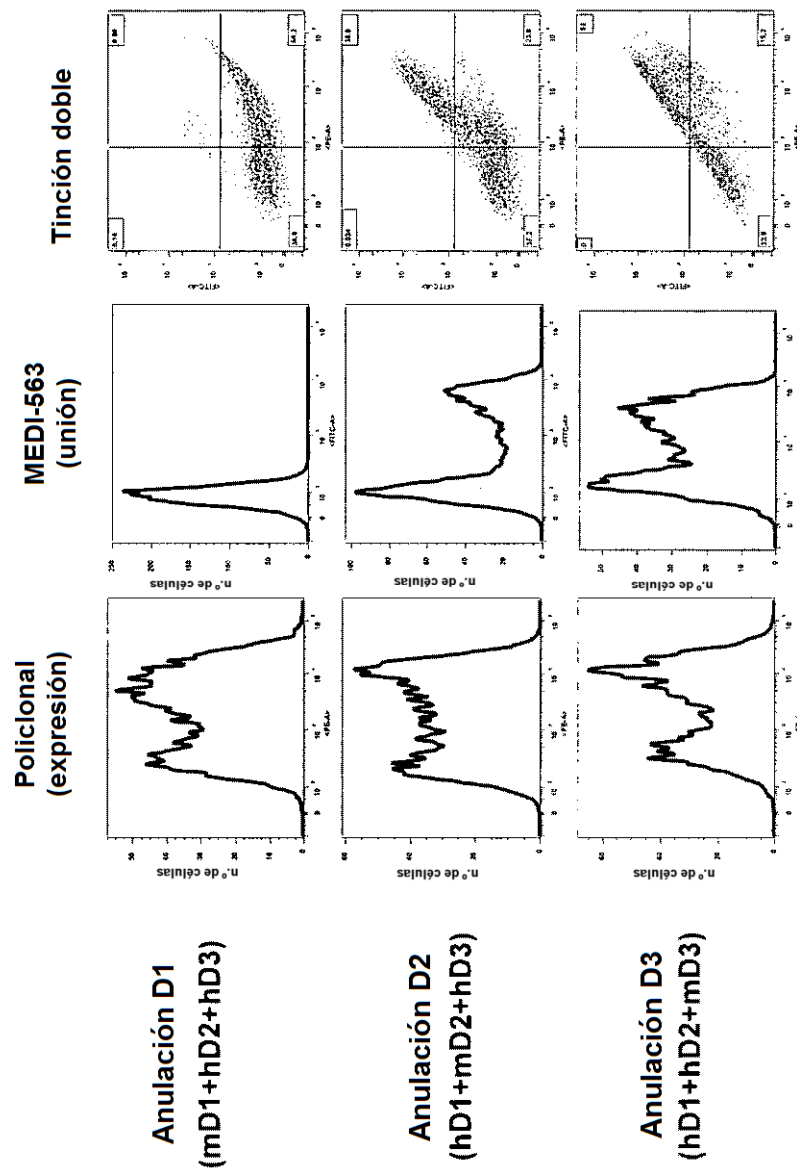


Fig. 25C

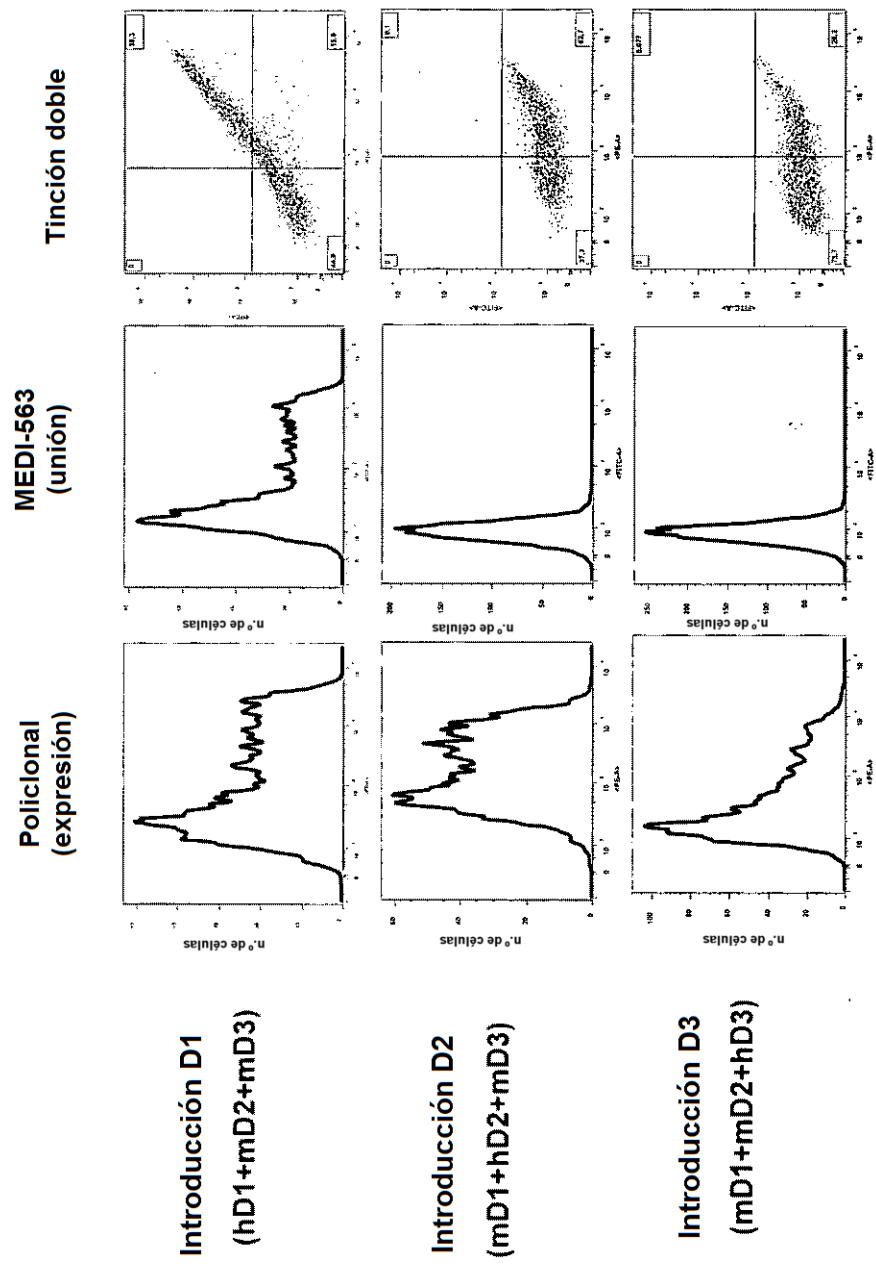


Fig. 25D

	Segmento A	Segmento B	
Humano 1	DLLPDEKISLLPPVNF ^T IKVTGLAQVLLQWK	PNPDQEQRRNVNLEYQVKINAPKEDDDYETR	
Ratón 1	DLL +K LLPPVNF ^T IK TGLAQVLL W PNPDQEQR+V+LEY VKINAP+ED+Y+TR		
	DLLNHHKKFLLPPVNF ^T IKATGLAOVLLHWDPNPDQEQRRHVDLEYHVVKINAPQEDEYDTR		
	Segmento C		
Humano 61	IT ⁺ ESKCVTLHKGFSA ^S VR ^T ILQNDHSL ^L LASSWASAE ^L HAPP	102	
Ratón 61	TESKCVT LH+GF+ASVR ^T IL++ H+ LASSW SAE ^L APP		
	KTESKCVTPLHEGFAASVR ^T ILKSSHT ^T LASSWVSAE ^L KAPP	102	

Comparación del dominio 1 de IL5R α entre ser humano y ratón: 75 % (identidad)

Fig. 26A

Mutantes de anulaci3n – Sustituir restos humanos (*hu*) en el segmento A, B, C con hom3logos de rat3n

$\left\{ \begin{array}{lll} \textbf{muA} & \textit{huB} & \textit{huC} \\ \textit{huA} & \textbf{muB} & \textit{huC} \\ \textit{huA} & \textit{huB} & \textbf{muC} \end{array} \right\}$

Mutantes de introducci3n - Sustituir restos murinos (*mu*) en el segmento A, B, C con hom3logos de rat3n

$\left\{ \begin{array}{lll} \textit{huA} & \textbf{muB} & \textbf{muC} \\ \textbf{muA} & \textit{huB} & \textbf{muC} \\ \textbf{muA} & \textbf{muB} & \textit{huC} \end{array} \right\}$

Fig. 26B

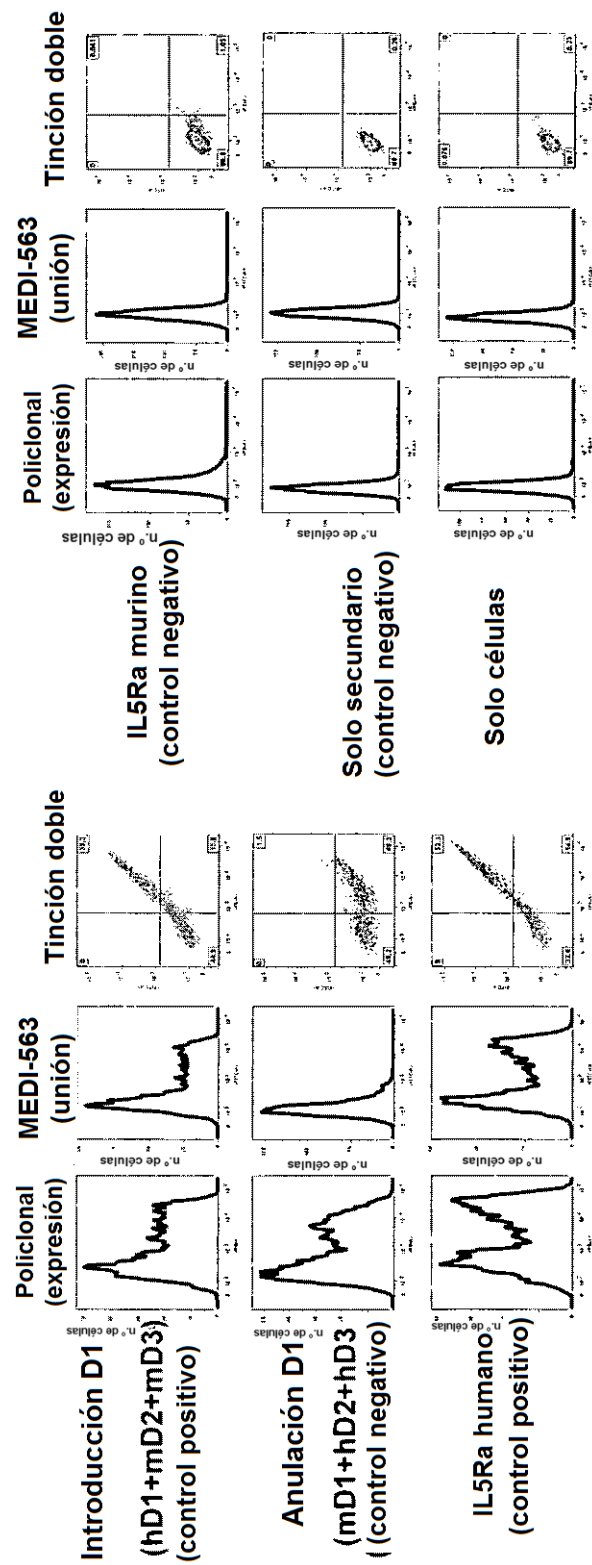


Fig. 26C

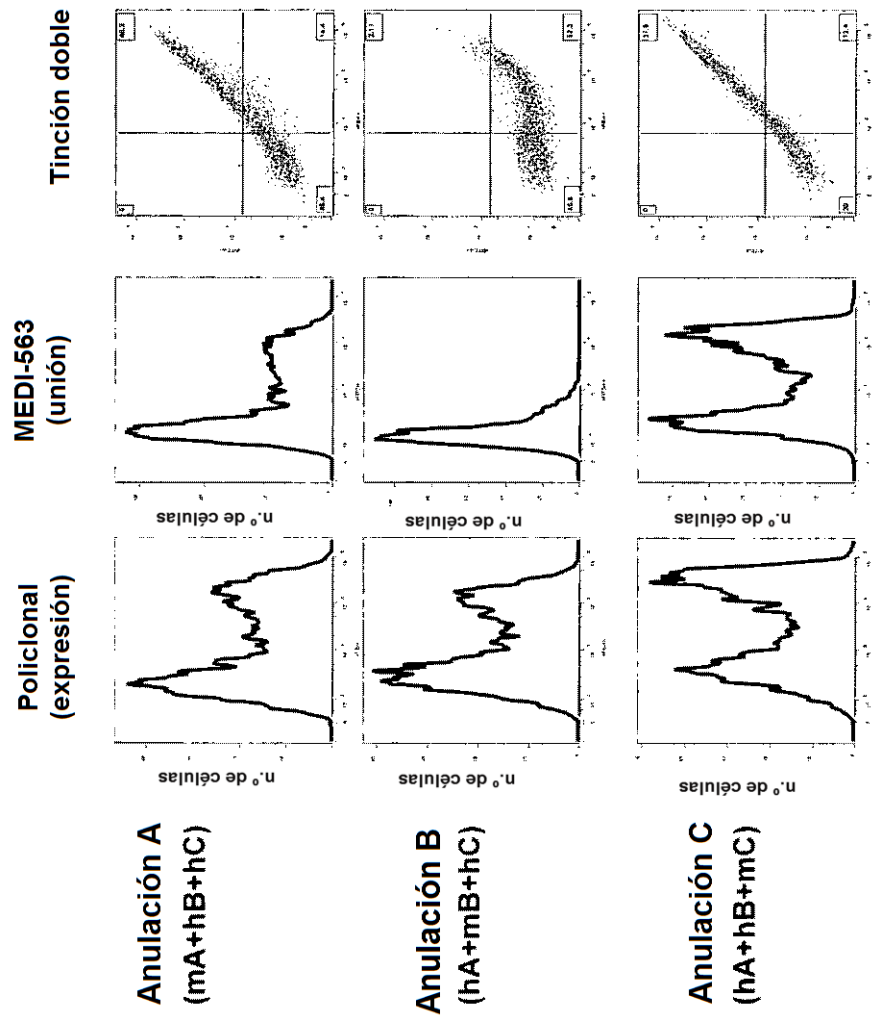


Fig. 26D

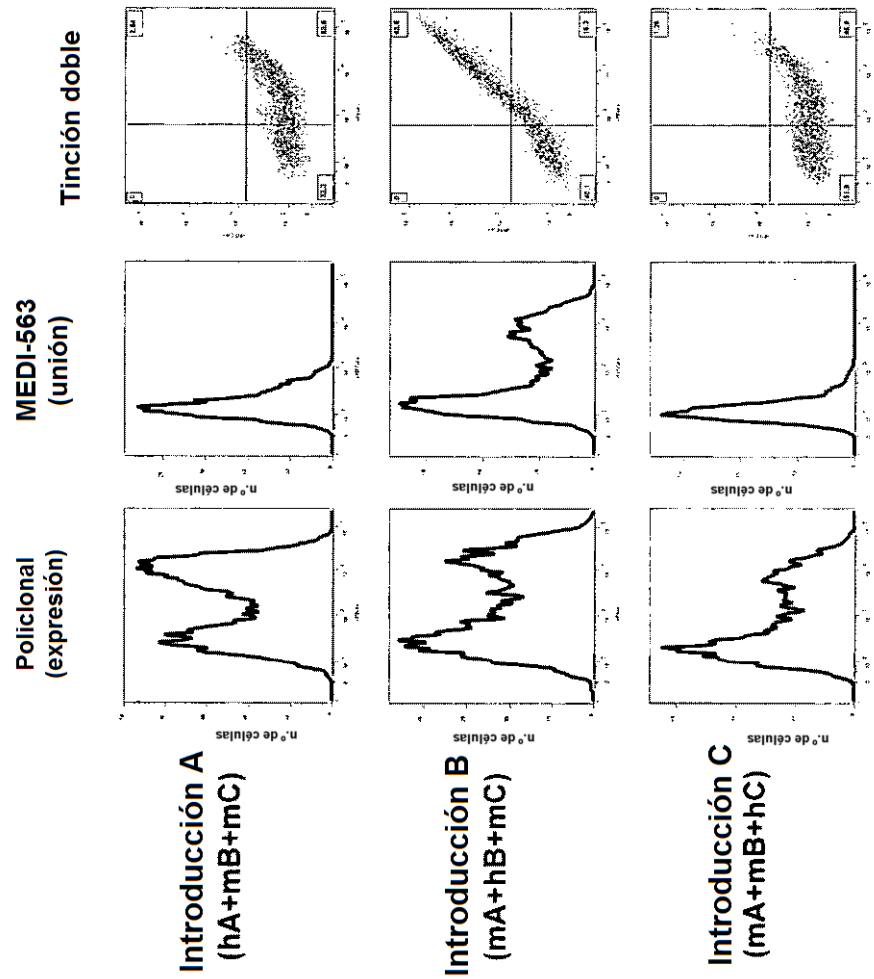
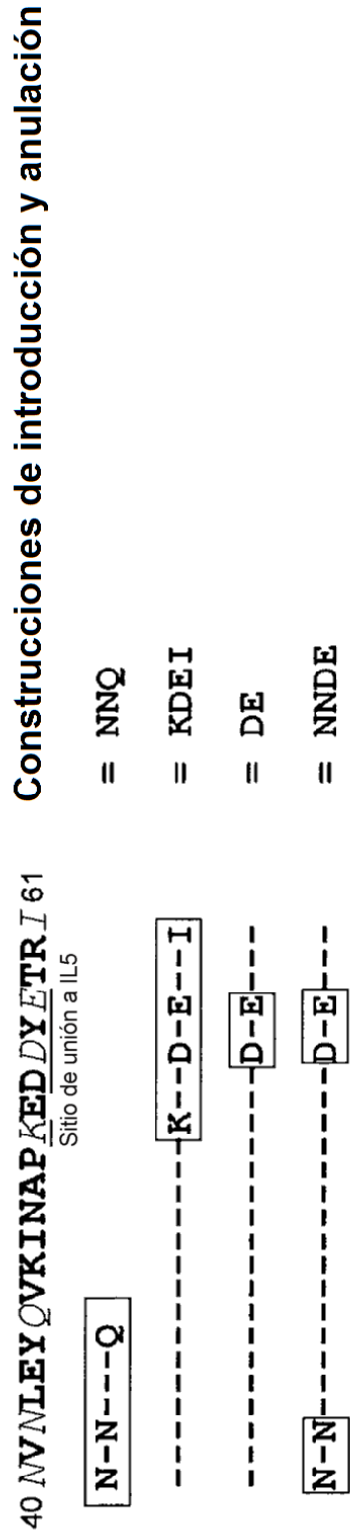
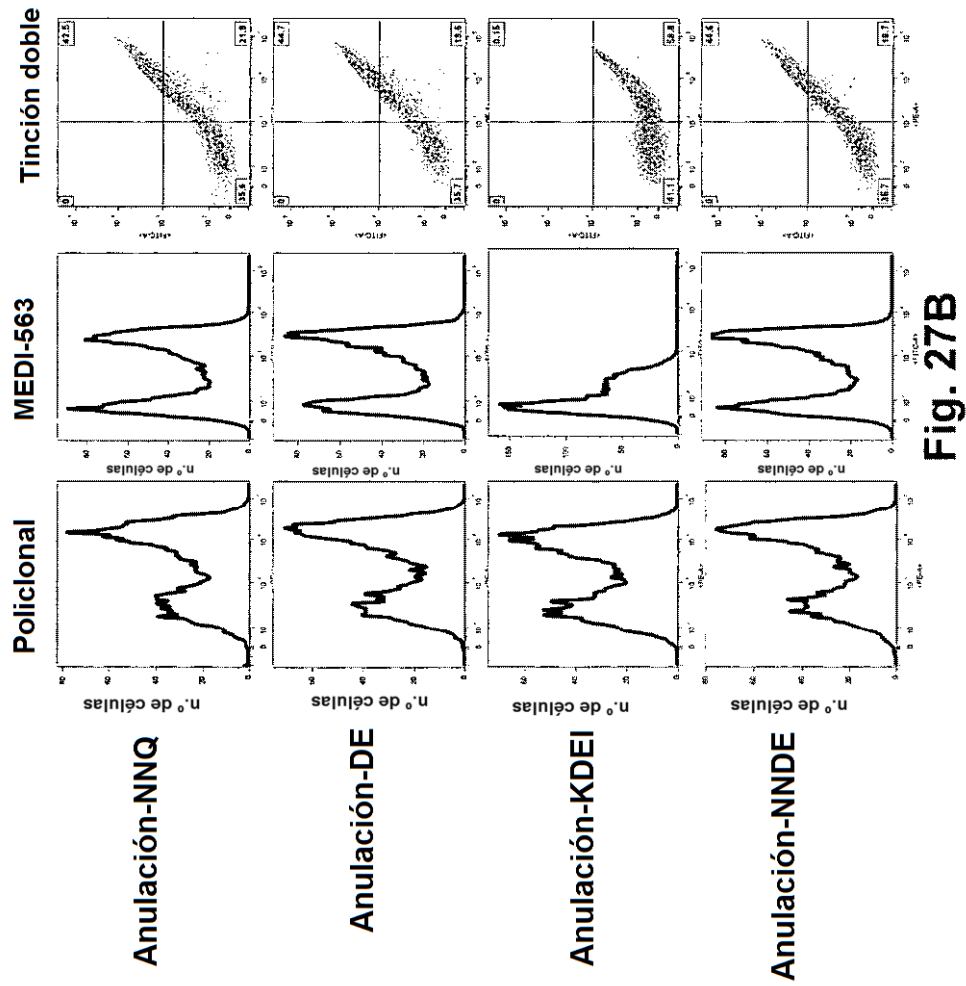


Fig. 26E





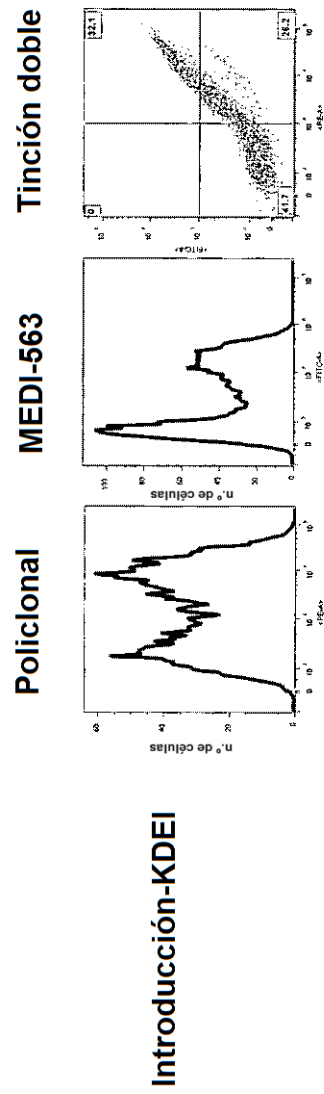


Fig. 27C

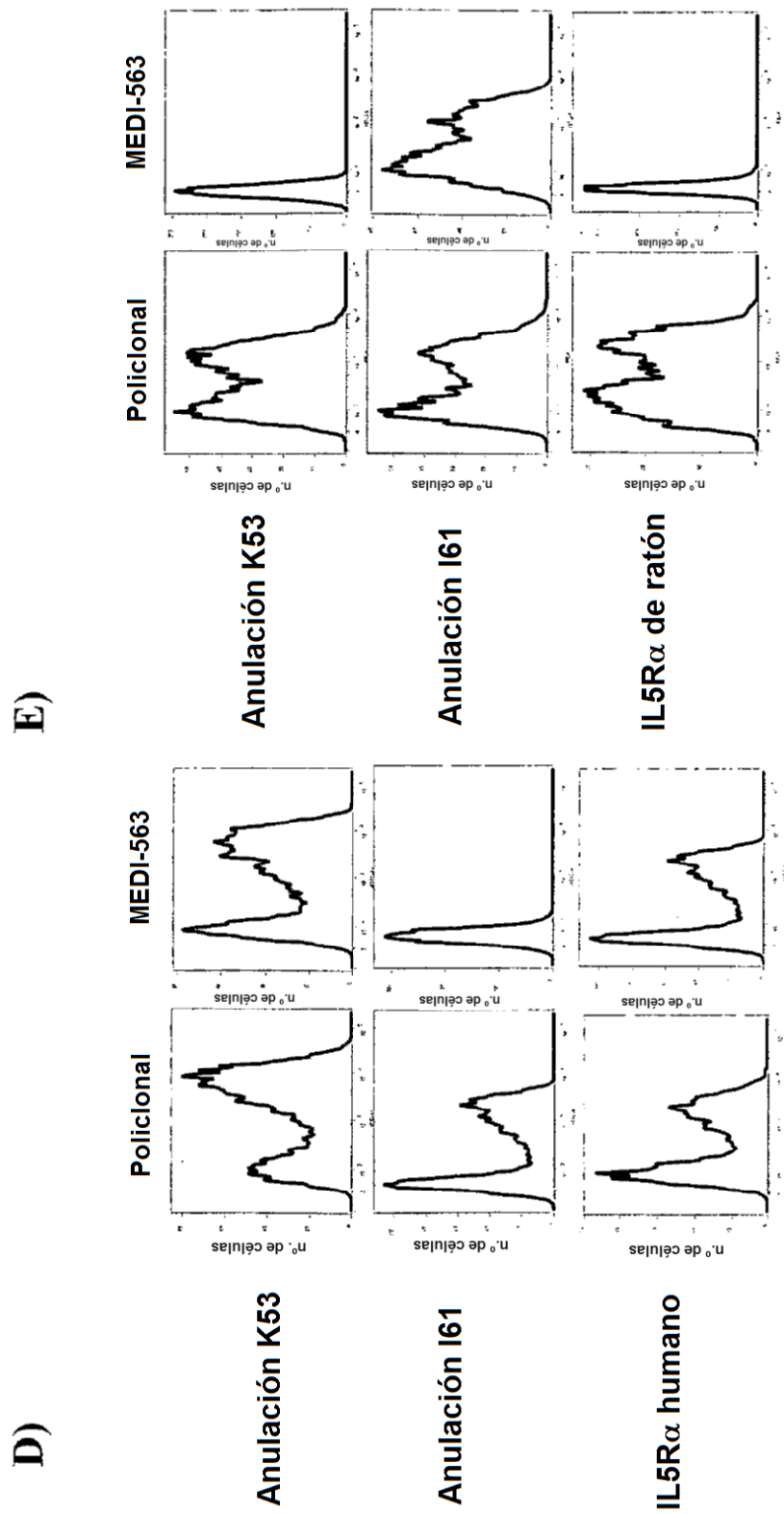


Fig. 27DE

	muFcγRIV	muFcγRIII	muFcγRIIb	muFcγRI
Hu IgG₁	253	3660	1240	280
Hu IgG₁ afuc	43	3960	1260	397

Fig. 28

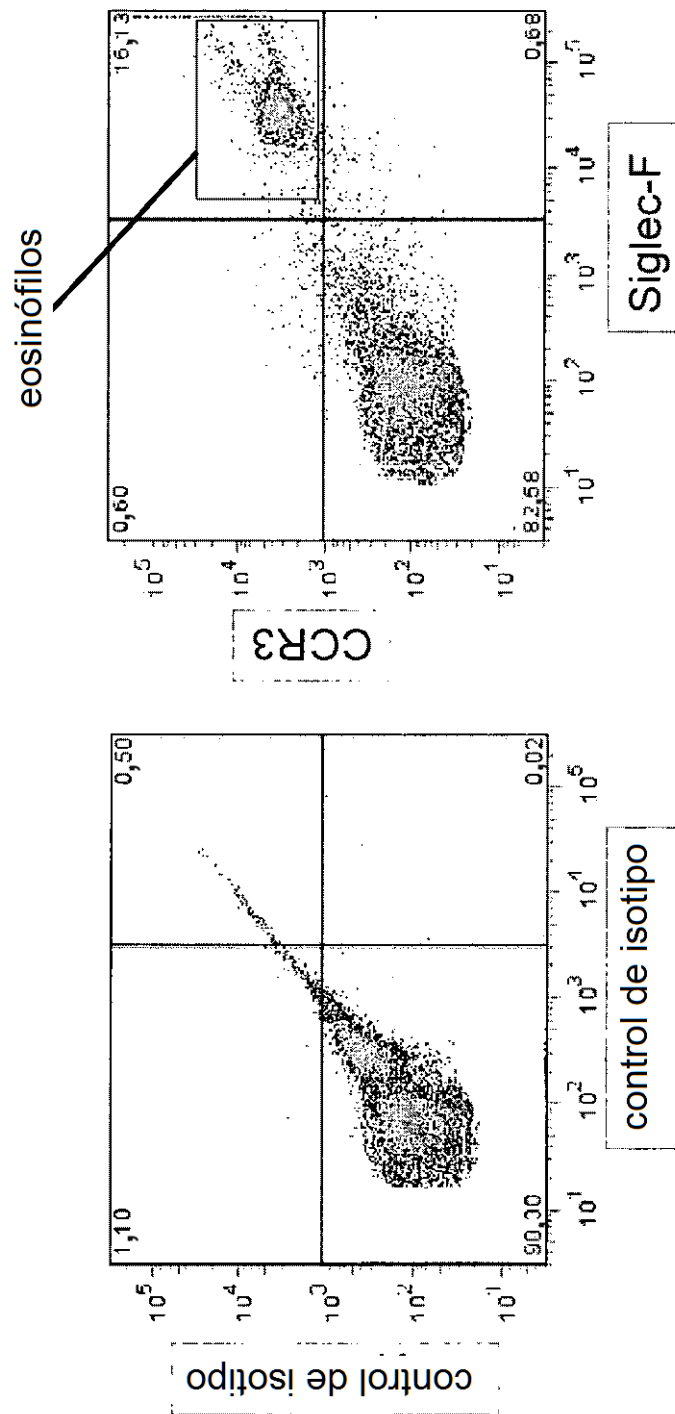


Fig. 29A

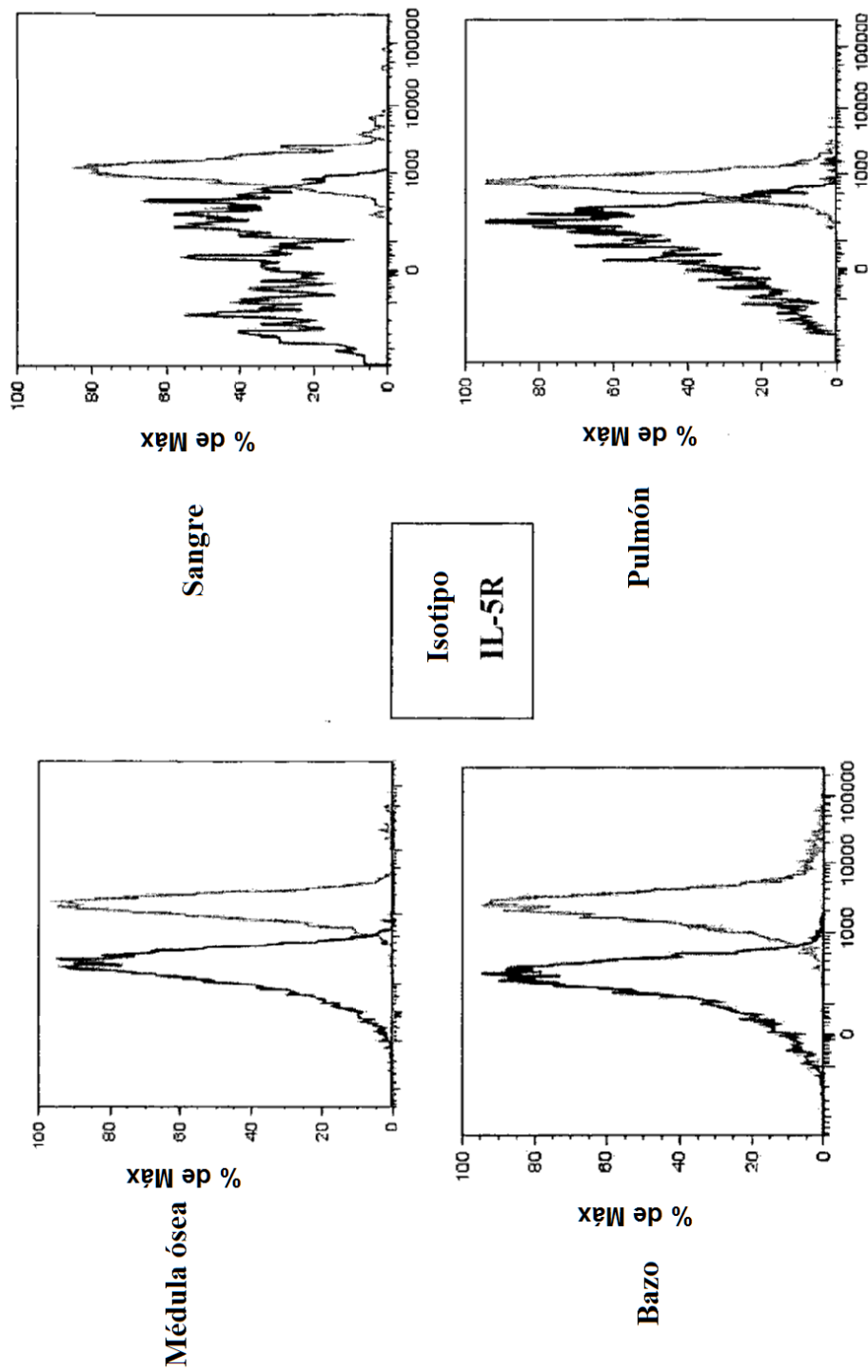


Fig. 29B

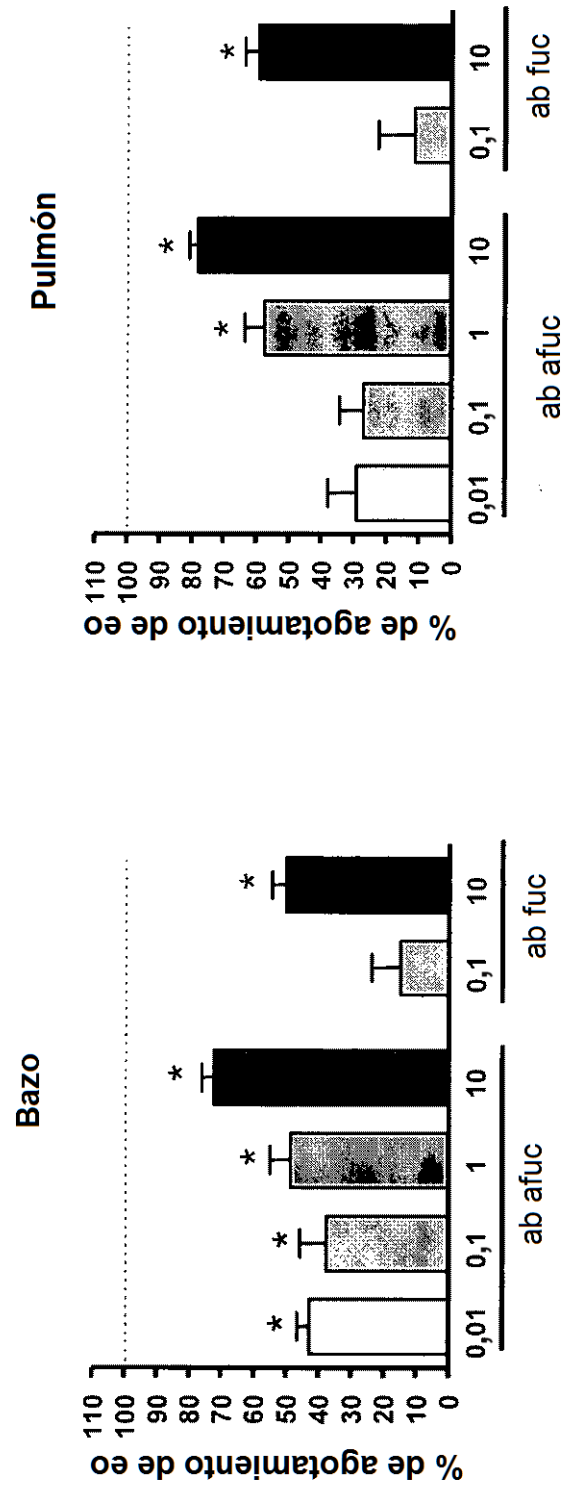


Fig. 30A

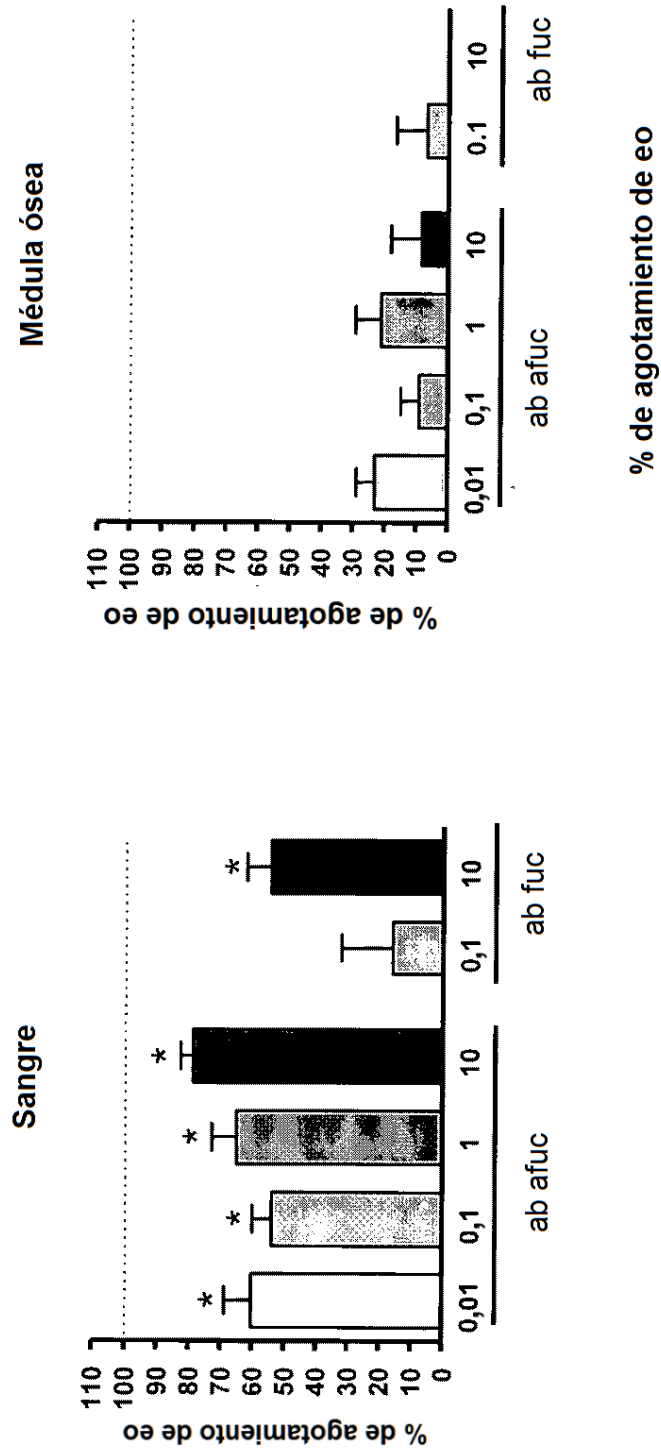


Fig. 30B

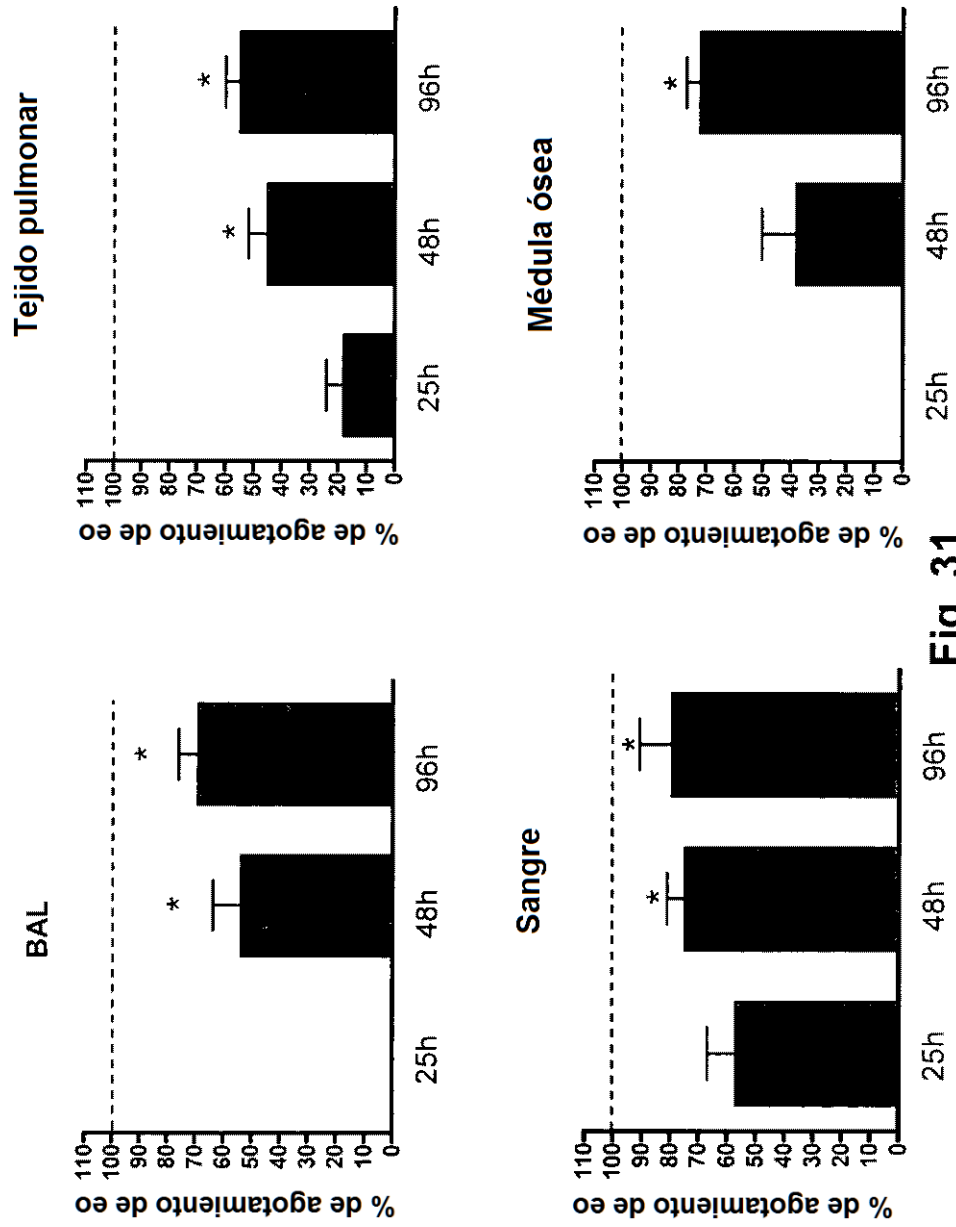


Fig. 31