

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 775 204**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**C07K 16/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2004** **E 14164624 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.02.2020** **EP 2805728**

54 Título: **Nuevos anticuerpos anti IL13 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**23.12.2003 US 532130 P**

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

**24.07.2020**

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)**  
**1 DNA Way**  
**South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**FUNG, SEK CHUNG MICHAEL;**  
**MOYLE, MATTHEW;**  
**LU, MASON;**  
**YAN, CHANGNING;**  
**SINGH, SANJAYA y**  
**HUANG, DAN**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 775 204 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

Nuevos anticuerpos anti IL13 y usos de los mismos

## Antecedentes de la invención

5 La interleucina (IL)-13 es una citocina pleiotrópica de la subclase 2 de linfocitos T auxiliares (Th2). Al igual que la IL4, la IL13 pertenece a la familia de citocinas de tipo I que comparten la estructura terciaria definida por un núcleo de haz hidrófobo 4 $\alpha$  helicoidal. La IL13 tiene un porcentaje de homología de secuencia de aminoácidos de aproximadamente 30 % con la IL4 y comparte muchas de las propiedades de la IL4 (Wynn, Ann. Rev. Immunol., 21: 425 (2003)). La similitud funcional de la IL4 y de la IL13, se atribuye al hecho de que la IL13 puede unirse a la cadena alfa del receptor de IL4 (IL4R- $\alpha$ ) después de su unión con la cadena alfa 1 del receptor de IL13 (IL13R $\alpha$ 1) (Hershey, J. Allergy Clin. Immunol., 111: 677 (2003)). La cadena alfa del receptor de IL4R (IL4R $\alpha$ ) se activa mediante la IL4 y la IL13, dando como resultado la fosforilación de STAT6 (*Signal transducer and activator of transcription 6*, transductor de señales y activador de la transcripción 6) dependiente de Jak1. Tanto la IL4 como la IL13 promueven la proliferación de linfocitos B e inducen el cambio de clase a IgG4 e IgE en combinación con la coestimulación de CD40/CD40L (Punnonen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 90:3730 (1993), Oettgen et al., J. Allergy Clin. Immunol., 107:429 (2001)).

15 Sin embargo, a diferencia de la IL4, la IL13 no participa en la diferenciación de linfocitos T vírgenes (indiferenciados) en linfocitos Th2 (Zurawski et al. Immunol. Today, 15: 19 (1994)). La IL13 regula al alza Fc $\epsilon$ RI y, por tanto, ayuda sensibilizando la IgE de mastocitos (de Vries, Allergy Clin. Immunol. 102: 165 (1998)). En monocitos/macrófagos, la IL13 regula al alza la expresión de antígenos CD23 y MHC de clase I y clase II, regula a la baja la expresión de Fc $\gamma$  y CD14, e inhibe la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (de Waal Malefyt et al., J. Immunol., 151: 6370(1993), Chomarat et al., Int Rev. Immunol., 17: 1 (1998)). A diferencia de la IL4, la IL13 promueve la supervivencia, la activación y el reclutamiento de eosinófilos (Horie et al., Intern. Med., 36: 179(1997), Luttmann et al, J. Immunol. 157:1678 (1996), Pope et al, J. Allergy Clin. Immunol, 108:594 (2001)). La IL13 también manifiesta funciones importantes en células no hematopoyéticas, tales como células del músculo liso, células epiteliales, células endoteliales y células de fibroblastos. La IL13 mejora la proliferación y las contracciones inducidas por colinérgicos de los músculos lisos (Wills-Karp, J. Allergy Clin. Immunol., 107: 9 (2001)). En las células epiteliales, la IL13 es un potente inductor de la producción de quimiocinas (Li et al, J. Immunol., 162: 2477 (1999), altera la diferenciación mucociliar (Laoukili et al., J. Clin. Invest., 108: 1817 (2001), disminuye la frecuencia del latido ciliar de las células epiteliales ciliadas (Laoukili et al., J. Clin. Invest., 108: 1817 (2001), y da como resultado la metaplasia de células calciformes (Zhu et al, J. Clin. Invest., 103: 779(1999), Grunig et al, Science, 282: 2261 (1998)). En las células endoteliales, la IL13 es un potente inductor de la molécula 1 de adhesión celular vascular (VCAM-1) que es importante para el reclutamiento de eosinófilos (Bochner et al., J. Immunol, 154: 799 (1995)). En human dermal fibroblasts IL13 induces type 1 collagen synthesis in human dermal fibroblasts (Roux et al, J. Invest. Dermatol., 103:444 (1994)).

35 Aunque la IL13 y la IL4 comparten determinadas similitudes funcionales, los estudios en modelos animales de ratones con enfermedad y con genes inactivados, demostraron que la IL13 posee funciones efectoras únicas, distintas de las de la IL4 y proporcionaron pruebas convincentes de que la IL13, independiente de otras citocinas Th2, es necesaria y suficiente para inducir todas las características del asma alérgico (Wills-Karp et al. Science, 282: 2258(1998), Waiter et al. J. Immunol. 167: 4668 (2001)). La IL13 puede desempeñar un papel más significativo que otras citocinas Th2 en las funciones efectoras asociadas a los síntomas de asma (Corry, Curr. Opin. Immunol., 11: 610 (1999)). Esta afirmación está respaldada en la enfermedad humana por una fuerte asociación entre los niveles de IL13 y los polimorfismos genéticos en el gen de IL13 y enfermedad correlacionada (Wills-Karp, et al. Respir. Res. 1:19 (2000); Vercelli et al., Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol., 2: 389 (2002); He et al., Genes Immunol., 4: 385(2003), Arima et al., J. Allergy Clin. Immunol., 109: 980(2003), Liu et al., J. Clin. Allergy Immunol., 112: 382 (2003)). Los datos que aparecen sugieren que la IL13 induce características de la respuesta alérgica a través de sus acciones sobre las células del epitelio de la mucosa y del músculo liso, en lugar de a través de las rutas tradicionales en las que participan acontecimientos mediados IgE y eosinófilos (Wills-Karp et al., Sci., 282: 2258 (1998)).

50 El asma se describe como una enfermedad pulmonar crónica que implica inflamación, hiperreactividad y obstrucción de las vías respiratorias. Fisiológicamente, la hiperreactividad de las vías respiratorias está documentada por la disminución del flujo de aire bronquial después de broncoprovocación con metacolina o histamina. Otros factores desencadenantes que provocan la obstrucción de las vías respiratorias incluyen aire frío, ejercicio, infección respiratoria de las vías altas por virus, humo de cigarrillo y alérgenos respiratorios. La provocación bronquial con alérgenos induce una disminución inmediata mediada por la inmunoglobulina E (IgE) en fase temprana en el flujo de aire bronquial seguido en muchos pacientes de una reacción mediada por IgE en fase mortal con una disminución en el flujo de aire bronquial durante 4-8 horas. La respuesta temprana se produce por la liberación repentina de sustancias inflamatorias, tales como histamina, PGD<sub>2</sub>, leucotrieno, triptasa y factor activador de plaquetas (FAP), mientras que la respuesta tardía se produce por citocinas proinflamatorias sintetizadas de nuevo (p. ej., TNF $\alpha$ , IL4, IL13) y quimiocinas (p. ej., MCP-1 y MIP-1 $\alpha$ ) (Busse et al. En: Allergy: Principles and Practice, Ed. Middleton, 1173 (1998)). En pacientes asmáticos crónicos, los síntomas pulmonares persistentes están mediados por la respuesta intensificada de linfocitos Th2. Se cree que las citocinas Th2 juegan un papel vital en la enfermedad (Larche et al., J. Allergy Clin. Immunol., 111: 450 (2003)), en particular, la IL13 y la IL4 producidas por linfocitos Th2 con fenotipo NK (NKT) en las vías respiratorias como se indica en un modelo de asma en roedores (Akbari et al., Nature Med., 9: 582 (2003)). La patología macroscópica de las vías respiratorias asmáticas muestra hiperinflado pulmonar, hipertrofia del músculo liso,

engrosamiento de la lámina reticular, edema de la mucosa, desprendimiento de células epiteliales, alteración de células ciliadas e hipersecreción de la glándula mucosa. Microscópicamente, el asma se caracteriza por la presencia de un mayor número de eosinófilos, neutrófilos, linfocitos y células plasmáticas en los tejidos bronquiales, secreciones bronquiales y moco. Inicialmente, hay reclutamiento de leucocitos desde la corriente sanguínea a las vías respiratorias por los linfocitos T CD4+ activados. Los linfocitos T activados también dirigen la liberación de mediadores inflamatorios de los eosinófilos, mastocitos y linfocitos. Además, los linfocitos Th2 producen IL4, IL5, IL9 e IL13. La IL4, junto con la IL13, señala el cambio de anticuerpos IgM a IgE.

El entrecruzamiento de las moléculas de IgE unidas a la membrana por el alérgeno hace que los mastocitos se desgranulen, liberando histamina, leucotrienos y otros mediadores que perpetúan la inflamación de las vías respiratorias. La IL5 activa el reclutamiento y la activación de eosinófilos. Los mastocitos y los eosinófilos activados también generan sus citocinas que ayudan a perpetuar la inflamación. Estos ciclos repetidos de inflamación en los pulmones con lesiones en los tejidos pulmonares seguidos de reparación pueden producir cambios estructurales prolongados ("remodelación") de las vías respiratorias.

Actualmente el asma moderada se trata con un corticoesteroide antiinflamatorio o un inhibidor de mastocitos inhalado diariamente, tal como cromolin o nedocromil sódico más un agonista de beta2 inhalado según sea necesario (3-4 veces al día) para aliviar síntomas intercurrentes o asma inducido por alérgenos o ejercicio. El cromolín y el nedocromil sódico bloquean el broncoespasmo y la inflamación, pero generalmente son solo eficaces para el asma que se asocia a alérgenos o a ejercicio y normalmente, solo para asmáticos infantiles. Los corticosteroides inhalados mejoran la inflamación, la hiperreactividad y la obstrucción de las vías respiratorias, y reducen el número de crisis agudas. Sin embargo, se necesitan al menos un mes antes de que los efectos sean aparentes y hasta un año para que se produzca una mejora notable. Los efectos secundarios más frecuentes son ronquera e infección fúngica bucal, es decir, candidiasis. Se han comunicado efectos secundarios más graves, p. ej., supresión suprarrenal parcial, inhibición del crecimiento y formación ósea reducida, pero solo con el uso de dosis más altas. La beclometasona, la triamcinolona y la flunisolida probablemente tienen una potencia similar; mientras que la budesonida y la fluticasona son más potentes y, supuestamente, tienen menos efectos secundarios sistémicos.

Incluso los pacientes con enfermedad leve muestran inflamación de las vías respiratorias, incluyendo infiltración de la mucosa y del epitelio con linfocitos T, mastocitos y eosinófilos activados. Los linfocitos T y los mastocitos liberan citocinas que promueven el crecimiento y la maduración de eosinófilos y la producción de anticuerpos de IgE, y estos, a su vez, aumentan la permeabilidad microvascular, interrumpen el epitelio y estimula los reflejos neuronales y las glándulas secretoras de moco. El resultado es la hiperreactividad de las vías respiratorias, broncoconstricción e hipersecreción, manifestado por sibilancias, tos y disnea.

Tradicionalmente, el asma se ha tratado con broncodilatadores orales e inhalados. Estos agentes ayudan a los síntomas del asma, pero no hacen nada por la inflamación subyacente. El reconocimiento durante los 10 últimos años de la importancia de la inflamación en la etiología del asma ha llevado a un mayor uso de corticosteroides, pero muchos pacientes continúan padeciendo asma no controlada.

Debido a la importancia del tratamiento de las enfermedades inflamatorias en seres humanos, particularmente asma, continuamente se buscan nuevos compuestos bioactivos que tengan menos efectos secundarios. El desarrollo de inhibidores potentes y específicos de IL13, que permanecen activos cuando se administran a largo plazo en las vías respiratorias asmáticas, ofrece un enfoque novedoso para el tratamiento del asma, así como en otras enfermedades mediadas por IL13 e IgE. Blease et al. (J. Immunol., 166: 5219 (2001)) desvelan el efecto de una hiperreactividad atenuada de las vías respiratorias resultante de la inmunoneutralización de IL-13 por anticuerpos policlonales anti IL-13 murina en un modelo murino crónico de asma fúngica experimental.

En el documento WO 03/086451 se desvelan los efectos de un anticuerpo monoclonal neutralizante de rata anti IL-13 de ratón sobre las respuestas de asma agudas inducidas por OVA en ratones.

#### **Compendio de la invención**

La presente invención se refiere a los siguientes puntos:

1. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antagonista anti IL13 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a IL13 humana y un vehículo fisiológicamente aceptable, en donde dicho anticuerpo anti IL13 humano comprende una región de cadena pesada variable que comprende las regiones determinantes de complementariedad CDRH1, CDRH2 y CDRH3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO:123 y SEQ ID NO:135, respectivamente, y una región de cadena ligera variable que comprende las regiones determinantes de complementariedad CDRL1, CDRL2 y CDRL3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO:104 y SEQ ID NO:115, respectivamente, y en donde dicho anticuerpo anti IL13 humano, o fragmento funcional del mismo, está formulado para administrarse por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea u oral.
2. La composición farmacéutica del punto 1, en donde dicho anticuerpo anti IL13 humano es un anticuerpo humanizado.

3. La composición farmacéutica del punto 1 o 2, en donde dicho anticuerpo anti IL13 humano comprende una región de cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la fórmula: FRH1-CDRH1-FRH2-CDRH2-FRH3-CDRH3-FRH4, en donde FRH1 consiste en SEQ ID NO: 65; CDRH1 consiste en SEQ ID NO: 117; FRH2 consiste en SEQ ID NO: 68; CDRH2 consiste en SEQ ID NO: 123; FRH3 consiste en SEQ ID NO: 80; CDRH3 consiste en SEQ ID NO: 135; y FRH4 consiste en SEQ ID NO: 92 y una región de cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la fórmula: FRL1-CDRL1-FRL2-CDRL2-FRL3-CDRL3-FRL4, en donde FRL1 consiste en SEQ ID NO: 21; CDRL1 consiste en SEQ ID NO: 99; FRL2 consiste en SEQ ID NO: 29; CDRL2 consiste en SEQ ID NO: 104; FRL3 consiste en SEQ ID NO: 31; CDRL3 consiste en SEQ ID NO: 115; y FRL4 consiste en SEQ ID NO: 58.
4. La composición farmacéutica de uno cualquiera de los puntos 1 a 3, en donde dicho anticuerpo anti IL13 humano comprende una región de cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 142 y una región de cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 143.
5. La composición farmacéutica de uno cualquiera de los puntos 1 a 4, en donde dicho anticuerpo anti IL13 humano, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une específicamente y con alta afinidad a la IL13 humana tanto glucosilada como no glucosilada, no se une a la IL13 de ratón, y neutraliza la actividad de la IL13 humana a una relación molar aproximada de 1:2 (AcM:IL13).
6. La composición farmacéutica de uno cualquiera de los puntos 1 a 5, en donde dicho anticuerpo anti IL13 humano, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une al mismo epítipo que el anticuerpo producido por el hibridoma 228B/C-1 (PTA-5657).
7. La composición farmacéutica de uno cualquiera de los puntos 1 a 6, en donde dicho anticuerpo anti IL13 humano es un anticuerpo monoclonal.
8. La composición farmacéutica de uno cualquiera de los puntos 1 a 7, en donde dicho anticuerpo anti IL13 es un anticuerpo monovalente, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo monocatenario, un fragmento Fab, o un fragmento F(ab').
9. La composición farmacéutica de uno cualquiera de los puntos 1 a 8, en donde dicho anticuerpo anti IL13 humano es un anticuerpo multiespecífico que es un anticuerpo biespecífico.
10. La composición farmacéutica de uno cualquiera de los puntos 1 a 9, para su uso en la prevención de asma bronquial, rinitis alérgica, dermatitis alérgica o anafilaxia.
11. La composición farmacéutica de uno cualquiera de los puntos 1 a 9, para su uso en el tratamiento de asma bronquial, asma alérgica, asma no alérgica, rinitis alérgica, dermatitis atópica, dermatitis alérgica, conjuntivitis alérgica, eccema, urticaria, alergias a los alimentos, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, colitis ulcerosa, infección por VRS (virus respiratorio sincicial), uveítis, esclerodermia u osteoporosis.
12. La composición farmacéutica de uno cualquiera de los puntos 1 a 9, para su uso en el tratamiento de fibrosis pulmonar idiopática o enfermedad pulmonar inflamatoria y fibrótica.

En el presente documento también se desvelan anticuerpos que se unen específicamente, y con alta afinidad, a la IL13 humana tanto glucosilada como no glucosilada; no se une a la IL13 de ratón, y neutraliza la actividad de la IL13 humana a una relación molar aproximada de 1:2 (AcM:IL13). En la presente descripción también se incluyen anticuerpos que comprenden las regiones de unión a antígeno derivadas de las regiones variables de cadena ligera y/o pesada de dichos anticuerpos. Los anticuerpos de la descripción pueden ser monoclonales, y un anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

Son ejemplos de estos anticuerpos 228B/C-1, 228A-4, 227-26 y 227-43. Los hibridomas que producen estos anticuerpos se depositaron el 20 de noviembre de 2003, en la Colección Americana de Cultivos Tipo (*American Type Culture Collection*), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110/-2209, con los números de registro PTA-5657, PTA-5656, PTA-5654 y PTA-5655, respectivamente.

La presente descripción incluye anticuerpos que tienen una secuencia VL al menos 95 % homóloga a la expuesta en SEQ ID NO: 3, y una secuencia VH al menos 95 % homóloga a la expuesta en SEQ ID NO: 4; anticuerpos que tienen una secuencia VL al menos 95 % homóloga a la expuesta en SEQ ID NO: 5, y una secuencia VH al menos 95 % homóloga a la expuesta en SEQ ID NO: 6; y anticuerpos que tienen una secuencia VL al menos 95 % homóloga a la expuesta en SEQ ID NO: 7, y una secuencia VH al menos 95 % homóloga a la expuesta en SEQ ID NO: 8. La presente descripción también incluye una molécula de anticuerpo recombinante, o un fragmento de la misma de unión a IL13, que comprende al menos una cadena pesada de anticuerpo, o un fragmento de la misma de unión a IL13, que comprende CDR no humanas en las posiciones 31-35 (CDR1), 50-65 (CDR2) y 95-102 (CDR3) (numeración de Kabat) de un anticuerpo anti IL13 de ratón, en donde las posiciones 27-30 tienen el aminoácido Gly 26, Phe 27, Ser 28, Leu 29, Asn 30, (SEQ ID NO: 18); y al menos una cadena ligera de anticuerpo, o un fragmento de la misma de unión a IL13, que comprende CDR no humana en las posiciones 24-34 (CDR1), 50-56 (CDR2) y 89-97 (CDR3) de un anticuerpo anti L13 de ratón, y regiones estructurales de un anticuerpo monoclonal humano.

La presente descripción incluye fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno humano de los anticuerpos de la presente invención, que incluyen, aunque sin limitación, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv monocatenarios (scFv, *single-chain Fv*), anticuerpos monocatenarios, Fvs unidos por disulfuro (sdFv). La descripción también incluye anticuerpos de dominio único que comprenden un dominio VL o VH. En la figura 21 se representa un ejemplo de un scFv, que tiene la secuencia de SEQ ID NO 152.

La presente descripción incluye secuencias humanizadas del anticuerpo monoclonal 228B/C-1. Estas moléculas de anticuerpos recombinantes humanizados comprenden una región de cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la fórmula: FRL1-CDRL1-FRL2-CDRL2-FRL3-CDRL3-FRL4, en donde FRL1 consiste en una cualquiera de las SEC ID NO: 20-25; CDRL1 consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO: 99-103; FRL2 consiste en SEQ ID NO: 29; CDRL2 consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO: 104-114; FRL3 consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO: 30-56; CDRL3 consiste en cualquiera de las SEQ ID NO: 115-116; y FRL4 consiste en SEQ ID NO: 57-59; y que comprende una región de cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la fórmula: FRH1-CDRH1-FRH2-CDRH2-FRH3-CDRH3-FRH4, en donde FRH1 consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO: 60-66; CDRH1 consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO: 117-122; FRH2 consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO: 67-75; CDRH2 consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO: 123-134; FRH3 consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO: 76-90; CDRH3 consiste en cualquiera de las SEQ ID NO: 135-141; y FRH4 consiste en SEQ ID NO: 91-92. La región de cadena pesada variable puede comprender además al menos el dominio CH1 de una región constante o los dominios CH1, CH2 y CH3 de una región constante. La región de cadena pesada constante puede comprender un anticuerpo de IgG, en donde el anticuerpo de IgG es un anticuerpo de IgG1, un anticuerpo de IgG2, un anticuerpo de IgG3 o un anticuerpo de IgG4.

La presente descripción también incluye moléculas de anticuerpo recombinante en donde la cadena ligera variable se selecciona de una cualquiera de las SEC ID NO: 3, 5, 7, 93, 95, 97, 142, 144 y 150, y la cadena pesada variable se selecciona de una cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 6, 8, 94, 96, 98, 143, 145, 146, 147, 148 y 149. Un anticuerpo particular comprende la cadena ligera variable que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 142, y una cadena pesada variable que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 143.

La presente descripción incluye las excelentes células de hibridoma que producen los anticuerpos monoclonales 228B/C-1, 228A-4, 227-26 y 227-43. La presente descripción incluye ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos monoclonales 228B/C-1, 228A-4, 227-26 y 227-43, líneas celulares que comprenden un ácido nucleico que codifica estos anticuerpos o cadenas de los mismos, y vectores que comprenden el ácido nucleico que codifica estos anticuerpos o cadenas de los mismos.

La presente descripción también incluye anticuerpos que se unen al mismo epítipo que 228B/C-1. Los polipéptidos ejemplares comprenden toda o una parte de la SEQ ID NO: 1, o sus variantes, o de la SEQ ID NO: 2, en donde el aminoácido 13 se cambia de ácido glutámico a lisina. La descripción también incluye el epítipo reconocido por los anticuerpos de la presente descripción. Los péptidos del epítipo incluyen un péptido que comprende esencialmente o que consiste en ESLINVSG (SEC ID NO: 18) o YCAALESINV (SEC ID NO: 19).

La presente descripción incluye una composición que comprende los anticuerpos de acuerdo con la invención reivindicada en combinación con un vehículo, diluyente, excipiente o estabilizante, farmacéuticamente aceptable.

La presente descripción incluye un método de tratamiento de un sujeto que padece síntomas asmáticos que comprende administrar a un sujeto, por ejemplo, a un sujeto que lo necesite, una cantidad de un anticuerpo de acuerdo con la invención reivindicada eficaz para reducir los síntomas asmáticos, en donde el anticuerpo puede regular a la baja la actividad de IL13 en el paciente, reducir la hiperreactividad bronquial en el paciente y/o reducir la eosinofilia en los pulmones del sujeto. La presente descripción también incluye un método de inhibición de la infección por virus respiratorio sincicial (VRS) que comprende administrar a un sujeto, por ejemplo, a un sujeto que lo necesite, una cantidad inhibitoria del anticuerpo de la descripción.

El anticuerpo de la presente descripción puede administrarse mediante una o más de las vías que incluyen la vía intravenosa, la vía intraperitoneal, por inhalación, la vía intramuscular, las vías subcutáneas y orales. La presente descripción incluye un dispositivo de inhalación que suministra a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de acuerdo con la descripción.

La presente descripción incluye un método para detectar la proteína interleucina-13 en un sujeto, p. ej., en un paciente que padece una enfermedad alérgica, que comprende, p. ej., las etapas de permitir que el anticuerpo de la descripción entre en contacto con una muestra; y detectar la interleucina-13 a través de la aparición de inmunoreacción. También se describen métodos para diagnosticar la sobreexpresión de IL13 en un sujeto, que comprende las etapas de (a) obtener una muestra del sujeto; (b) combinar la muestra con un anticuerpo de acuerdo con la descripción en condiciones que permitan la inmunorreacción con IL13; y (c) determinar si la IL13 se sobreexpresa o no en relación a un nivel normal de expresión de IL13.

La presente descripción incluye un método para producir los anticuerpos de la descripción que comprende las siguientes etapas: a) producir un compuesto inmunogénico que comprenda un residuo de IL13 glucosilado y un residuo inmunogénico; b) preparar una solución inyectable que comprenda dicho compuesto inmunogénico en solución salina

5 tamponada con fosfato (PBS, *phosphate buffered saline*) y un adyuvante; c) inmunizar a un ratón con dicha solución inyectable mediante una combinación de inyecciones intravenosas e intraperitoneales, d) producir un hibridoma, fusionando un esplenocito (célula de bazo) procedente de dicho ratón inmunizado, con una célula de mieloma; e) seleccionar un hibridoma que produce un anticuerpo que tiene las características del anticuerpo de la descripción; y f) aislar dicho anticuerpo.

10 La presente descripción incluye un método para inhibir en un paciente la producción de anticuerpo de IgE, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un anticuerpo de acuerdo con la descripción, que inhiba la producción de anticuerpo de IgE. La inhibición de la producción del anticuerpo de IgE puede prevenir el asma bronquial, la rinitis alérgica, la dermatitis alérgica y la anafilaxia, y también tratar el asma bronquial, la rinitis alérgica, la urticaria y la dermatitis atópica.

La presente descripción incluye un método de tratamiento en un paciente de un trastorno mediado por IL13, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la descripción, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, inhibe la unión de IL13 con su receptor e inhibe una o más funciones asociadas a la unión de la interleucina con dicho receptor.

15 La presente descripción incluye un método de tratamiento en un paciente de un trastorno mediado por IgE, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la descripción, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, inhibe la unión de IL13 con su receptor e inhibe una o más funciones asociadas a la unión de la interleucina con dicho receptor.

20 La presente descripción incluye un método para reducir la gravedad del asma en un mamífero que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal anti IL13 que tiene al menos una de las siguientes características: la capacidad de unirse a la IL13 humana con una  $K_D$  entre aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  a aproximadamente  $1 \times 10^{12}$  M; la capacidad de inhibir una o más funciones asociadas a la unión de la interleucina IL13 con el receptor de IL13; y la incapacidad del anticuerpo de no unirse a la IL13 de ratón.

25 Las enfermedades y/o afecciones mediadas por IL13 que se contemplan en la invención incluyen, aunque sin limitación, asma alérgica, asma no alérgica (intrínseca), rinitis alérgica, dermatitis atópica, conjuntivitis alérgica, eccema, urticaria, alergias a los alimentos, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, colitis ulcerosa, infección por VRS (virus respiratorio sincicial), uveítis, esclerodermia y osteoporosis.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa la unión de anticuerpos monoclonales anti IL13 con la IL13 humana.

30 La figura 2 representa la unión de anticuerpos monoclonales anti IL13 con IL13-Fc mutante.

La figura 3 ilustra que el AcM (anticuerpo monoclonal) JES10-5A2 (Pharming) no inhibe la unión del AcM 228B/C-1 con la IL13 humana.

La figura 4 ilustra el efecto de los anticuerpos monoclonales anti IL13 sobre la proliferación de células de linfoma de Hodgkin L-1236.

35 La figura 5 ilustra el efecto de anticuerpos monoclonales anti IL13 sobre la supresión, inducida por IL13, de la expresión de CD14 en monocitos humanos.

La figura 6 ilustra el efecto de anticuerpos monoclonales anti IL13 sobre la regulación positiva, inducida por IL13, de la expresión de CD23 en monocitos humanos.

40 La figura 7 ilustra el efecto de anticuerpos monoclonales anti IL13 sobre la fosforilación de STAT6, inducida por IL13, en células THP-1.

La figura 8 representa la secuencia de aminoácidos de las regiones VH y VL del anticuerpo monoclonal 228B/C-1.

La figura 9 representa la secuencia de aminoácidos de las regiones VH y VL del anticuerpo monoclonal 228A-4.

La figura 10 representa la secuencia de aminoácidos de las regiones VH y VL del anticuerpo monoclonal 227-26.

45 La figura 11 representa las secuencias de las regiones variables de cadena ligera para la humanización del anticuerpo monoclonal 228B/C-1. Los clones B a R representan clones que se sometieron a ensayo con un molde humano 2 para una VH y VK de murino. Los clones HT2-NEW y HT2-DP27 se construyeron con regiones estructurales humanas tanto de VK como de VH.

La figura 12 representa las secuencias de clones de la cadena pesada correspondientes que se muestran en la figura 11.

Las figuras 13 A-E representan perfiles de ensayo ELISA para candidatos humanizados combinatorios.

50 La figura 14 A representa perfiles de ensayo ELISA para 89 V<sub>k</sub>/276G. La figura 14B representa los resultados del

ensayo ELISA de la construcción 115Vk/73Vh FL.

La figura 15 representa las secuencias de candidatos de la biblioteca combinatoria.

La figura 16 representa un perfil de competencia, analizado y demostrado de dos candidatos (CL5 y CL-13) en comparación con el candidato quimérico (228B/C n.º 3), por la unión con IL-13. El Fab irrelevante es 5i, que no demuestra capacidad para competir.

La figura 17 representa las secuencias de tres candidatos madurados por afinidad.

La figura 18 muestra el alineamiento de secuencias de la proteína IL13.

La figura 19 representa el epítipo de unión del AcM 228B/C-1.

La figura 20 representa las variantes de CDR y sus respectivas SEC ID NO.

La figura 21 representa las secuencias de la cadena ligera variable y de la cadena pesada variable de los anticuerpos recombinantes candidatos seleccionados.

### Descripción detallada

La presente invención no está limitada a la metodología, a los protocolos, a las líneas celulares, a los vectores o a los reactivos particulares descritos en el presente documento, ya que éstos pueden variar. Adicionalmente, la terminología utilizada en el presente documento tiene el único propósito de describir realizaciones particulares y no pretende limitar el alcance de la presente invención. Como se emplea en esta memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/a" y "el/la", incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario, p. ej., la referencia a "una célula hospedadora" incluye una pluralidad de dichas células hospedadoras.

A menos que se defina lo contrario, en el campo de la invención, todos los términos técnicos y científicos y cualquier acrónimo utilizado en el presente documento, tienen los mismos significados que los que comúnmente entiende un experto habitual en la materia. En el presente documento se describen ejemplos de métodos, dispositivos y materiales, aunque en la práctica de la presente invención puede usarse cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento.

Todas las patentes y publicaciones mencionadas en el presente documento están permitidas por la ley con el propósito de describir y divulgar las proteínas, las enzimas, los vectores, las células hospedadoras y las metodologías a las que se hace referencia en el mismo que podrían usarse con la presente invención. Sin embargo, nada en el presente documento deberá interpretarse como una admisión de que la invención no tenga derecho a establecer que dicha divulgación tiene una fecha anterior en virtud de una invención previa.

### Inmunógeno

Para generar los hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento, se usó IL13 recombinante para inmunizar ratones. La IL13 recombinante está disponible en el comercio de diversas fuentes (véase, por ejemplo, R& D Systems, Mineápolis, MN., PeproTech, Inc., NJ, y Sanofi Bio-Industries, Inc., Tervose, PA.). De manera alternativa, un gen o un ADNc que codifica la IL13 puede clonarse en un plásmido o en otro vector de expresión y expresarse en cualquiera de los diversos sistemas de expresión de acuerdo con métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Se conocen bien métodos de clonación y expresión de IL13 así como su secuencia de ácido nucleico (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 5 652 123). Debido a la degeneración del código genético, se puede producir una multitud de secuencias de nucleótidos que codifiquen polipéptidos de IL13. La secuencia de nucleótidos puede modificarse seleccionando combinaciones basadas en elecciones de posibles codones. Estas combinaciones se realizan de acuerdo con el código genético estándar formado por tripletes, aplicadas a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de IL13 de origen natural y todas estas variaciones deben tenerse en cuenta. Cualquiera de estos polipéptidos puede usarse en la inmunización de un animal para generar anticuerpos que se unan a IL13.

Cuando sea beneficioso, el polipéptido inmunógeno de IL13 puede expresarse como una proteína de fusión que tiene el polipéptido de IL13 unido a un segmento de fusión. A menudo, el segmento de fusión ayuda en la purificación de proteínas, p. ej., permitiendo que la proteína de fusión se aisle y purifique por cromatografía de afinidad. Las proteínas de fusión pueden producirse cultivando una célula recombinante transformada con una secuencia de ácido nucleico de fusión que codifica una proteína que incluye el segmento de fusión unido al extremo carboxilo y/o amino terminal de la proteína. Los segmentos de fusión pueden incluir, aunque sin limitación, regiones Fc de inmunoglobulina, glutatión-S-transferasa,  $\beta$ -galactosidasa, un segmento de polihistidina capaz de unirse a un ion metálico divalente y proteína de unión a maltosa.

Los polipéptidos ejemplares comprenden toda o una parte de la SEQ ID NO: 1, o de variantes de la misma, o de la SEQ ID NO: 2, en donde el aminoácido 13 es Xaa y puede cambiarse del ts (tipo silvestre), por ejemplo, ácido glutámico a lisina.

Para generar los anticuerpos descritos en el presente documento, se usó una proteína de fusión que comprendía una forma mutante de IL13 humana. Esta forma mutante de IL13 contenía una sola mutación que daba como resultado una forma inactiva de la proteína (Thompson et al., J. Biol. Chem. 274: 2994 (1999)). Para generar anticuerpos neutralizantes con alta afinidad, la proteína de fusión comprendía la proteína de IL13 mutante fusionada a una Fc de inmunoglobulina, específicamente de IgG1, y se expresó en una línea celular de mamífero de tal manera que la proteína recombinante se glucosilaba de manera natural. La parte Fc de la proteína de fusión puede haber proporcionado una estructura conformacional que expuso un epítipo clave. La glucosilación puede haber aumentado la inmunogenicidad del epítipo, permitiendo la generación de anticuerpos para este epítipo particular.

Los polipéptidos de IL13, expresados en *E. coli*, carecen de glucosilación y, usando esta proteína, se generaron los anticuerpos sometidos a ensayo, disponibles en el comercio. Estos anticuerpos, p. ej., R&D Systems y Pharmingen, se sometieron a ensayo, y descubrió que los anticuerpos generados con un inmunógeno producido en *E. coli*, no reaccionaban en cruzado con el epítipo unido por los anticuerpos descritos en el presente documento.

### Generación de anticuerpos

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden generarse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden comprender anticuerpos policlonales. El experto en la materia conoce métodos de preparación de anticuerpos policlonales (Harlow, et al., *Antibodies: a Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. (1988)).

Por ejemplo, un inmunógeno, como se describió anteriormente, puede administrarse a diversos animales hospedadores, entre los que se incluyen, aunque sin limitación, conejos, ratones, ratas, etc., para inducir la producción de sueros que contienen anticuerpos policlonales específicos para el antígeno. La administración del inmunógeno puede implicar una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, de un adyuvante. Para aumentar la respuesta inmunológica pueden usarse diversos adyuvantes, dependiendo de la especie hospedadora, y se incluyen, pero sin limitación, adyuvante (completo e incompleto) de Freund, geles minerales, tales como, hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas, tales como lisolecitina, poliols plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleaginosas, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles, tales como, BCG (Bacilo de Calmette y Guérin) y *Corynebacterium parvum*. Otros ejemplos de adyuvantes que pueden emplearse incluyen el adyuvante MPL-TDM (monofosforil lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). En la técnica se conocen bien protocolos de inmunización y pueden realizarse mediante cualquier método que suscite una respuesta inmunitaria en el hospedador animal elegido. Los adyuvantes también son muy conocidos en la técnica.

Normalmente, el inmunógeno (con o sin adyuvante) se inyecta al mamífero a través de múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales, o por vía intramuscular o IV (intravenosa). El inmunógeno puede incluir un polipéptido de IL13, una proteína de fusión o variantes de los mismos. Dependiendo de la naturaleza de los polipéptidos (es decir, del porcentaje de hidrofobicidad, del porcentaje de hidrofiliidad, de la estabilidad, de la carga neta, del punto isoeléctrico, etc.), puede ser útil conjugar el inmunógeno con una proteína que se sabe que es inmunogénica en el mamífero que se está inmunizando. Dicha conjugación incluye, conjugación química derivatizando grupos funcionales químicos activos tanto en el inmunógeno como en la proteína inmunogénica que se va a conjugar, de tal manera que se forme un enlace covalente, o mediante una metodología basada en proteínas de fusión, u otros métodos conocidos por el experto en la materia. Como ejemplos de dichas proteínas inmunogénicas se incluyen, aunque sin limitación, hemocianina de lapa californiana, ovoalbúmina, seroalbúmina, tiroglobulina bovina, inhibidor de tripsina de soja y péptidos promiscuos de linfocitos T auxiliares. Para aumentar la respuesta inmunológica como se describe anteriormente, se pueden usar diversos adyuvantes.

Los anticuerpos descritos en el presente documento comprenden anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando tecnología de hibridoma, tal como la descrita por Kohler y Milstein, *Nature*, 256: 495 (1975) y como la descrita en la patente de Estados Unidos N.º 4 376 110, por Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. (1988)), por Hammerling, et al. *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* (Elsevier, N.Y., (1981)), u otros métodos conocidos por el experto. Otros ejemplos de métodos que pueden emplearse para producir anticuerpos monoclonales incluyen, aunque sin limitación, la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (Kosbor et al., 1983, *Immunology Today* 4:72; Cole et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2026-2030), y la técnica de hibridoma con el VEB (Cole et al., 1985, *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96). Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de las mismas. El hibridoma que produce el AcM de esta invención, puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*.

Usando técnicas típicas de hibridoma, un hospedador, tal como un ratón, un ratón humanizado, un ratón con un sistema inmunitario humano, un hámster, un conejo, un camello o cualquier otro animal hospedador apropiado, normalmente se inmuniza con un inmunógeno para suscitar linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente con la IL13. De manera alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro* con el antígeno.

Generalmente, en la fabricación de hibridomas productores de anticuerpos, o se usan linfocitos de sangre periférica ("LSP"), si se desean células de origen humano, o se usan esplenocitos o células de ganglios linfáticos, si se desean

fuentes de mamíferos no humanos. Los linfocitos se fusionan después con una línea celular inmortalizada utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986), págs. 59-103). Las líneas celulares inmortalizadas generalmente son células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen roedor, bovino o humano. Normalmente, se emplea una línea celular de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma se pueden cultivar en un medio de cultivo adecuado que contenga, preferiblemente, una o más sustancias que inhiban el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células precursoras carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá, normalmente, hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), que son sustancias que impiden el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Son líneas celulares inmortalizadas preferidas las que se fusionan de manera eficaz, soportan un nivel de expresión alto y estable de los anticuerpos por las células productoras de anticuerpos seleccionados, y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferidas son líneas de mieloma murino, que pueden obtenerse, por ejemplo, en el *Salk Institute Cell Distribution Center*, San Diego, California y en la *American Type Culture Collection*, Manassas, Va. Human myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines may also be used for the production of human monoclonal antibodies (Kozbor, J. *Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987) págs. 51-63).

El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma se puede analizar después para detectar la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la IL13. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina, p. ej., mediante un ensayo de inmunoprecipitación o de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA). Dichas técnicas son conocidas y se incluyen en las capacidades del experto en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal con IL13 puede determinarse, por ejemplo, mediante un análisis Scatchard (Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)).

Después de identificar las células de hibridoma deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y crecer mediante métodos estándar (Goding, citado anteriormente). Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco y RPMI-1640. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden aislarse o purificarse del medio de cultivo mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, p. ej., proteína A-sepharose, cromatografía de hidroxipatita, cromatografía de exclusión en gel, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

En la técnica existen diversos métodos de producción de anticuerpos monoclonales y, por tanto, la invención no se limita a su exclusiva producción en hidridomas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en la patente de Estados Unidos N.º 4 816 567. En este contexto, la expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo procedente de un solo clon de eucariota, de fago o de procaríota. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (p. ej., usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos, o cadenas de este tipo de ser humano, humanizadas, o de otras fuentes). Las células de hidridoma de la invención sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que después se transforman en células hospedadoras tales como células NSO, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que, de otro modo, no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante por dominios constantes de la cadena pesada y ligera humana en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente de Estados Unidos N.º 4 816 567; Morrison et al, citados anteriormente), o uniéndose de manera covalente con toda la secuencia codificante de inmunoglobulina o con parte de la secuencia codificante de un polipéptido no inmunoglobulínico. Dicho polipéptido no inmunoglobulínico puede sustituirse por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o puede sustituirse por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. En la técnica se conocen bien métodos de preparación de anticuerpos monovalentes. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de la cadena pesada modificada y de la cadena ligera de inmunoglobulina. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto de la región Fc para impedir el entrecruzamiento de la cadena pesada. De manera alternativa, los restos de cisteína relevantes se sustituyen por otro resto de aminoácido o se delecionan para impedir el entrecruzamiento.

Los fragmentos de anticuerpo que reconocen epítomos específicos pueden generarse mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> de la invención pueden producirse mediante escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')<sub>2</sub>). Los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada.

Para algunos usos, incluido el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos y en ensayos de detección *in vitro*, puede

ser preferible usar anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes partes del anticuerpo provienen de diferentes especies animales, tales como anticuerpos que tienen una región variable que proviene de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. En la técnica se conocen métodos para producir dichos anticuerpos quiméricos. Véase, p. ej., Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4: 214 (1986); Gillies et al., (1989) J. Immunol. Methods 125:191-202; y las patentes de Estados Unidos N.º 5 807 715, 4 816 567 y 4 816 397.

Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo generadas en una especie no humana que se unen al antígeno deseado y que tienen una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR, *complementarity determining regions*) de las especies no humanas y regiones estructurales (FR, *framework regions*) de una molécula de inmunoglobulina humana. A menudo, los restos estructurales en las regiones estructurales humanas se sustituirán por el resto correspondiente del anticuerpo donante de la CDR para alterar, preferiblemente mejorar, la unión con el antígeno. Estas sustituciones estructurales se identifican por métodos bien conocidos en la técnica, p. ej., modelando las interacciones de los restos de la CDR y estructurales para identificar restos estructurales importantes para la unión del antígeno y la comparación de secuencias para identificar restos estructurales inusuales en posiciones particulares. (Véanse, p. ej., Queen et al., patente de Estados Unidos N.º 5 585 089; Riechmann et al., Nature 332: 323 (1988)). Los anticuerpos se pueden humanizar usando una variedad de técnicas conocidas en la materia, incluyendo, por ejemplo, injerto de CDR (EP 239 400; publicación PCI WO 91/09967; patentes N.º 5 225 539, 5.530.101 y 5 585 089), rebarnizado o rechapado (documentos EP 592 106, EP 519 596; Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska et al., PNAS 91:969-973 (1994)), y barajado de cadenas (patente de Estados Unidos N.º 5 565 332).

Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en este, procedentes de una fuente que no es humana. Con frecuencia, estos restos de aminoácidos no humanos se denominan restos "importados", que, normalmente, se toman de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo los métodos de Winter y colaboradores (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536 (1988), sustituyendo las CDR o secuencias de CDR de roedores por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de Estados Unidos N.º 4 816 567), en donde sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la CDR y posiblemente algunos restos FR están sustituidos por sitios análogos en anticuerpos de roedor.

Para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos, son particularmente deseables los anticuerpos completamente humanos. Los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, incluidos los métodos de presentación en fagos descritos anteriormente usando bibliotecas de anticuerpos procedentes de secuencias de inmunoglobulina humana. Véanse también, las patentes N.º 4 444 887 y 4 716 111; y las publicaciones PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741. Las técnicas de Cole et al., y de Boerder et al., también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Riss, (1985); y Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95, (1991)).

También pueden producirse anticuerpos humanos usando ratones transgénicos que no pueden expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, los complejos de genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera humana pueden introducirse aleatoriamente o mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. De manera alternativa, además de los genes de cadena pesada y ligera humana, la región variable, la región constante y la región de diversidad humana, puede introducirse en células madre embrionarias de ratón. Los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera de ratón pueden volverse no funcionales por separado o simultáneamente con la introducción de locus de inmunoglobulina humana mediante recombinación homóloga. En particular, la delección homocigota de la región JH impide la producción de anticuerpos endógenos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y se microinyectan en blastocistos para producir ratones quiméricos. Después, los ratones quiméricos se reproducen para producir descendencia homocigota que exprese anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan de manera normal con un antígeno seleccionado, p. ej., con toda o una parte de un polipéptido descrito en el presente documento. Usando tecnología de hibridoma convencional, a partir de los ratones transgénicos, inmunizados, pueden obtenerse anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Los transgenes de inmunoglobulina humana que llevaban los ratones transgénicos se reorganizan durante la diferenciación de linfocitos B, y posteriormente experimentan cambio de clase y mutación somática. Por tanto, usando dicha técnica, es posible producir anticuerpos de IgG, IgA, IgM e IgE, que sean útiles desde un punto de vista terapéutico. Para obtener una visión de conjunto de esta tecnología de producción de anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar, Int. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995). Para un análisis detallado de esta tecnología de producción de anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y de protocolos de producción de dichos anticuerpos, véanse, p. ej., las publicaciones PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; la patente Europea N.º 0 598 877; y las 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; 5 885 793; 5 916 771; y 5 939.598. Además, pueden contratarse empresas tales como Abgenix, Inc. (Freemont, California), Genpharm (San José, California) y Medarex, Inc. (Princeton, NJ) para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno

seleccionado utilizando tecnología similar a la descrita anteriormente.

También podrían prepararse AcM humanos inmunizando ratones trasplantados con leucocitos de sangre periférica humana, esplenocitos o médula ósea (p.ej, técnicas de Trioma de XTL). Usando una técnica denominada "selección guiada", pueden generarse anticuerpos completamente humanos que reconozcan un epítipo seleccionado. En esta estrategia, un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, p. ej., un anticuerpo de ratón se utiliza para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconozca el mismo epítipo. (Jespers et al., *Bio/technology* 12:899-903 (1988)),

Adicionalmente, a su vez, usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia, pueden utilizarse anticuerpos contra los polipéptidos descritos en el presente documento para generar anticuerpos anti idiotipo que "imiten" a los polipéptidos de la invención. (Véase, p. ej., Greenspan y Bona, *FASEB J.* 7(5):437-444; (1989) y Nissinoff, J. *Immunol.* 147(8):2429-2438 (1991)). Por ejemplo, para generar antiidiotipos que "imiten" el dominio de unión y/o la multimerización de polipéptidos y, como consecuencia, se unan al polipéptido y/o a su ligando y lo neutralicen, pueden usarse anticuerpos que se unan a un ligando, y que inhiban competitivamente la multimerización y/o unión de polipéptidos de un polipéptido descrito en el presente documento. Dichos antiidiotipos o fragmentos Fab neutralizantes de dichos antiidiotipos, pueden usarse en regímenes terapéuticos para neutralizar el ligando polipeptídico. Por ejemplo, dichos anticuerpos antiidiotípicos pueden usarse para unir un polipéptido descrito en el presente documento y/o para unir sus ligandos/receptores, y así bloquear su actividad biológica.

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden ser anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. En la presente invención, una de las especificidades de unión puede dirigirse hacia la IL13, la otra puede dirigirse a cualquier otro antígeno, y preferiblemente, a una proteína de la superficie celular, a un receptor, a una subunidad del receptor, a un antígeno específico de tejido, a una proteína procedente de un virus, a una proteína de envoltura codificada por un virus, a una proteína procedente de una bacteria, o a una proteína de la superficie bacteriana, etc.

Se conocen bien métodos de preparación de anticuerpos biespecíficos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes (Milstein y Cuello, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la diversidad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una posible mezcla de diez moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula apropiada, generalmente se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad. Se describen procedimientos similares en el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993 y en Trauneker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

Los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) pueden fusionarse con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferiblemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Puede tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión distintos y se transforman conjuntamente en un organismo hospedador adecuado. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., *Meth. in Enzym.*, 121:210 (1986).

En el presente documento también se describen anticuerpos heteroconjugados. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos por dos anticuerpos unidos de manera covalente. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas (patente de Estados Unidos N.º 4 676 980). Se contempla que los anticuerpos puedan prepararse *in vitro* utilizando métodos conocidos en química de proteínas sintéticas, incluidos los que implican agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéster pueden construirse inmunotoxinas. Como ejemplos de reactivos adecuados para este propósito se incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los descritos, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N.º 4 676 980.

Además, se pueden generar anticuerpos de un solo dominio contra IL-13. En el documento W09425591 se han descrito ejemplos de esta tecnología para anticuerpos procedentes de Ig de cadena pesada de camélidos, así como en el documento US20030130496 que describe el aislamiento de anticuerpos completamente humanos de un solo dominio a partir de fagotecas.

### Identificación de anticuerpos anti IL13

En el presente documento se describen anticuerpos monoclonales antagonistas que inhiben y neutralizan la acción de IL13. En particular, Los anticuerpos de la presente invención se unen a IL13 e inhiben la activación de la cadena alfa 1 del receptor de IL13 (IL13R $\alpha$ 1). Los anticuerpos descritos en el presente documento incluyen los anticuerpos denominados 228B/C-1, 228A-4, 227-26 y 227-43, y se describen clones humanizados del anticuerpo 228B/C-1. En el presente documento también se describen anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el de uno de estos

anticuerpos, p. ej., que el del anticuerpo monoclonal 228B/C-1.

Los anticuerpos candidatos anti IL13 se analizaron mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunotransferencia de Western u otras técnicas inmunoquímicas. Los ensayos realizados para caracterizar los anticuerpos individuales incluyeron: (1) Inhibición de la proliferación autocrina, inducida por IL13, de líneas celulares de linfoma de Hodgkin HDLM-2 y L-1236; (2) Inhibición de la fosforilación de STAT6, inducida por IL13, en células THP-1; y (3) Inhibición de la supresión, inducida por IL13, de la expresión de CD14 en monocitos humanos primarios; y (4) inhibición de la regulación positiva, inducida por IL13, de la expresión de CD23 en monocitos humanos primarios. Los detalles experimentales se describen en los ejemplos.

Los anticuerpos descritos en el presente documento incluyen, aunque sin limitación, anticuerpos policlonales, monoclonales, monovalentes, biespecíficos, heteroconjugados, multiespecíficos, humanos, humanizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, un anticuerpo de un solo dominio, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos antiidiotípicos (anti Id) (incluyendo, p. ej., anticuerpos anti Id contra anticuerpos descritos en el presente documento), y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores.

El término "anticuerpo", como se emplea en esta memoria, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y a partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina descritas en el presente documento pueden ser de cualquier tipo (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. Por otra parte, el término "anticuerpo" (Ac) o "anticuerpo monoclonal" (AcM) pretende incluir moléculas intactas, así como, fragmentos de anticuerpo (tales como, por ejemplo, fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub>) que son capaces de unirse específicamente a una proteína. Los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se elimina más rápidamente de la circulación del animal o de la planta, y pueden tener menor unión tisular no específica que un anticuerpo intacto (Wahl et al., J. Nucl. Med. 24:316-325 (1983)).

Los anticuerpos pueden ser fragmentos de anticuerpos humanos de unión a antígeno e incluyen, aunque sin limitación, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub> Fd, Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, Fv unidos por disulfuro (sdFv, *disulfide-linked* Fv) y anticuerpos de un solo dominio que comprenden un dominio VL o VH. Los fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno, incluidos los anticuerpos monocatenarios, pueden comprender la(s) región(es) variable(s) en solitario o en combinación con toda o con una parte de lo siguiente: región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. En el presente documento también se describen fragmentos de unión a antígeno que comprenden cualquier combinación de una o más regiones variables con una región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden ser de cualquier origen animal, incluidas aves y mamíferos. Preferentemente, los anticuerpos son de ser humano, primates no humanos, roedores (p. ej., ratón y rata), burro, oveja, conejo, cabra, cobaya, camello, caballo o pollo.

Como se emplea en esta memoria, los anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulina humana o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, como se describe más adelante y, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N.º 5 939 598 de Kucherlapati et al.

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden ser mono-específicos, biespecíficos, triespecíficos o de mayor multiespecificidad. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítopos de IL13 o pueden ser específicos tanto para IL13 como para un epítipo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo o material de soporte sólido. Véanse, p. ej., las publicaciones PCI WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, et al., J. Immunol. 147:60-69 (1991); las patentes de Estados Unidos N.º 4 474 893; 4 714 681; 4 925 648; 5 573 920; 5 601 819; Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992).

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden describirse o especificarse en términos del epítipo (o epítopos) o parte (o partes) de IL13 que reconocen o con los que se unen específicamente. Como se describe en el presente documento, el(los) epítipo(s) o parte(es) del(de los) polipéptido(s) puede(n) ser específico(s), p. ej., por posiciones N-terminal y C-terminal, por tamaño en restos de aminoácidos contiguos, o enumerados en las Tablas y Figuras.

Los anticuerpos descritos en el presente documento también pueden describirse o especificarse en términos de su reactividad cruzada. En la presente invención también se incluyen anticuerpos que se unen a polipéptidos de IL13, que tienen una identidad de al menos 95 %, de al menos 90 %, de al menos 85 %, de al menos 80 %, de al menos 75 %, de al menos 70 %, de al menos 65 %, de al menos 60 %, de al menos 55 % y de al menos 50 % (calculada usando métodos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento) con la IL-13. Los anticuerpos anti IL-13 también pueden unirse a otras proteínas con una K<sub>D</sub> menor que aproximadamente 10<sup>-7</sup> M, menor que aproximadamente 10<sup>-6</sup> M, o menor que aproximadamente 10<sup>-5</sup> M, tales como los anticuerpos de IL-13 de especies distintas de aquellas contra la cual se dirige el anticuerpo anti IL-13.

En aspectos específicos de la presente descripción, los anticuerpos reaccionan en cruzado con homólogos de mono de IL13 humana y los epítomos correspondientes de la misma. En un aspecto específico de la presente descripción, la reactividad cruzada descrita anteriormente es con respecto a cualquier polipéptido antigénico o inmunogénico específico único, o combinación(es) de los polipéptidos antigénicos y/o inmunogénicos específicos descritos en el presente documento.

Además, en el presente documento se describen anticuerpos que se unen a polipéptidos codificados por polinucleótidos que se hibridan con un polinucleótido que codifica la IL13 en condiciones de hibridación rigurosas. Los anticuerpos descritos en el presente documento también pueden describirse o especificarse en términos de su afinidad de unión con un polipéptido de la invención. Las afinidades de unión preferidas incluyen las que tienen una constante de disociación en equilibrio o  $K_D$  de  $10^{-8}$  a  $10^{-15}$  M, de  $10^{-8}$  a  $10^{-12}$  M, de  $10^{-8}$  a  $10^{-10}$  M o de  $10^{-10}$  a  $10^{-12}$  M. En el presente documento también se describen anticuerpos que inhiben competitivamente la unión de un anticuerpo con un epítomo descrito en el presente documento, según lo determinado mediante cualquier método conocido en la técnica para determinar la unión competitiva, por ejemplo, mediante los inmunoensayos descritos en el presente documento. En aspectos preferidos de la presente descripción, el anticuerpo inhibe competitivamente la unión con el epítomo en al menos 95 %, al menos 90 %, al menos 85 %, al menos 80 %, al menos 75 %, al menos 70 %, al menos 60 % o al menos 50 %.

### Vectores y células hospedadoras

En otro aspecto de la presente descripción, se proporcionan construcciones de vectores que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica los anticuerpos descritos en el presente documento y una célula hospedadora que comprende dicho vector. En la preparación de líneas celulares que expresan los anticuerpos descritos en el presente documento, pueden usarse técnicas estándar de clonación y transformación.

Los vectores de expresión recombinantes que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica los anticuerpos descritos en el presente documento, pueden prepararse usando técnicas bien conocidas. Los vectores de expresión incluyen una secuencia de nucleótidos unida operativamente a secuencias de nucleótidos reguladoras transcripcionales o traduccionales adecuadas, tales como las procedentes de genes de mamíferos, microbios, virus o insectos. Como ejemplos de secuencias reguladoras se incluyen promotores, operadores, potenciadores transcripcionales, sitios de unión ribosómica de ARNm y/u otras secuencias apropiadas que controlan el inicio y la terminación de la transcripción y traducción. Las secuencias de nucleótidos están "unidas operativamente" cuando la secuencia reguladora se relaciona funcionalmente con la secuencia de nucleótidos para el polipéptido apropiado. Por tanto, una secuencia de nucleótidos promotora está unida operativamente, p. ej., a la secuencia de la cadena pesada del anticuerpo, si la secuencia de nucleótidos promotora controla la transcripción de la secuencia de nucleótidos apropiada.

Además, las secuencias que codifican péptidos señal apropiados que no están naturalmente asociados a las secuencias de cadena pesada y/o ligera de anticuerpo, pueden incorporarse en vectores de expresión. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos para un péptido señal (líder secretor) puede fusionarse en fase con la secuencia de polipéptidos de modo que el anticuerpo se secrete al espacio periplasmático o en el medio. Un péptido señal, que es funcional en las células hospedadoras previstas, aumenta la secreción extracelular del anticuerpo apropiado. El péptido señal puede escindirse del polipéptido tras la secreción de anticuerpo de la célula. Se conocen bien ejemplos de dichas señales secretoras e incluyen, p. ej., los descritos en los documentos US5698435, US5698417 y US6204023.

Las células hospedadoras útiles en la presente invención incluyen, pero sin limitación, microorganismos tales como bacterias (p. ej., *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con ADN bacteriófago recombinante, vectores de expresión de ADN plasmídico o ADN cósmido que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; levaduras (p. ej., *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas con vectores de expresión de levadura recombinante que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células de insectos infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (p. ej., Baculovirus) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (p. ej., virus del mosaico de la coliflor, MVC; virus del mosaico del tabaco (VMT) o transformadas con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (p. ej., plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; o sistemas de células de mamífero (p. ej., células COS, CHO, BHK, 293, 3T3) que llevan construcciones de expresión recombinante que contienen promotores procedentes del genoma de células de mamífero (p. ej., promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (p. ej., el promotor tardío de adenovirus; el promotor del virus de la varicelovacuina 7.5K).

El vector puede ser un vector plasmídico, un vector de fago mono o bicatenario o un vector de virus de ARN o ADN mono o bicatenario. Dichos vectores pueden introducirse en las células como polinucleótidos mediante técnicas muy conocidas de introducción de ADN y ARN en las células. En el caso de vectores de fago y virus, los vectores también pueden introducirse en las células como virus empaquetados o encapsulados mediante técnicas muy conocidas de infección y transducción. Los vectores de virus pueden ser competentes o defectuosos en cuanto a su replicación. En este último caso, generalmente, la propagación del virus solo se producirá en células hospedadoras complementarias. Utilizando ARN procedentes de las presentes construcciones de ADN, también pueden emplearse sistemas de traducción acelulares para producir la proteína. Dichos vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifica

la región constante de la molécula de anticuerpo (véanse, p. ej., las publicaciones PCT WO 86/05807 y WO 89/01036 y la patente de Estados Unidos 5 122 464) y el dominio variable del anticuerpo puede clonarse en dicho vector para la expresión de toda la cadena pesada o ligera.

5 Los procariontes útiles como células hospedadoras en el contexto de la presente descripción incluyen organismos gram negativos o gram positivos tales como *E. coli*, y *B. subtilis*. Para su uso en células hospedadoras procariontes, generalmente, los vectores de expresión comprenden uno o más genes marcadores seleccionables fenotípicos. Un gen marcador seleccionable fenotípico es, por ejemplo, un gen que codifica una proteína que confiere resistencia a los antibióticos o que proporciona un requisito autótrofo. Como ejemplos de vectores de expresión útiles para células hospedadoras procariontes se incluyen los procedentes de plásmidos disponibles en el comercio, tales como pKK223-3 (Farmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia), pGEM1 (Promega Biotec, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) y las series de vectores de pET (Novagen, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) y pRSET (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, Estados Unidos) (Studier, F.W., J. Mol. Biol. 219: 37 (1991); Schoepfer, R. Gene 124: 83 (1993)). Las secuencias promotoras habitualmente utilizadas para los vectores de expresión de células hospedadoras procariontes recombinantes incluyen T7, (Rosenberg, et al. Gene 56, 125-135 (1987)),  $\beta$ -lactamasa (penicilinas), sistema promotor de lactosa (Chang et al., Nature 275: 615, (1978); y Goeddel et al., Nature 281:544, (1979)), el sistema promotor de triptófano (*trp*) (Goeddel et al., Nucl. Acids Res. 8:4057, (1980)), y el promotor *tac* (Sambrook et al., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.)

15 Las levaduras útiles en el contexto de la presente descripción incluyen levaduras de los géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Actinomyces* y *Kluyveromyces*. Los vectores de levadura a menudo contendrán un origen de secuencia de replicación de un plásmido de levadura  $2 \mu$ , una secuencia de replicación autónoma (SRA), una región promotora, secuencias de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción y un gen marcador seleccionable. Las secuencias promotoras adecuadas para vectores de levadura incluyen, entre otras, promotores de metalotioneína, 3-fosfoglicerato cinasa (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255:2073, (1980)) u otras enzimas glucolíticas (Holland et al., Biochem. 17:4900, (1978)) tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, trifosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucocinasa. Otros vectores y promotores adecuados para su uso en la expresión de levaduras se describen adicionalmente en Fleer et al., Gene, 107:285-195 (1991). En la técnica se conocen bien otros promotores y vectores de levaduras y protocolos de transformación de levaduras adecuados. Se conocen bien protocolos de transformación de levaduras. Hinnen et al., en Proc Natl. Acad. Sci., 75:1929 (1978), describen uno de estos protocolos. El protocolo de Hinnen selecciona transformantes *Trp* + en un medio selectivo.

20 Para expresar anticuerpos recombinantes, también pueden emplearse sistemas de cultivo de células hospedadoras de mamíferos o insectos, p. ej., sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas. En un sistema de insectos, como vector para expresar genes exógenos puede utilizarse el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (VPNAc). El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante de anticuerpos puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de poliedrina) del virus y colocarse bajo el control de un promotor del VPNAc (por ejemplo, el promotor de poliedrina).

25 Para la expresión en mamíferos de los anticuerpos descritos en el presente documento pueden usarse células NSO o de ovario de hámster chino (CHO). Las secuencias de control transcripcionales y traduccionales para los vectores de expresión de células hospedadoras de mamífero pueden escindirse de genomas de virus. Las secuencias promotoras y las secuencias potenciadoras habitualmente utilizadas proceden de poliomavirus, adenovirus 2, virus de simio 40 (SV40) y citomegalovirus humano (CMV). Para proporcionar otros elementos genéticos para la expresión de una secuencia génica estructural en una célula hospedadora de mamífero, pueden utilizarse secuencias de ADN procedentes del genoma del virus SV40, p. ej., origen de SV40, promotor temprano y tardío, potenciador, corte y empalme y sitios de poliadenilación. Los promotores víricos tempranos y tardíos son particularmente útiles ya que ambos se obtienen fácilmente a partir de un genoma vírico como un fragmento que también puede contener un origen de replicación vírico. En el comercio se dispone de vectores de expresión ejemplares para su uso en células hospedadoras de mamífero.

### Polinucleótidos que codifican anticuerpos

30 En el presente documento se describen polinucleótidos o ácidos nucleicos adicionales, p. ej., ADN, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo descrito en el presente documento y fragmentos del mismo. Los polinucleótidos ejemplares incluyen aquellos que codifican cadenas de anticuerpos que comprenden una o más de las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento. En el presente documento también se describen polinucleótidos que se hibridan en condiciones de hibridación rigurosas o de menor rigurosidad con polinucleótidos que codifican un anticuerpo descrito en el presente documento.

35 Mediante métodos conocidos en la técnica es posible obtener los polinucleótidos y determinar la secuencia de nucleótidos de los mismos. Por ejemplo, si se conoce la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, un polinucleótido que codifica el anticuerpo puede ensamblarse a partir de oligonucleótidos sintetizados por medios químicos (p. ej., como se describe en Kutmeier et al., BioTechniques 17: 242 (1994)), que, resumiendo, implica la síntesis de oligonucleótidos solapantes que contienen partes de la secuencia que codifica el anticuerpo, el apareamiento y ligamiento de esos oligonucleótidos, y después, la amplificación mediante PCR de los oligonucleótidos ligados.

De manera alternativa, un polinucleótido que codifica un anticuerpo puede generarse a partir de ácido nucleico de una fuente adecuada. Si no se dispone de un clon que contenga un ácido nucleico que codifique un anticuerpo particular, pero se conoce la secuencia de la molécula de anticuerpo, un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina puede sintetizarse por medios químicos u obtenerse a partir de una fuente adecuada (p. ej., una biblioteca de ADNc de anticuerpos o una biblioteca de ADNc generada a partir de ácido nucleico, preferiblemente ARN poli A<sup>+</sup>, aislarse de cualquier tejido o células que expresen el anticuerpo, tales como células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo descrito en el presente documento) mediante amplificación por PCR usando cebadores sintéticos que pueden hibridarse con los extremos 3' y 5' de la secuencia o mediante clonación usando una sonda de oligonucleótidos específica para la secuencia de genes particular para identificar, p. ej., un clon de ADNc de una biblioteca de ADNc que codifica el anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados generados por PCR pueden clonarse después en vectores de clonación que pueden replicarse usando cualquier método bien conocido en la técnica.

Una vez que se determina la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente del anticuerpo, la secuencia de nucleótidos del anticuerpo puede manipularse usando métodos de manipulación de secuencias de nucleótidos bien conocidos en la técnica, p. ej., técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida, PCR, etc. (Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al., 1990, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2<sup>a</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. y Ausubel et al., eds., 1998, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY), para generar anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo, para crear sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos.

En un aspecto específico de la presente descripción, la secuencia de aminoácidos de los dominios variable de la cadena pesada y/o ligera, también puede inspeccionarse mediante métodos bien conocidos para identificar las secuencias de las CDR, p. ej., por comparación con secuencias de aminoácidos conocidas de otras regiones variables de cadena pesada y ligera, para determinar las regiones de hipervariabilidad de secuencia. Usando técnicas habituales de ADN recombinante, una o más de las CDR pueden insertarse en las regiones estructurales, p. ej., en regiones estructurales humanas para humanizar un anticuerpo no humano, como se ha descrito anteriormente. Las regiones estructurales pueden ser regiones estructurales de origen natural o consenso, y preferentemente, regiones estructurales humanas (véase, p. ej. Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 278: 457-479 (1998), para consultar una lista de regiones estructurales humanas). Preferentemente, el polinucleótido generado por la combinación de las regiones estructurales y las CDR, codifica un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de la invención. Preferentemente, como se ha mencionado en líneas anteriores, en las regiones estructurales se pueden realizar una o más sustituciones de aminoácidos, y, preferentemente, las sustituciones de aminoácidos mejoran la unión del anticuerpo con su antígeno. Adicionalmente, dichos métodos pueden usarse para realizar sustituciones o deleciones de aminoácidos de uno o más restos de cisteína de la región variable que participan en un enlace disulfuro intracadena para generar moléculas de anticuerpo que carecen de uno o más enlaces disulfuro intracadena. En el presente documento y en el estado de la técnica se desvelan otras modificaciones en el polinucleótido.

Además, pueden usarse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 851-855 (1984); Neuberger et al., 312:604-608 (1984); Takeda et al., *Nature* 314: 452-454 (1985)) mediante el corte y empalme de genes de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad antigénica apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada. Como se ha descrito en líneas anteriores, un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes partes proceden de diferentes especies animales, como las que tienen una región variable procedente de un AcM murino y una región constante de inmunoglobulina humana, p. ej., anticuerpos humanizados.

De manera alternativa, para producir anticuerpos monocatenarios, pueden adaptarse técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (patente de Estados Unidos N.º 4 946 778; Bird, *Science* 242:423-42 (1988); Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 85:5879-5883 (1988) y Ward et al., *Nature* 334: 544-54 (1989)). Los anticuerpos monocatenarios se forman uniendo los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv a través de un puente de aminoácidos, dando como resultado un polipéptido monocatenario (de una sola cadena). También pueden usarse técnicas para el ensamblaje de fragmentos Fv funcionales en *E. coli* (Skerra et al., *Science* 242: 1038-1041 (1988)).

### Métodos de producción de anticuerpos anti IL13

Los anticuerpos desvelados en el presente documento pueden producirse mediante cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular, por síntesis química o preferiblemente, por técnicas de expresión recombinante.

La expresión recombinante de un anticuerpo desvelado en el presente documento, o fragmento, derivado o análogo del mismo, (p. ej., una cadena pesada o ligera de un anticuerpo desvelado en el presente documento o un anticuerpo monocatenario de la invención), requiere la construcción de un vector de expresión que contenga un polinucleótido que codifique el anticuerpo o un fragmento del anticuerpo. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo, para la producción del anticuerpo, el vector puede producirse mediante tecnología de ADN recombinante. Se construye un vector de expresión que contiene secuencias que codifican un anticuerpo y señales de control transcripcionales y traduccionales apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*.

El vector de expresión se transfiere a una célula hospedadora mediante técnicas convencionales, y después, las células transfectadas se cultivan mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo desvelado en el presente documento. En un aspecto de la presente descripción, los vectores que codifican las cadenas, tanto pesada como ligera, pueden coexpresarse (expresarse conjuntamente) en la célula hospedadora para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa, como se detalla más adelante.

Como se ha descrito anteriormente, para expresar las moléculas de anticuerpo desveladas en el presente documento, se puede utilizar una variedad de sistemas de vectores de expresión de hospedadores. Dichos sistemas de expresión de hospedadores representan vehículos mediante los cuales pueden producirse y posteriormente purificarse las secuencias codificantes de interés, pero también representan células que, cuando se transforman o se transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, pueden expresar *in situ* una molécula de anticuerpo de la invención. Para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante, especialmente para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante completa, habitualmente se usan células bacterianas, tales como *E. coli*, y células eucariotas. Por ejemplo, células de mamífero, tales como células de ovario de hámster chino (CHO, *chinese hamster ovary cells*), junto con un vector, tal como el elemento promotor del gen temprano intermedio principal del citomegalovirus humano, es un sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foecking et al., *Gene* 45: 101 (1986); Cockett et al., *Bio/Technology* 8:2 (1990)).

Además, se puede elegir una cepa de célula hospedadora que module la expresión de las secuencias insertadas, o que modifique y procese el producto génico de una manera específica deseada. Dichas modificaciones (p. ej., glucosilación) y procesamiento (p. ej., escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Para el procesamiento y la modificación postraduccional de productos proteicos y génicos, las diferentes células hospedadoras tienen mecanismos característicos y específicos. Para garantizar una modificación y procesamiento correctos de la proteína exógena expresada, se pueden elegir líneas celulares o sistemas hospedadores apropiados. Para este fin, pueden usarse células hospedadoras eucariotas que posean la maquinaria celular para el procesamiento adecuado de la transcripción, glucosilación y fosforilación primarias del producto génico. Dichas células hospedadoras de mamífero incluyen, aunque sin limitación, células CHO, COS, 293, 3T3 o de mieloma.

Para la producción prolongada y de alto rendimiento de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, pueden diseñarse líneas celulares que expresen de manera estable la molécula de anticuerpo. En lugar de usar vectores de expresión que contengan orígenes de replicación de virus, las células hospedadoras pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de expresión apropiados (p. ej., promotores, potenciadores, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN exógeno, las células diseñadas se dejan en cultivo 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 que las células integren de manera estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que, a su vez, pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. De manera favorable, este método puede usarse para diseñar líneas celulares que expresen la molécula de anticuerpo. Dichas líneas celulares diseñadas pueden ser particularmente útiles en la exploración y evaluación de compuestos que interaccionan directa o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

Se pueden usar diversos sistemas de selección, incluyendo, pero sin limitación, los genes de la timidina cinasa del virus del herpes simple (Wigler et al., *Cell* 11: 223 (1977)), de la hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48: 202 (1992)) y de la adenina fosforribosiltransferasa (Lowy et al., *Cell* 22: 817 (1980)) que pueden emplearse en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. Además, puede utilizarse la resistencia a antimetabolitos como base de selección para los siguientes genes: dbfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 77: 357 (1980); O'Hare et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 78: 1527 (1981)); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 78:2072 (1981)); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 (Wu y Wu, *Biotherapy* 3: 87-95 (1991)); y higo, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre et al., *Gene* 30: 147 (1984)). Para seleccionar el clon recombinante deseado, pueden aplicarse de manera habitual métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante, 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 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., *J. Mol. Biol.* 150:1 (1981).

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

La célula hospedadora puede cotransfectarse con dos vectores de expresión desvelados en el presente documento, el primer vector codifica un polipéptido que proviene de la cadena pesada y el segundo vector codifica un polipéptido que proviene de la cadena ligera. Los dos vectores pueden contener los mismos marcadores seleccionables lo que permite una expresión equitativa de polipéptidos de cadena pesada y ligera. De manera alternativa, se puede usar un

solo vector que codifique, y que sea capaz de expresar, ambos polipéptidos de cadena y ligera. En dichas situaciones, la cadena ligera debe colocarse antes de la cadena pesada para impedir un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, Nature 322: 52 (1986); Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197 (1980)). Las secuencias codificantes de las cadenas pesadas y ligeras pueden comprender ADNc o ADN genómico.

5 Una vez que un animal ha producido una molécula de anticuerpo descrita en el presente documento, o que dicha molécula se ha sintetizado por medios químicos o que se ha expresado se manera recombinante, ésta puede purificarse mediante cualquier método de purificación conocido en la técnica de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (p. ej., intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad para el antígeno específico después de cromatografía con proteína A y de exclusión por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o por  
10 cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además, para facilitar la purificación, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, descritos en el presente documento, pueden fusionarse con secuencias de polipéptidos heterólogos descritas en el presente documento o, de otro modo, conocidas en la técnica.

En el presente documento también se describen anticuerpos fusionados de manera recombinante o conjugados por medios químicos (incluyendo conjugaciones tanto covalentes como no covalentes) con un polipéptido. Los anticuerpos fusionados o conjugados descritos en el presente documento pueden usarse para facilitar la purificación. Véase, p. ej., Harbour et al., citados anteriormente y la publicación PCI WO 93/21232; los documentos EP 439 095; Naramura et al., Immunol. Lett. 39:91-99 (1994); la patente de Estados Unidos N.º 5 474 981; Gillies et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 1428-1432 (1992); Fell et al., J. Immunol. 146:2446-2452 (1991).

Por otra parte, para facilitar la purificación, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, descritos en el presente documento, pueden fusionarse con secuencias marcadoras, tales como un péptido. En aspectos preferidos de la presente descripción, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexahistidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), entre otros, muchas de las cuales están disponibles en el comercio. Tal como describen Paulsen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 821-824 (1989), por ejemplo, la hexahistidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Como  
25 otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación se incluyen, aunque sin limitación, la etiqueta de "HA" (hemaglutinina), que corresponde a un epítipo procedente de la proteína hemaglutinina gripal (Wilson et al., Cell 37: 767 (1984)) y la etiqueta "flag".

#### Usos diagnósticos de los anticuerpos anti IL13

Los anticuerpos descritos en el presente documento incluyen derivados que se modifican, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula con el anticuerpo, de tal manera que la unión covalente no interfiera con la unión a IL13. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados de anticuerpos incluyen anticuerpos que se han modificado, p. ej., por biotilación, HRP, o cualquier otro residuo detectable.

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden usarse, por ejemplo, aunque sin limitación, para purificar o detectar IL13, incluyendo métodos de diagnóstico tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, los anticuerpos se utilizan en inmunoensayos para medir de manera cualitativa y cuantitativa niveles de IL13 en muestras biológicas. Véase, p. ej., Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988).

Como se indica con más detalle a continuación, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden usarse solos o en combinación con otras composiciones. Adicionalmente, los anticuerpos pueden fusionarse de manera recombinante con un polipéptido heterólogo en el extremo N o C o conjugarse por medios químicos (incluyendo conjugaciones covalentes y no covalentes) con polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden fusionarse de manera recombinante o conjugarse con moléculas útiles como marcadores en ensayos de detección.

Además, en el presente documento se describen anticuerpos, o fragmentos de los mismos, conjugados con un agente de diagnóstico. Desde un punto de vista diagnóstico, los anticuerpos pueden usarse, por ejemplo, para supervisar el desarrollo o evolución de una respuesta alérgica como parte de un procedimiento de ensayo clínico para, p. ej., determinar la eficacia de un régimen de tratamiento determinado. La detección puede facilitarse acoplado el anticuerpo a una sustancia detectable. Como ejemplos de sustancias detectables se incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radioactivos, metales emisores de positrones utilizando diversas tomografías de emisión de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. La sustancia detectable puede acoplarse o conjugarse directamente al anticuerpo (o fragmento del mismo) o indirectamente, a través de un producto intermedio (tal como, por ejemplo, un enlazador conocido en la técnica) usando técnicas conocidas en la materia. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 4 741 900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para su uso como pruebas diagnósticas de acuerdo con la presente descripción. Como ejemplos de enzimas adecuadas se incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta galactosidasa o acetilcolinesterasa; como ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados se incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; como ejemplos de materiales fluorescentes adecuados se incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; como un ejemplo de un material luminiscente se incluye luminol; como ejemplos de materiales bioluminiscentes se incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y como ejemplos de material

radiactivo adecuado se incluyen  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$  o  $^{99}\text{Tc}$ .

Los anticuerpos también se pueden unir a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno diana. Dichos soportes sólidos incluyen, aunque sin limitación, vidrio, celulosa, poliácridamida, nailon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

- 5 Los anticuerpos marcados, y sus derivados y análogos, que se unen específicamente a IL13, se pueden usar con fines de diagnóstico para detectar, diagnosticar o supervisar enfermedades, trastornos y/o afecciones asociados a la expresión y/o actividad aberrante de IL13. La invención proporciona la detección de la expresión aberrante de IL13, que comprende (a) analizar la expresión de IL13 en las células o líquido corporal de un individuo usando uno o más anticuerpos de la presente invención específicos contra IL13 y (b) comparar el nivel de expresión génica con un nivel de expresión génica estándar, por lo que un aumento o disminución en el nivel de expresión de IL13 analizado en comparación con el nivel de expresión estándar, es indicativo de expresión aberrante.

Los anticuerpos pueden usarse para detectar la presencia y/o los niveles de IL13 en una muestra, p. ej., una muestra de líquido o tejido corporal. El método de detección puede comprender poner en contacto la muestra con un anticuerpo contra IL13 y determinar la cantidad de anticuerpo que se une a la muestra.

- 15 En el presente documento también se describe un ensayo de diagnóstico para diagnosticar un trastorno, que comprende (a) analizar la expresión de IL13 en células o fluido corporal de un individuo usando uno o más anticuerpos descritos en el presente documento y (b) comparar el nivel de expresión génica con un nivel de expresión génica estándar, por lo que un aumento o disminución en el nivel de expresión génica analizado en comparación con el nivel de expresión estándar, es indicativo de un trastorno particular.

- 20 Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden usarse para analizar los niveles de proteína en una muestra biológica usando métodos inmunohistológicos clásicos conocidos por los expertos en la técnica (p. ej., véase Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 101:976-985 (1985); Jalkanen, et al., J. Cell Biol. 105:3087-3096 (1987)). Otros métodos basados en anticuerpos, útiles para detectar la expresión de genes de proteínas, incluyen inmunoensayos, tales como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA). En la técnica se conocen marcadores de ensayo de anticuerpos adecuados e incluyen marcadores enzimáticos, tales como, glucosa oxidasa; radioisótopos, tales como yodo ( $^{125}\text{I}$ ,  $^{121}\text{I}$ ), carbono ( $^{14}\text{C}$ ), azufre ( $^{35}\text{S}$ ), tritio ( $^3\text{H}$ ), indio ( $^{112}\text{In}$ ) y tecnecio ( $^{99}\text{Tc}$ ); etiquetas luminiscentes, tal como luminol; y etiquetas fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, y biotina.

- 30 Un aspecto de la presente descripción es la detección y diagnóstico de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión aberrante de IL13 en un animal, preferiblemente un mamífero y lo más preferiblemente un ser humano. En una realización, el diagnóstico comprende: a) administrar (por ejemplo, por vía parenteral, subcutánea o intraperitoneal) a un sujeto, una cantidad eficaz de una molécula marcada que se une específicamente a IL13; b) esperar un intervalo de tiempo después de la administración que permita que la molécula marcada se concentre preferentemente en los sitios en el sujeto donde se expresa el polipéptido (y que la molécula marcada no unida se elimine al nivel de fondo); c) determinar el nivel de fondo; y d) detectar la molécula marcada en el sujeto, de tal manera que la detección de la molécula marcada por encima del nivel de fondo indica que el sujeto tiene una enfermedad o trastorno particular asociado a la expresión aberrante de IL13. El nivel de fondo se puede determinar mediante diversos métodos, que incluyen, comparar la cantidad de molécula marcada detectada con un valor estándar previamente determinado para un sistema particular.

- 40 Se entenderá en la técnica que la envergadura del sujeto y el sistema de formación de imágenes utilizado, determinarán la cantidad de fracción de imagen será necesaria para producir las imágenes de diagnóstico. En el caso de un residuo de radioisótopo, para un sujeto humano, la cantidad de radiactividad inyectada normalmente variará de aproximadamente 5 a 20 milicurios de  $^{99}\text{Tc}$ . El anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, marcado se acumulará después, preferentemente en el lugar de las células que contiene la proteína específica. La obtención de imágenes *in vivo* se describe en S. W. Burchiel et al., "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments." (capítulo 13 en Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S. W. Burchiel y B. A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982).

- 45 Dependiendo de diversas variables, incluido el tipo de marcador utilizado y el modo de administración, el intervalo de tiempo después de la administración, para permitir que la molécula marcada se concentre preferentemente en lugares del sujeto y para que la molécula marcada no unida se elimine al nivel de fondo, es de 6 a 48 horas o de 6 a 24 horas o de 6 a 12 horas. En otra realización, el intervalo de tiempo después de la administración es de 5 a 20 días o de 5 a 10 días.

En un aspecto de la presente descripción, la supervisión de la enfermedad o trastorno se lleva a cabo repitiendo el método para diagnosticar la enfermedad o el trastorno, por ejemplo, un mes después del diagnóstico inicial, seis meses después del diagnóstico inicial, un año después del diagnóstico inicial, etc.

- 55 La presencia de la molécula marcada se puede detectar en el paciente utilizando métodos de exploración *in vivo* conocidos en la técnica. Estos métodos dependen del tipo de marcador utilizado. Los expertos en la materia podrán determinar el método apropiado para detectar un marcador particular. Los métodos y dispositivos que pueden usarse en los métodos de diagnóstico de la invención incluyen, aunque sin limitación, tomografía computarizada (TC),

exploración de todo el cuerpo, tal como tomografía por emisión de positrones (PET, *positron emission tomography*), resonancia magnética (RM) y ecografía.

En un aspecto específico de la presente descripción, la molécula se marca con un radioisótopo y se detecta en el paciente utilizando un instrumento quirúrgico sensible a radiación (Thurston et al., Estados Unidos, patente N.º 5 441 050). En otra realización, la molécula se marca con un compuesto fluorescente y se detecta en el paciente usando un instrumento de exploración sensible a fluorescencia. En otra realización, la molécula se marca con un metal emisor de positrones y se detecta en el paciente usando tomografía por emisión de positrones. En otro aspecto más de la presente descripción, la molécula se marca con un marcador paramagnético y se detecta en un paciente usando resonancia magnética (RM).

En otro aspecto de la presente descripción, se describe un método para diagnosticar la predisposición de un paciente a desarrollar enfermedades causadas por la expresión no regulada de citocinas. Mayores cantidades de IL13 en determinadas células, tejidos o líquidos corporales de los pacientes, pueden indicar que el paciente está predispuesto a determinadas enfermedades inmunitarias. En un aspecto de la presente descripción, el método comprende recoger una muestra de células, de tejido o de líquido corporal de un sujeto que se sabe que tiene niveles bajos o normales de IL13, analizar el tejido o el líquido corporal para detectar la presencia de IL13 en el tejido o el líquido corporal y predecir la predisposición del paciente a determinadas enfermedades inmunitarias en función del nivel de expresión de IL13 en el tejido o el líquido corporal. En otro aspecto de la presente descripción, el método comprende recoger una muestra de células, de tejido o de líquido corporal de un paciente que se sabe que tiene un nivel definido de IL13, analizar el tejido o el líquido corporal para detectar la cantidad de IL13 y predecir la predisposición del paciente a determinadas enfermedades inmunitarias en función del cambio en la cantidad de IL13 en comparación con un nivel definido o analizado, establecido para una célula, tejido o líquido corporal normales. El nivel definido de IL13 puede ser una cantidad conocida basada en valores citados en la bibliografía o puede determinarse de antemano midiendo la cantidad en células, tejidos o líquidos corporales normales. De manera específica, la determinación de los niveles de IL13 en ciertos tejidos o líquidos corporales, permite la detección de enfermedades inmunitarias en el paciente, de manera específica y temprana, preferentemente antes de que aparezca la enfermedad. Las enfermedades inmunitarias que pueden diagnosticarse usando el presente método incluyen, aunque sin limitación, las enfermedades inmunitarias descritas en el presente documento. En el aspecto preferido de la presente descripción, el tejido o fluido corporal es sangre periférica, leucocitos de sangre periférica, tejidos de biopsia, tales como biopsias de pulmón o piel, y tejido.

### 30 **Usos terapéuticos de los anticuerpos anti IL13**

Un anticuerpo, con o sin residuo terapéutico conjugado con él, administrado solo o en combinación con uno o más factores citotóxicos, puede usarse como una opción terapéutica. En el presente documento se describen terapias basadas en anticuerpos que implican, administrar a un animal, a un mamífero o a un ser humano, los anticuerpos descritos en el presente documento, para tratar una enfermedad, un trastorno o una afección mediada por IL13. El animal o sujeto puede ser un animal que necesite un tratamiento particular, tal como un animal al que se le ha diagnosticado un trastorno particular, p. ej., uno relacionado con IL13. Los anticuerpos dirigidos contra IL13 son útiles para inhibir reacciones alérgicas en animales, incluyendo, pero sin limitación, vacas, cerdos, caballos, pollos, gatos, perros, primates no humanos, etc., así como seres humanos. Por ejemplo, administrando una dosis terapéuticamente aceptable de un anticuerpo, o anticuerpos, descritos en el presente documento, o un cóctel de los presentes anticuerpos, o en combinación con otros anticuerpos de diversas fuentes, una respuesta alérgica a los antígenos puede reducirse o eliminarse en el mamífero tratado.

Los compuestos terapéuticos descritos en el presente documento incluyen, aunque sin limitación, anticuerpos descritos en el presente documento (incluidos fragmentos, análogos y derivados de los mismos como los descritos en el presente documento) y ácidos nucleicos que codifican anticuerpos descritos en el presente documento como se describe más adelante (incluidos fragmentos, análogos y derivados de los mismos y anticuerpos antiidiotípicos como los descritos en el presente documento). Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden usarse para tratar, inhibir o prevenir enfermedades, trastornos o afecciones asociados a la expresión y/o actividad aberrante de IL13, incluyendo, aunque sin limitación, cualquiera o una más de las enfermedades, trastornos o afecciones descritos en el presente documento. El tratamiento y/o prevención de enfermedades, trastornos o afecciones asociados a la expresión y/o actividad aberrante de IL13 incluyen, aunque sin limitación, el alivio de al menos un síntoma asociado a esas enfermedades, trastornos o afecciones. Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden proporcionarse en composiciones farmacéuticamente aceptables como se conoce en la técnica o como se describe en el presente documento.

Los anticuerpos anti IL13 descritos en el presente documento pueden usarse terapéuticamente en una variedad de enfermedades. En el presente documento también se describe un método para prevenir o tratar enfermedades mediadas por IL13 en un mamífero. El método comprende administrar al mamífero una cantidad de anticuerpo anti IL13 para prevenir o tratar la enfermedad. El anticuerpo anti IL13 se une a IL13 y regula la expresión de citocinas y receptores celulares produciendo niveles de citocinas característicos de estados sin enfermedad. Por tanto, las enfermedades para el tratamiento incluyen alergia, asma, enfermedad autoinmunitaria u otras enfermedades inflamatorias. Otras enfermedades alérgicas incluyen rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad alimentaria y urticaria; las enfermedades cutáneas mediadas por el sistema inmunitario incluyen enfermedades cutáneas

ampollosas, eritema multiforme y dermatitis de contacto; las enfermedades autoinmunitarias incluyen psoriasis, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil; enfermedad inflamatoria intestinal (es decir, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn); otras enfermedades asociadas con IL13 incluyen neumonía intersticial idiopática, metaplasia de células calcificadas, enfermedades pulmonares inflamatorias y fibróticas como la fibrosis quística, enteropatía sensible al gluten y enfermedad de Whipple; enfermedades inmunológicas del pulmón como la neumonía eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad; enfermedad pulmonar obstructiva crónica, infección por VRS (virus respiratorio sincicial), uveítis, esclerodermia, osteoporosis y linfoma de Hodgkin.

La cantidad de anticuerpo que será eficaz en el tratamiento, inhibición y prevención de una enfermedad o trastorno asociado a la expresión y/o actividad aberrante de IL13, se puede determinar mediante técnicas clínicas estándar. El anticuerpo puede administrarse en regímenes de tratamiento compatibles con la enfermedad, p. ej., puede administrarse una sola dosis o algunas dosis durante uno a varios días para mejorar una patología o dosis periódicas durante un período de tiempo prolongado para prevenir la alergia o el asma. Además, opcionalmente, para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos, pueden emplearse ensayos *in vitro*. La dosis exacta que se empleará en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la enfermedad o del trastorno, y según las circunstancias de cada paciente será el médico tratante quien decidirá la dosis. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de curvas de respuesta a la dosis, obtenidas de sistemas de ensayo realizados *in vitro* o en modelos animales.

Para los anticuerpos, normalmente, la dosificación administrada a un paciente varía de 0,1 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. Preferiblemente, la dosis administrada a un paciente varía entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg del peso corporal del paciente, más preferiblemente de 1 mg/kg a 10 mg/kg del peso corporal del paciente. Generalmente, los anticuerpos humanos tienen una semivida más larga en el cuerpo humano que los anticuerpos de otras especies debido a la respuesta inmunitaria contra los polipéptidos exógenos. Por tanto, a menudo son posibles dosificaciones más bajas de anticuerpos humanos y una administración menos frecuente. Adicionalmente, la dosificación y la frecuencia de administración de los anticuerpos de la invención pueden reducirse mejorando la absorción y la penetración tisular (por ejemplo, en el cerebro) de los anticuerpos mediante modificaciones tales como, por ejemplo, lipídación.

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden utilizarse ventajosamente en combinación con otros anticuerpos monoclonales o quiméricos, o con linfocinas o factores de crecimiento hematopoyéticos (tales como, p. ej., IL-2, IL-3, IL-7, IFN), por ejemplo, que sirven para aumentar el número o la actividad de las células efectoras que interactúan con los anticuerpos.

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden administrarse en solitario o en combinación con otros tipos de tratamientos, tales como inmunoterapia, broncodilatadores, moléculas anti IgE, antihistamínicos o antileucotrienos.

En un aspecto preferido, el anticuerpo está sustancialmente purificado (p. ej. carece sustancialmente de sustancias que limitan su efecto o que producen efectos secundarios no deseados).

Para administrar un anticuerpo descrito en el presente documento, pueden usarse diversos sistemas de suministro conocidos, entre los que se incluye, inyección, p. ej., encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto, endocitosis mediada por receptores (véase, p. ej., Wu et al., J. Biol Chem. 262:4429-4432 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retrovírico u otro vector, etc.

El anticuerpo anti IL13 puede administrarse al mamífero de cualquier manera aceptable. Los métodos de introducción incluyen, pero sin limitación, las siguientes vías: intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural, por inhalación y vía oral. Los anticuerpos o las composiciones pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en embolada, por absorción, a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (p.ej., mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir los anticuerpos terapéuticos o las composiciones descritas en el presente documento en el sistema nervioso central por cualquier vía adecuada, incluyendo inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular facilitarse mediante un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, como un depósito de Ommaya.

La administración pulmonar también puede emplearse, p. ej., usando un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente aerosolizante. El anticuerpo también se puede administrar a los pulmones de un paciente en forma de una composición de polvo seco (Véase, p. ej., la patente de Estados Unidos N.º 6 514 496).

En un aspecto específico de la presente descripción, puede ser deseable administrar los anticuerpos terapéuticos o las composiciones de la invención localmente en la zona que necesite tratamiento; esto puede realizarse, por ejemplo, y no a modo de limitación, por infusión local, aplicación tópica, por inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante, siendo dicho implante un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas o fibras. Preferentemente, cuando se administra un anticuerpo descrito en el presente documento, se debe tener cuidado al usar materiales que la proteína no absorba.

En otra realización, el anticuerpo puede suministrarse en una vesícula, en particular en un liposoma (véase Langer, *Science* 249: 1527-1533 (1990); Treat et al., en *Liposomes in the Therapy of infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, págs. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, en el mismo, págs. 317-327; véase, en líneas generales, en el mismo).

5 En otro aspecto más de la presente descripción, el anticuerpo puede suministrarse en un sistema de liberación controlada. En una realización, se puede usar una bomba (véase Langer, citado anteriormente; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald et al., *Surgery* 88:507 (1980); Saudek et al., *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989)). En otro aspecto de la presente descripción, se pueden usar materiales poliméricos (véase *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Ratón, Fla. (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, J., *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61 (1983); véase también Levy et al., *Science* 228:190 (1985); During et al., *Ann. Neurol.* 25:351 (1989); Howard et al., *J. Neurosurg.* 71:105 (1989)). En otro aspecto más de la presente descripción, un sistema de liberación controlada se puede colocar cerca de la diana terapéutica.

15 En el presente documento también se describen composiciones farmacéuticas. Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo y un vehículo fisiológicamente aceptable. En un aspecto específico de la presente descripción, la expresión "fisiológicamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o indicado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "transportador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Dichos transportadores fisiológicos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un transportador preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también se pueden emplear como transportadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores de pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y transportadores tradicionales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir transportadores estándar tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. En "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin, se describen ejemplos de transportadores adecuados. Dichas composiciones contendrán una cantidad eficaz del anticuerpo, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de transportador para proporcionar la forma de administración adecuada al paciente. La formulación debe adaptarse al modo de administración.

40 En un aspecto de la presente descripción, la composición se formula de acuerdo con procedimientos habituales como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Normalmente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local, tal como lignocaína, para aliviar el dolor en el lugar de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran por separado o se mezclan en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo seco liofilizado o concentrado sin agua en un recipiente herméticamente cerrado, tal como una ampolla o una bolsita que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición se va a administrar mediante infusión, esta puede dispensarse con un frasco de infusión que contiene agua o solución salina estéril de calidad farmacéutica. Cuando la composición se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina para que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

50 En el presente documento también se describe un envase o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes cargados con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento. Opcionalmente, junto con dicho(s) recipiente(es) puede haber una información en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, cuya información refleja la aprobación por la agencia de la fabricación, uso o venta para la administración en seres humanos.

55 Además, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden conjugarse con diversas moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionucleótidos o toxinas. Véanse, p. ej., las publicaciones PCT WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; la patente de Estados Unidos N.º 5 314 995 y el documento EP 396 387. Un anticuerpo o fragmento del mismo puede conjugarse con un residuo terapéutico tal como una citotoxina, p. ej., un agente citostático o citocida, un agente terapéutico o un ion metálico radiactivo, p. ej., emisores alfa tales como, por ejemplo, <sup>213</sup>Bi. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, aunque sin limitación,

antimetabolitos (p. ej., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo, dscarbazina), agentes alquilantes (p. ej., mecloretamina, tioepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diamino-dicloro-platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (p. ej., daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (p. ej., dactinomicina (anteriormente actinomomicina), bleomicina, mitramicina y antramycin (AMC) y agentes antimetabólicos (p. ej., vincristina y vinblastina).

Se conocen bien técnicas para conjugar dichos residuos terapéuticos con anticuerpos, véanse, p. ej., Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery (2ª ed.)*, Robinson et al. (eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), págs. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), págs. 303-16 (Academic Press 1985) y Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* 62:119-58 (1982). De manera alternativa, un anticuerpo puede conjugarse con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo. (Véase, p. ej., Segal en la patente de Estados Unidos N.º 4 676 980.)

Los conjugados descritos en el presente documento pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada, el agente terapéutico o el residuo de fármaco no debe interpretarse como limitado a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el residuo de fármaco puede ser una proteína o un polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina, tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina de la difteria; una proteína tal como factor de necrosis tumoral,  $\alpha$ -interferón,  $\beta$ -interferón, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador del plasminógeno tisular, un agente apoptótico, p. ej., TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , AIM I (Véase la publicación internacional N.º WO 97/33899), AIM II (Véase la publicación internacional N.º WO 97/34911), ligando Fas (Takahashi et al., *Int Immunol.*, 6:1567-1574 (1994)), VEGF (Véase la publicación Internacional N.º WO 99/23105), un agente trombotico o un agente antiangiogénico, p. ej., angiostatina o endostatina; o, modificadores de la respuesta biológica, tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos ("GM-CSF"), factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF") u otros factores de crecimiento.

### 30 **Terapia genética basada en anticuerpos**

En otro aspecto de la presente descripción, como terapia génica para tratar, inhibir o prevenir una enfermedad o trastorno asociado a la expresión y/o actividad aberrante de IL13, se administran ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican anticuerpos o derivados funcionales de los mismos. Terapia génica se refiere a terapia realizada por la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. En este aspecto de la presente descripción, los ácidos nucleicos producen su proteína codificada que media un efecto terapéutico. Cualquiera de los métodos de terapia génica disponibles puede usarse de acuerdo con la presente descripción. A continuación se desvelan a métodos ejemplares.

Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, véase Goldspiel et al., *Clinical Pharmacy* 12:488-505 (1993); Wu y Wu, *Biotherapy* 3:87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596 (1993); Mulligan, *Science* 260:926-932 (1993); y Morgan y Anderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217 (1993); May, *TIBTECH* 11 (5):155-215 (1993).

En un aspecto, el compuesto comprende secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo, siendo dichas secuencias de ácido nucleico parte de vectores de expresión que expresan el anticuerpo o fragmentos o proteínas quiméricas o cadenas pesadas o ligeras de los mismos en un hospedador adecuado. En particular, dichas secuencias de ácido nucleico tienen promotores unidos operativamente a la región codificantes de anticuerpo, siendo dicho promotor inducible o constitutivo, y, opcionalmente, específico de tejido.

En otro aspecto particular de esta descripción, se usan moléculas de ácido nucleico en las que las secuencias codificantes de anticuerpos y cualquier otra secuencia deseada, están flanqueadas por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando así expresión intracromosómica de los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo (Koller y Smithies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8932-8935 (1989); Zijlstra et al., *Nature* 342:435-438 (1989). En aspectos específicos de esta descripción, la molécula de anticuerpo expresada es un anticuerpo monocatenario; de manera alternativa, las secuencias de ácido nucleico incluyen secuencias que codifican tanto las cadenas pesadas como las ligeras, o sus fragmentos, del anticuerpo.

El suministro de los ácidos nucleicos a un paciente puede ser directo, en cuyo caso el paciente está expuesto directamente al ácido nucleico o a los vectores portadores de ácido nucleico, o indirectamente, en cuyo caso, las células se transforman primero con los ácidos nucleicos *in vitro*, y después de trasplantan al paciente. Estas dos estrategias se conocen, respectivamente, como terapia génica *in vivo* o *ex vivo*.

En un aspecto específico de esta descripción, las secuencias de ácido nucleico se administran directamente *in vivo*,

en donde se expresan para producir el producto codificado. Esto puede realizarse mediante cualquiera de los numerosos métodos conocidos en la técnica, p. ej., construyéndolas como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolas para que se vuelvan intracelulares, p. ej., por infección, usando retrovíricos defectuosos o atenuados u otros vectores víricos (véase la patente de Estados Unidos N.º 4 980 286), o por inyección directa de ADN desnudo, o usando bombardeo de micropartículas (p. ej., una pistola de genes; Biolistic, Dupont), o recubriendo con lípidos o receptores de la superficie celular o agentes transfectantes, encapsulación en liposomas, micropartículas o microcápsulas, o administrándolas en conexión con un péptido que se sabe que entra en el núcleo, administrándolo en conexión con un ligando sujeto a endocitosis mediada por receptores (véase, p. ej., Wu y Wu, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432 (1987)) (que puede usarse para dirigirse a tipos de células que expresan específicamente los receptores), etc. En otro aspecto de esta descripción, se pueden formar complejos de ácido nucleico-ligando en los que el ligando comprende un péptido vírico fusogénico para alterar endosomas, permitiendo que el ácido nucleico evite la degradación lisosómica. En otro aspecto más de esta descripción, el ácido nucleico puede dirigirse *in vivo* para la absorción y expresión específica de la célula, dirigiéndose a un receptor específico (véanse, p. ej., las publicaciones PCT WO 92/06180; WO 92/22635; WO92/20316; WO93/14188, WO 93/20221). De manera alternativa, el ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse en el ADN de la célula hospedadora para la expresión, por recombinación homóloga (Koller y Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8932-8935 (1989); Zijlstra et al., Nature 342:435-438 (1989)).

En un aspecto específico de esta descripción, se usan vectores víricos que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo descrito en el presente documento. Por ejemplo, se puede usar un vector retrovírico (véase Miller et al., Meth. Enzymol. 217:581-599 (1993)). Estos vectores retrovíricos contienen los componentes necesarios para el correcto empaquetamiento del genoma vírico y la integración en el ADN de la célula hospedadora. Las secuencias de ácido nucleico que codifican el anticuerpo que se utilizará en la terapia génica se clonan en uno o más vectores, lo que facilita el suministro del gen a un paciente. Se pueden encontrar más detalles sobre vectores retrovíricos en Boesen et al., Biotherapy 6: 291-302 (1994), que describe el uso de un vector retrovírico para suministrar el gen *mdr1* a las células madre hematopoyéticas para hacer que las células madre sean más resistentes a la quimioterapia. Otras referencias que ilustran el uso de vectores retrovíricos en terapia génica son: Clowes et al., J. Clin. Invest. 93:644-651 (1994); Kiem et al., Blood 83:1467-1473 (1994); Salmons y Gunzberg, Human Gene Therapy 4:129-141 (1993); y Grossman y Wilson, Curr. Opin. Gen. y Dev. 3:110-114 (1993).

También pueden usarse adenovirus de acuerdo con la presente descripción. Los adenovirus son vehículos especialmente atractivos de acuerdo con la presente descripción para suministrar anticuerpos a epitelios respiratorios. Los adenovirus infectan naturalmente los epitelios respiratorios. Otras dianas para los sistemas de suministro basados en adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, las células endoteliales y la musculatura. Los adenovirus tienen la ventaja de ser capaces de infectar células que no se dividen. Kozarsky y Wilson, Curr. Opin. Gen. Dev. 3: 499-503 (1993) presentan una revisión de terapia génica basada en adenovirus. Bout et al., Human Gene Therapy 5: 3-10 (1994) demostraron el uso de vectores de adenovirus para transferir genes a los epitelios respiratorios de los monos *Rhesus*. Otros ejemplos del uso de adenovirus en terapia génica se pueden encontrar en Rosenfeld et al., Science 252:431-434 (1991); Rosenfeld et al., Cell 68:143-155 (1992); Mastrangeli et al., J. Clin. invest. 91:225-234 (1993); en la publicación PCI W094/12649; y en Wang et al., Gene Therapy 2:775-783 (1995). También se han propuesto virus adenoasociados (AAV) para su uso en terapia génica (Walsh et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 (1993); patentes de Estados Unidos N.º 5 436 146; 6.632.670; 6.642.051).

Otra estrategia de terapia génica implica transferir un gen a las células en cultivo de tejidos mediante métodos tales como electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato de calcio o infección vírica. Habitualmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las células. Después, las células se colocan bajo selección para aislar aquellas células que se han incorporado y están expresando el gen transferido. Después, esas células se suministran a un paciente.

En este aspecto de la presente descripción, el ácido nucleico se introduce en una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. Dicha introducción puede llevarse a cabo por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector vírico o bacteriófago que contenga las secuencias de ácido nucleico, fusión celular, transferencia de genes mediada por cromosomas, transferencia de genes mediada por microcélulas, fusión de esferoplastos, etc. En la técnica se conocen numerosas técnicas para la introducción de genes exógenos en las células (véase, p. ej., Loeffler y Behr, Meth. Enzymol. 217:599-618 (1993); Cohen et al., Meth. Enzymol. 217:618-644 (1993); Cline, Pharmac. Ther. 29:69-92m (1985) y pueden usarse de acuerdo con la presente invención, siempre que no se alteren las funciones fisiológicas y de desarrollo necesarias de las células receptoras. La técnica debería permitir la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de modo que la célula pueda expresar el ácido nucleico y que preferiblemente pueda heredarlo y expresarlo su descendencia.

Las células recombinantes resultantes pueden suministrarse a un paciente mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Preferentemente, las células sanguíneas recombinantes (p. ej., células madre hematopoyéticas o progenitoras) se administran por vía intravenosa. La cantidad de células previstas para su uso depende del efecto deseado, del estado del paciente, etc., y puede determinarla un experto en la materia.

Las células en las que puede introducirse un ácido nucleico con fines de terapia génica incluyen cualquier tipo de

célula deseada, disponible, e incluye, pero sin limitación, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, miocitos, hepatocitos; células sanguíneas tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; diversas células madre o progenitoras, en particular, células madre hematopoyéticas o progenitoras, p. ej., como las obtenidas de la médula ósea, sangre del cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, etc.

En un aspecto de la presente descripción, la célula utilizada para la terapia génica es autóloga para el paciente. Las secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo descrito en el presente documento se introducen en las células de modo que las células o su descendencia puedan expresarlas, y después las células recombinantes se administran *in vivo* para determinar su efecto terapéutico. En un aspecto específico de la presente descripción, se utilizan células madre o progenitoras. Cualquier célula madre y/o progenitora que pueda aislarse y conservarse *in vitro* puede usarse en potencia de acuerdo con este aspecto de la presente descripción (véase, p. ej., la publicación PCT WO 94/08598; Stemple y Anderson, Cell 71:973-985 (1992); Rhelnwald, Meth. Cell Bio. 21A:229 (1980); y Pittelkow y Scott, Mayo Clinic Proc. 61:771 (1986)).

## Ejemplos

### Ejemplo 1:

#### Preparación de inmunógeno IL13; una IL13/Fc humana, mutada e inactiva (MT-IL13/Fc)

##### A. Clonación y construcción de un plásmido de expresión para MT-IL13/Fc

Se informó que la IL13 humana con una mutación (ácido glutámico a lisina) en el resto de aminoácido nº 13, se unió con la misma afinidad o más alta a IL13R $\alpha$ 1, pero que había perdido la capacidad de activar las células portadoras de IL13R $\alpha$ 1 (Thompson et al., J. Biol. Chem., 274: 29944 (1999)). Esta IL13 mutada e inactiva, denominada MT-IL13, se expresó en células embrionarias de riñón embrionario 293-T. En la presente invención, la proteína recombinante purificada se usó como inmunógeno para generar anticuerpos monoclonales anti IL13. Dos cebadores oligonucleotídicos:

5' AAGCTTCCCCAGGCCCTGTGCCTCCCTCTACAGCCCTCAGGAAGCTCAT3' (SEQ ID NO 9)

5' CTCGAGGTTGAACCGTCCCTCGCGAAAAAG 3' (SEQ ID NO 10)

correspondientes a la secuencia de oligonucleótidos del gen de MT-IL13, se sintetizaron y se usaron como moldes en reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) para fabricar el gen de IL13 a partir de la biblioteca de ADNc de testículo humano (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA). El fragmento de PCR (342 pares de bases) que carecía de la secuencia de péptido señal predicha de IL13 se ligó en el vector pSecTag/FRT (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contenía una secuencia de péptido señal de secreción en el extremo 5' y una secuencia Fcy1 humana (bisagra y regiones constantes CH2 y CH3) en el extremo 3'. La composición de la construcción se confirmó por secuenciación.

##### B. Producción de MT-IL13/Fc a partir de células 293T transfectadas

Para la expresión transitoria de MT-IL13/Fc, se transfectó ADN plasmídico purificado en células 293T mediante Lipofectamine 2000 (Invitrogen), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Setenta y dos horas (72) después de la transfección, se recogieron sobrenadantes de cultivo de las células transfectadas para la purificación. Para la expresión estable de MT-IL13/Fc, las líneas celulares se establecieron usando una línea celular Flp-In 293T (Invitrogen). Para confirmar la expresión, los sobrenadantes de cultivo se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se detectaron por reacción con anticuerpo monoclonal de ratón anti IgG (Fc) humana conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP, *horseradish peroxidase*) (Sigma, St. Louis, MO) o con anticuerpos policlonales de cabra anti IL13 (R&D Systems, Minneapolis, MN), que después se detectaron con anticuerpo de burro anti IgG de cabra conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Las proteínas inmunorreactivas se identificaron en la película, utilizando detección con quimioluminiscencia potenciada (sustrato quimioluminiscente de Supersignal West Pico, Pierce, Rockford, IL).

##### C. Purificación de MTIL13/Fc

La MT-IL13/Fc se purificó en columna de afinidad con proteína A hiper-D (Invitrogen) equilibrada con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después de aplicar el sobrenadante de cultivo celular a la columna, la resina se lavó con más de 20 volúmenes de columna de PBS. Después, para eliminar las proteínas no unidas, la resina se lavó con tampón SCC (citrato de sodio 0,05 M, cloruro de sodio 0,5 M, pH 6,0). A continuación, las proteínas de fusión IL13 se eluyeron (citrato de sodio 0,05 M, cloruro de sodio 0,15 M, pH 3,0) y se dializaron en PBS.

Las fracciones de la columna de afinidad que contenían MT-IL13/Fc se analizaron mediante SDS-PAGE. La pureza de las proteínas se analizó mediante tinción con azul de Coomassie y la identidad de las proteínas mediante inmunotransferencia de Western usando anticuerpo de cabra anti IgG humano (Fc) (Sigma) y anticuerpo de cabra anti IL13 humano (R&D Systems) como se describió anteriormente.

**Ejemplo 2:****Generación de anticuerpos monoclonales anti IL13**

Ratones macho A/J (Harlan, Indianápolis, IN), de 8 a 12 semanas de vida, recibieron inyección subcutánea de 20 µg de MT-IL13/Fc en adyuvante completo de Freund (Difco Laboratories, Detroit, MI) en 200 µl de PBS a un pH de 7,4. A intervalos de dos semanas, los ratones recibieron dos inyecciones subcutáneas de 20 µg de MT-IL13/Fc en adyuvante incompleto de Freund. Después, dos semanas más tarde y tres días antes del sacrificio, los ratones recibieron nuevamente una inyección intraperitoneal de 20 µg del mismo inmunógeno en PBS. Para la fusión se usaron esplenocitos aislados de uno o más ratones inmunizados con antígeno. También se usaron procedimientos similares de inmunización y fusión con IL13 humana expresada en *E. coli* (R&D Systems) como inmunógeno.

En la fusión que condujo a la generación del AcM anti IL13 228B/C-1, se combinaron  $26,4 \times 10^6$  esplenocitos y  $58,8 \times 10^6$  esplenocitos de dos ratones inmunizados. Para cada fusión, se prepararon suspensiones celulares individuales del bazo de ratones inmunizados y se usaron para la fusión con células de mieloma Sp2/0. Las células Sp2/0 y los esplenocitos se fusionaron a una proporción de 1:1 en un medio que contenía polietilenglicol al 50 % (P.M. 1450) (Kodak, Rochester, NY) y dimetilsulfóxido al 5 % (Sigma). Las células se ajustaron después a una concentración de  $1,5 \times 10^5$  esplenocitos por 250 µl de la suspensión en medio DMEM (Invitrogen, CA), complementado con suero bovino fetal al 10 %, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, hipoxantina 0,1 mM, aminopterinina 0,4 µM y timidina 16 µM. A cada pocillo de aproximadamente cincuenta placas de microcultivo de 96 pocillos, se añadieron doscientos cincuenta microlitros de la suspensión celular. Después de aproximadamente diez días, los sobrenadantes de cultivo se retiraron para explorar la reactividad con MT-IL13/Fc en un ensayo ELISA.

Durante una noche, pocillos de placas microtest Immulon 2 (Dynatech Laboratories, Chantilly, VA) se revistieron añadiendo MT-IL13/Fc purificada (0,1 µg/ml) a temperatura ambiente. Después de retirar la solución de recubrimiento girando la placa, a cada pocillo se añadieron 200 µl de un tampón bloqueante/diluyente (PBS que contenía seroalbúmina bovina al 2 % y TWEEN® 20 al 0,05 %) durante una hora para bloquear los sitios inespecíficos. Una hora después, los pocillos se lavaron con tampón PBST (PBS que contenía TWEEN® 20 al 0,05 %). Se recogieron cincuenta microlitros de sobrenadante de cultivo de cada pocillo de fusión, se mezclaron con 50 µl del tampón bloqueante/diluyente y después se añadieron a los pocillos individuales de las placas de *Microtest*. Al cabo de una hora de incubación, los pocillos se lavaron con PBST. Después, los anticuerpos murinos unidos se detectaron por reacción con anticuerpos de cabra anti IgG (específica de Fc) de ratón conjugados con HRP (específica de Fc) (Jackson ImmunoResearch Lab, West Grove, PA) y se diluyeron a 1:2 000 con el tampón bloqueante/diluyente. Para el revelado del color, durante 30 minutos, a los pocillos se añadió solución de sustrato de peroxidasa que contenía 3,3,5,5 tetrametilbencidina (Sigma, St. Louis, MO) al 0,1 % y peróxido de hidrógeno (Sigma) al 0,003 %. La reacción finalizó añadiendo, a cada pocillo, 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. La DO<sub>450</sub> de la mezcla de reacción se midió con un lector BioTek ELISA (BioTek Instruments, Winooski, VM).

Después, los sobrenadantes de cultivo de los pocillos positivos de la exploración de MT-IL13/Fc, se analizaron para determinar la unión negativa a una proteína de fusión Fy1 irrelevante. Después, mediante dilución limitante, se seleccionaron pocillos positivos finales para la clonación de células individuales. Los sobrenadantes de cultivo de anticuerpos monoclonales se volvieron a analizar para confirmar su reactividad mediante ensayo ELISA. Los hibridomas seleccionados se cultivaron en matraces giratorios y el sobrenadante de cultivo gastado se recogió para la purificación de anticuerpos mediante cromatografía de afinidad con proteína A.

Los anticuerpos purificados se analizaron mediante cuatro ensayos: i) Reactividad cruzada de MT-IL13/FC, expresada en células 293T, con IL13 de ratón, expresada en *E. coli*; ii) Inhibición de la proliferación autocrina, inducida por IL13, de células HDLM-2 y L-1236; iii) Inhibición de la fosforilación de STAT6, inducida por IL13, en células THP-1; y iv) inhibición de la expresión de CD14 y CD23 regulada por IL13 en monocitos humanos.

De las fusiones realizadas en ratones inmunizados con MT-IL13/Fc e IL13, se obtuvieron setenta y tres AcM anti IL13. Para la caracterización, treinta y nueve de estos AcM se purificaron mediante ensayo ELISA y ensayos basados en células. Trece de estos 39 AcM inhibieron la proliferación autocrina, inducida por IL13, de células HDLM-2 y L-1236 (véase la descripción del ensayo y los resultados en el Ejemplo 5). En un ensayo ELISA, se descubrió que cuatro de los AcM eran muy reactivos con la IL13 humana y que se neutralizaban contra la IL13 humana en ensayos funcionales basados en células. Estos AcM se denominaron 228B/C-1, 228A-4, 227-26 y 227-43. Todos estos anticuerpos se generaron usando, como inmunógeno, MT-IL13/FC glucosilada.

**Ejemplo 3:****Reactividad de anticuerpos monoclonales anti IL13 con IL13 humana y de ratón en ELISA**

La reactividad de varios anticuerpos monoclonales anti IL13 se probó mediante un ELISA. Diferentes pocillos de placas de microtest de 96 pocillos, se revistieron con IL13 humana no glucosilada expresada en *E. coli* (R&D Systems), con MT-IL13/FC glucosilada expresada en células 293T o con IL13 de ratón expresada en *E. coli* (R&D Systems) mediante la adición de 100 µl de proteína IL13 a 0,1 µg/ml en PBS. Después de incubar durante una noche a temperatura ambiente, los pocillos se trataron con PBSTB (PBST que contenía BSA al 2 %) para saturar los sitios de unión restantes. Después, los pocillos se lavaron con PBST.

A los pocillos se añadieron cien microlitros de AcM anti IL13 diluidos en serie con factor 2 (de 0,5 µg/ml (3,33 nM) a 0,05 ng/ml (0,00033 nM)) durante 1 hora a temperatura ambiente. Como control positivo también se analizó un AcM anti IL13, JES-5A2, de BD Biosciences-Pharmingen, San Diego, CA. Este anticuerpo se generó usando como inmunógeno IL13 humana expresada en *E. coli*. Como control negativo irrelevante se usó un AcM de ratón anti gp120 del VIH-1 del mismo isotipo. Después, los pocillos se lavaron con PBST. El anticuerpo unido se detectó incubando, durante 1 hora a temperatura ambiente, con anticuerpos de cabra anti IgG (Fc) de ratón conjugados con HRP diluidos (Jackson ImmunoResearch). Después se añadió solución de sustrato de peroxidasa para el revelado del color como se ha descrito anteriormente. La DO<sub>450</sub> se midió usando un lector de ensayo ELISA.

La figura 1 muestra la unión dependiente de la dosis de los AcM anti IL13, 228B/C-1, 228A-4, 227-26, 227-43, y el control negativo en ELISA. Entre estos AcM, 228B/C-1 mostró la reactividad más fuerte. La figura 2 muestra la unión dependiente de la dosis de los AcM anti IL13 con MT-IL13/Fc en un ensayo ELISA. Los anticuerpos 228B/C-1 y 228A-4 mostraron la reactividad más fuerte con MT-IL13/Fc, mientras que 227-26 y 227-43 mostraron reactividad moderada.

Las figuras 1 y 2 muestran que, entre todos los AcM anti IL13 analizados, el anticuerpo 228B/C-1 es el que tiene mayor afinidad por la IL13 humana tanto glucosilada como no glucosilada. Ninguno de estos AcM anti IL13 reaccionaron en cruzado con la IL13 de ratón en un ensayo ELISA (datos no mostrados).

#### Ejemplo 4

##### Ausencia de competencia de unión de 228B/C-1-Hrp con IL13 humana mediante JES10-5A2

Para determinar si JES10-5A2 y 228B/C-1 se unían al mismo epítipo en la IL13 humana, se usó un ensayo ELISA de competencia para examinar el efecto de JES10-5A2 sobre la unión de 228B/C-1-HRP con la IL13 humana expresada en *E. coli*. Cada uno de los pocillos de las placas de microtest de 96 pocillos se incubó con 100 µl de proteína IL13 a 0,1 µg/ml en PBS. Después de incubar durante una noche a temperatura ambiente, los pocillos se trataron con PBSTB (PBST que contenía BSA al 2 %) para saturar los sitios de unión restantes. Después, los pocillos se lavaron con PBST. Cincuenta microlitros de 228B/C-1 y JES10-5A2 diluidos dos veces en serie (a partir de una concentración final de 20 µg/ml a 9,76 ng/ml) se mezclaron con 50 µl de 228B/C-1-HRP previamente titulado (a una dilución de 1:6 400). Después, se añadieron las mezclas a los pocillos y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se añadió solución de sustrato de peroxidasa para el revelado del color como se ha descrito anteriormente. La DO<sub>450</sub> se midió usando un lector de ensayo ELISA.

La figura 3 demuestra que JES10-5A2 no compite con la unión de 228B/C-1-HRP a la IL13 humana, lo que indica que 228B/C-1 y JES10-5A2 se unen a diferentes sitios en la IL13 humana.

#### Ejemplo 5

##### Exploración de anticuerpos monoclonales neutralizantes anti IL13 mediante un ensayo de proliferación autocrina, dependiente de IL-13, usando células L-1236 y HDLM-2.

L-1236 y HDLM-2 son líneas celulares de linfoma de Hodgkin procedentes de la colección alemana de microorganismos y cultivos celulares (DSMZ, Brunswick, Alemania). Estas líneas celulares producen IL13 que, a su vez activa, su proliferación celular de una manera autocrina (Kapp U et al., J. Exp. Med. 189:1939 (1999)).

Durante 3-5 días, las células (25 000 células/pocillo), se cultivaron en presencia o en ausencia de diferentes AcM anti IL13 (0,2, 0,02 y 0,002 µg/ml) en CO<sub>2</sub> al 5 % a una temperatura de 37<sup>o</sup> C. Después, la proliferación celular se midió o bien mediante un ensayo usando el compuesto de tetrazolio MTS (Promega, Madison, WI) (lecturas a DO<sub>490</sub>) o mediante la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Se esperaba que la adición de un AcM neutralizante anti IL13 al cultivo de estas líneas celulares, inhibiera su proliferación mediante la unión e inactivación de la IL13 producida por estas células. Los resultados ilustrados en la Figura 4 muestran el efecto del AcM anti IL13 de la presente invención sobre la proliferación de células L-1236. Entre los anticuerpos neutralizantes analizados, el AcM 228B/C-1 fue el más fuerte inhibiendo la proliferación de células L-1236 de una manera dependiente de la dosis. TA1-37 (un AcM anti IL13 generado usando como inmunógeno IL13 humana expresada en *E. coli*) no tuvo ninguna actividad inhibitoria incluso a una dosis tan alta como 0,2 µg/ml. Se obtuvieron resultados similares con células HDLM-2.

#### Ejemplo 6

##### Ensayo para la expresión de CD14 y CD23, regulada por IL13, en monocitos humanos primarios

La IL13 induce la supresión de la expresión de CD14 y la regulación positiva de la expresión de CD23 en los monocitos humanos (de Waal Malefyt et al., J. Immunol., 151: 6370(1993), Chomarat et al., Int. Rev. Immunol., 17:1 (1998)). Se aislaron leucocitos de sangre periférica (LSP) de sangre entera heparinizada, recién extraída de donantes humanos sanos, por centrifugación en gradiente de densidad en Histopaque-1077 (Sigma). A cada uno de los pocillos de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos que contenía IL13 recombinante (concentración final de 10 ng/ml = 0,813 nM) y un anticuerpo monoclonal anti IL13 o un anticuerpo irrelevante (diluciones en serie con factor 3, a partir de una

concentración final de 12 µg/ml = 80 nM), se añadieron los LSP ( $1,5 \times 10^6$ ) suspendidos en medio RPMI-1640 (Invitrogen) con suero fetal bovino al 5 %. La adición de IL13 humana 0,813 nM al medio de incubación, hizo que la expresión de CD14 o de CD23 en los monocitos, se suprimiese o se regulase positivamente, respectivamente. El medio de control contenía medio RPMI-1640/FBS sin IL13 recombinante.

5 Las células se incubaron en CO<sub>2</sub> al 5 % a 37° C durante 2 días. Las células se recogieron para su tinción con anti CD14-FITC o anti CD23-PE (BD Biosciences-Pharmingen). Los niveles de expresión de CD14 y CD23 en la población de monocitos, se midieron por citometría de flujo y se representaron a través de la intensidad media de fluorescencia (IMF).

10 En la figura 5 se representan los efectos de los AcM anti IL13 sobre la supresión de la expresión de CD14, inducida por IL13, en monocitos humanos. Entre todos los AcM anti IL13 sometidos a ensayo, el AcM 228B/C-1 fue el más fuerte inhibiendo el efecto de IL13 sobre la expresión de CD14. La inhibición completa del efecto de IL13 se consiguió a 0,33 nM. Las actividades inhibitoras de los AcM 227-26 y 228A-4 fueron moderadas, mientras que la de JES10-5A2 fue débil. El efecto de IL13 no pudo inhibirse completamente con JES10-5A2 incluso a 80 nM.

15 En la figura 6 se representan los efectos de los AcM anti IL13 sobre la regulación positiva de CD23 inducida por IL13 en monocitos humanos. Similar a los resultados sobre la expresión de CD14 (figura 5), entre todos los AcM anti IL13 sometidos a ensayo, el anticuerpo 228B/C-1 fue el más fuerte inhibiendo el efecto de IL13 sobre la expresión de CD23. La inhibición completa mediante el AcM 228B/C-1 se consiguió a una concentración de 0,33 nM. La fuerza inhibitora de JES10-5A2 fue débil.

20 Basándose en los resultados presentados en las figuras 5 y 6, la inhibición completa de IL13 por 228B/C-1 se puede conseguir a una relación molar estequiométrica de 1:2 (AcM:IL13), y por lo tanto, el AcM 228B/C-1 es un AcM neutralizante con afinidad muy alta contra la IL13 humana.

### Ejemplo 7

#### Ensayo de la fosforilación de STAT6, inducida por IL13, en células THP-1

25 La IL13 puede activar la línea celular mieloide THP-1 (ATCC, Manassas, VA) para inducir la fosforilación de STAT6, que es una etapa crítica en la ruta de transducción de señales de IL13 (Murata T et al., Int. Immunol. 10: 1103-1110 (1998). En este ensayo, los AcM anti IL13 se analizaron con respecto a la inhibición de IL13.

30 Las células THP-1 se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Invitrogen) complementado con suero bovino fetal al 5 %. El día de los experimentos, las células se lavaron y se incubaron durante 2 horas en DMEM sin suero a 37° C en CO<sub>2</sub> al 5 %. Después, a cada uno de los pocillos de una placa de fondo redondo de 96 pocillos, se añadieron  $0,3 \times 10^6$  células en 80 µl del medio sin suero. Ciento veinte microlitros de medio contienen IL13 humana (concentración final de 10 ng/ml = 0,813 nM) y los AcM anti IL13 (diluciones en serie con factor 5, a partir de una concentración final de 0,5 µg/ml = 3,333 nM). Los pocillos de control negativo no contienen IL13 ni IL13 y un AcM de ratón irrelevante del mismo isotipo.

35 Las mezclas se incubaron a 37° C con CO<sub>2</sub> al 5 % durante 10 min. Después, las placas se centrifugaron a 300 x g durante 3 minutos a 4° C. Después de desechar el sobrenadante, los sedimentos celulares se resuspendieron en 100 µl de tampón de muestra no reductor de Laemmli (tampón de carga de SDS-PAGE, BioRad, CA) y después se transfirieron a tubos de microcentrifuga. Los tubos se calentaron a 95° C durante 5 minutos y después se centrifugaron a 10 000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se recogieron y analizaron mediante SDS-PAGE a un gradiente del 4-20 %. Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de PVDF que después se incubó con el AcM de ratón anti Stat6 humano (Y641, específico de fosforilación) diluido (BD Biosciences Pharmingen).

45 El anticuerpo unido se detectó con anticuerpos de cabra anti IgG (Fc) de ratón conjugados con HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Las proteínas inmunorreactivas se identificaron en la película, usando detección con quimioluminiscencia potenciada (sustrato quimioluminiscente de Supersignal West Pico Pierce). La figura 7 representa los resultados del efecto de los AcM anti IL13 sobre la fosforilación de Stat6, inducida por IL13, en células THP-1. En células THP-1 tratadas con IL13 humana 0,813 nM, Stat6 está fosforilado. La inhibición, dependiente de la dosis, de la fosforilación de Stat6, se descubrió cuando las células se trataron con los AcM 228B/C-1, 228A-4, 227-26, 227-43 y JES10-5A2. Entre los AcM anti IL13 analizados, el AcM 228B/C-1 resultó ser el anticuerpo neutralizante más fuerte. La inhibición completa mediante el AcM 228B/C-1 se consiguió a una concentración entre 0,667 nM y 0,133 nM. La relación molar estequiométrica aproximada entre 228B/C-1 e IL13 para la inhibición completa fue de 1: 2. Esto es coherente con los datos mostrados en las figuras 5 y 6.

### Ejemplo 8

#### Clonación molecular de genes de cadena pesada y ligera que codifican anticuerpos monoclonales anti IL13

55 Usando un kit de QIAGEN (Valencia, CA), se aisló ARN total de células de hibridoma. La reacción de transcripción inversa (ADNc de primera cadena) se llevó a cabo de la siguiente manera: se mezclaron 1-1,5 mg de ARN total con

1 ml de los dNTP 10 mM, 50 ng de hexámeros aleatorios y agua sin RNasa en un volumen final de 12 ml.

La mezcla de reacción se incubó durante 5 minutos a 65° C y se puso inmediatamente en hielo durante 1 minuto. Después de una breve centrifugación, se añadieron los siguientes reactivos; 4 ml de tampón de primera cadena 5X (Tris-HCl 250 mM, pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM), 2 ml de DTT 0,1 mM y 1 ml de inhibidor de RNasa RNaseOUT (40 U/ml). Después de mezclar, la reacción se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos. Después, a la mezcla, se añadió un mililitro de TI (transcriptasa inversa) Superscript II (50 U/ml) para una incubación a 25° C durante 10 minutos, seguido de 50 minutos a 42° C. Tras una breve centrifugación, la reacción se incubó durante 15 minutos a 70° C para inactivar la transcriptasa inversa. Después, para destruir el ARN, se añadió un microlitro de RNasa H (2 U/ml) y la reacción se incubó durante 20 minutos a 37° C.

Para amplificar las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras, se usó un método descrito por O'Brien y Jones (O'Brien S. and Jones T., "Humanizing antibodies by CDR grafting", Antibody Engineering, Springer Lab manual, Eds, Kontermann y Duble, S (2001)). En resumen, los cebadores 5' se seleccionaron de la región del péptido señal (11 conjuntos para la cadena ligera y 12 conjuntos de cebadores degenerados para la cadena pesada) y los cebadores 3' se seleccionaron de la región constante de la cadena ligera o pesada. Los cebadores 5' y 3' (1,5 ml de 10 mM) se mezclaron con 5 ml de tampón de PCR 10X (Tris-HCl 250 mM, pH 8,8, MgSO<sub>4</sub> 20 mM, KCl 100 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 100 mM, Triton X-100 al 1 %, BSA sin nucleasa 1 mg/ml), 1 ml de ADNc preparado previamente, 1 ml de ufp Turbo (Stratagene) y agua para ajustar el volumen total de la reacción a 50 ml. La PCR se realizó de la siguiente manera: 1 ciclo a 94° C durante 4 minutos; 25 ciclos a 94° C durante 30 segundos, a 53° C durante 30 segundos, y a 72° C durante 45 segundos; y 1 ciclo a 72° C durante 7 minutos. Las mezclas de reacción se resolvieron por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %.

El fragmento de ADN amplificado se purificó y se clonó en un vector pcDNA3.1. La clonación se llevó a cabo utilizando el kit de clonación de Invitrogen TOPO siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante (Invitrogen). Para la purificación de los plásmidos se utilizaron entre quince y veinte colonias de *E. coli* transformada. Los plásmidos se secuenciaron usando un cebador de T7. Las secuencias predominantes para las cadenas pesada y ligera se clonaron en un vector de expresión Fab M13 mediante mutagénesis de hibridación (Glaser S. et al. Antibody Engineering (Oxford University Press, Nueva York (1995)), Near RI, BioTechniques 12: 88 (1992)). Las propiedades de unión del fragmento Fab expresado se confirmaron mediante un ensayo ELISA. Las Figuras 8-10 representan las secuencias de aminoácidos de las cadenas VH y VL de 228B/C, 228A-4 y 227-26, respectivamente.

### Ejemplo 9

#### Humanización del clon 228B/C

##### A. Protocolo general

Las regiones variables del anticuerpo murino 228B/C se clonaron y secuenciaron como se describe en el Ejemplo 8. Se construyó un Fab quimérico en un vector de fago como control que combinaba las regiones variables del 228B/C murino y la región constante de la cadena kappa humana y la parte CH1 de la IgG humana.

Para comenzar el proceso de humanización, se seleccionó una secuencia de genes v adecuada seleccionada de secuencias de genes de línea germinal humana conocidas para proporcionar las regiones estructurales una a tres (FM1-FM3), y se seleccionó una secuencia de genes J adecuada para proporcionar la región estructural 4 (FM4) de acuerdo con los criterios descritos en el documento WOO4/070010. Este molde se puede elegir basándose, p. ej., en su longitud total comparativa, en el tamaño de las CDR, en los restos de aminoácidos ubicados en la unión entre las regiones estructurales y las CDR, en la homología general, etc. El molde elegido puede ser una mezcla de más de una secuencia o puede ser un molde consenso.

La construcción de un vector de expresión que comprende las variantes de cadena pesada y/o ligera generadas comprendió las fórmulas:

FRH1 -CDRH1 -FRH2-CDRH2-FRH3-CDRH3-FRH4(i) y

FRL1-CDRL1-FRL2-CDRL2-FRL3-CDRL3-FRL4 (ii),

en donde FRH1, FRH2, FRH3, FRH4, FRL1, FRL2, FRL3 y FRL4, representan las variantes de las secuencias de cadena pesada y ligera del molde de las regiones estructurales elegidas de los moldes de línea germinal y las CDR representan las del anticuerpo precursor. Se determinó que las diferencias entre el anticuerpo precursor murino y las secuencias de molde humanas seleccionadas servían como base para generar una biblioteca de Fab de anticuerpos. Esta biblioteca se puede generar individualmente para la cadena ligera y después simultáneamente para la cadena pesada. La maduración por afinidad de las regiones CDR también se puede analizar de manera simultánea o secuencial con la humanización de las regiones estructurales.

Se generó la biblioteca de Fab variantes que contenía (1) el resto de aminoácido murino, (2) el resto de aminoácido del gen de la línea germinal humana elegido, u opcionalmente, (3) un aminoácido seleccionado al azar, en cada una de las posiciones seleccionadas encontradas que diferían de la secuencia estructural murina. Las variantes deseadas

se generaron apareando oligonucleótidos solapantes e incorporando después el resto elegido en las posiciones estructurales que eran de interés. Usando dos cebadores, se realizó una amplificación del producto emparejado, estando, uno de los cebadores, marcado con biotina. La etiqueta de biotina se usó para la purificación de una cadena sencilla del cebador y se usó como un oligo mutagénico en una reacción de mutagénesis basada en Kunkel usando el vector de interés en un formato de molde en U (Rosok, M. J. *et al.*, (1996) *Journal of Biological Chemistry* 271: 22611-22618). Después de aparear y alargar el plásmido, la reacción se sometió a digestión con una enzima de restricción exclusiva, XbaI, que escinde el molde original pero no la cadena mutada recién sintetizada. El plásmido se sometió a electroporación en células competentes para la amplificación y para la generación de partículas de fago se mezcló con un tipo de célula de *E. coli* competente de fago. Las construcciones de plásmidos pueden sintetizar un Fab que se secreta en el sobrenadante. Se seleccionaron placas individuales y el anticuerpo se eluyó para el análisis.

La biblioteca se analizó con respecto a su calidad e integridad. Al secuenciar una muestra aleatoria de la biblioteca, se determinó el número de candidatos seleccionados que tenían la inserción correcta de la región Vk (o Vh). Este número se usó para determinar la eficacia global de la biblioteca. Una vez que se estableció la biblioteca, los candidatos se exploraron utilizando un ensayo funcional basado en ELISA para determinar qué candidatos producían Fab funcionales específicos para IL-13. Los candidatos que demostraron actividad para IL-13 comparable a la del clon quimérico, se analizaron adicionalmente con respecto a la reproducibilidad. Varios de los candidatos se secuenciaron para determinar cómo de tolerantes eran las posiciones estructurales diana para la humanización.

Después de que se descubriera que las bibliotecas eran representativas, las variantes se analizaron para determinar la afinidad de unión, y las que se encontró que tenían una afinidad de unión comparable o mayor que el anticuerpo de control quimérico se secuenciaron. Si los aislados analizados no contenían un resto del gen de la línea germinal humana en una posición elegida en la región estructural, se concluyó que, en esa posición, el resto de aminoácido humano no se toleraba. En este punto, si solo se analizaban los aminoácidos murinos y humanos, se podría fabricar otra biblioteca de Fab aleatorizando los aminoácidos en las posiciones donde no se encontraron restos de molde humanos. Después, los Fab con restos de reemplazo adecuados (no murinos) se seleccionarían y convertirían en AcM completos. Además, los moldes consenso se pueden utilizar como regiones estructurales de partida.

### B. Humanización de Vk del anticuerpo monoclonal IL-13

En primer lugar, se realizó la humanización de la región variable de la cadena ligera (Vk). Sin embargo, se puede comenzar con cualquier cadena o humanizar ambas cadenas simultáneamente. El molde humano seleccionado era el Molde Humano 2 e implicaba el estudio de los efectos en 9 restos cercanos a las CDR dentro de la cadena ligera para determinar si podían humanizarse sin una pérdida de actividad funcional. Las posiciones que se estudiaron en la cadena ligera para la segunda ronda de detección fueron las posiciones 4, 9, 12, 73, 81, 82, 83, 84 y 109.

Se generó una biblioteca modificando cada una de estas posiciones con el resto murino o de molde humano. Se exploraron aproximadamente 860 variantes usando un ensayo funcional basado en ELISA. Solo 18 candidatos demostraron una función comparable a la del clon quimérico. Estos candidatos se analizaron más a fondo. Seis candidatos de los 18 demostraron una mayor afinidad por el antígeno en comparación con el clon quimérico, y estos 6 se secuenciaron. Los resultados de la secuencia se presentan en las figuras 11A y B, y de estos resultados, las posiciones 4, 12 y 81 favorecen el resto murino.

### C. Humanización de Vh

Para evaluar la contribución de los restos estructurales de la cadena pesada a la función global del anticuerpo candidato, se estableció una biblioteca que variaba 10 posiciones dentro de la región estructural del molde DP27 humano que difería del precursor murino, mientras se conservaba la cadena ligera murina. La biblioteca se generó usando oligonucleótidos solapantes sintetizados para la generación de Vh y de Vk murinas usando PCR. Después, se insertaron la Vk y Vh en el vector de expresión Fab usando mutagénesis y a continuación la biblioteca se exploró para detectar Fab funcionales. La complejidad de la biblioteca fue  $(2^{10} / 70\%) \times 3 = 3840$ .

Se examinó un total de 1056 candidatos, usando un ensayo ELISA en formato de 96 pocillos. Los candidatos de esta biblioteca que se eligieron para la secuenciación fueron los que dieron los valores más altos de los resultados de la exploración. Cinco de estos candidatos de alta actividad se secuenciaron para determinar su nivel de humanización y sus secuencias se presentan en las figuras 12A y B. A partir de estos resultados, tres de los restos estructurales en la cadena pesada favorecieron a los restos murinos ( $n = 24, 68$  y  $94$ ).

La segunda región estructural estudiada fue el molde humana NEW. Se generó una biblioteca combinatoria en la que tanto Vk como Vh se humanizaron simultáneamente. Nueve restos en Vk variaron entre los restos murino y humano y también se eligieron nueve restos para Vh. Se exploraron aproximadamente 5 200 candidatos (55 placas de 96 pocillos) de esta biblioteca. A partir de la exploración, aproximadamente 300 candidatos dieron resultados comparables a los del clon quimérico. De este grupo, treinta candidatos se secuenciaron para determinar el nivel de humanización de estos clones funcionales.

Los resultados de secuenciación para las cadenas ligeras se presentan en las Figuras 11A y B. Las secuencias de la cadena pesada se presentan en las Fig. 12 A y B. La posición 83 en la Vk tuvo una alta incidencia para conservar el resto murino, mientras que varias posiciones en el molde de Vh favorecieron el resto murino. En particular, la posición

94 conservó el resto murino en 29 de los 30 candidatos seleccionados. Aunque ningún candidato parece tener regiones estructurales completamente humanizadas, varias regiones variables que fueron altamente humanizadas en Vk o Vh se usarán para una mayor humanización. Para analizar la actividad funcional, la Vk más humanizada se combinó con la Vh más humanizada. (Véase la figura 13.)

5 Se generó una segunda biblioteca que combinaba los restos estructurales de Vk y Vh de interés usando DP27 como molde de cadena pesada y HT2 como molde de cadena ligera. Tal como se ha descrito anteriormente, se sintetizaron oligonucleótidos solapantes que contenían la región estructural humana con restos humanos o murinos en cada posición en cuestión. Estos oligos se mezclaron y después se aparearon para generar las regiones variables completas. Las regiones se amplificaron mediante PCR y después se convirtieron en fragmentos monocatenarios. Los  
10 fragmentos se fosforilaron y después se usaron en una reacción de mutagénesis para incorporar las regiones variables en el vector basado en M13. Después, la biblioteca se exploró con respecto a los fragmentos Fab funcionales que eran específicos para IL-13 en un ensayo basado en ELISA. Las secuencias de las cadenas ligera y pesada se muestran en las figuras 11 C y D y 12 C y D, respectivamente.

15 A partir de los resultados de secuenciación, la cadena Vk fue capaz de tolerar restos humanos en todo momento y, por lo tanto, esta cadena se humanizó por completo. Para la cadena pesada, dos posiciones eran intolerantes a los restos humanos: posición 24 y 94. Por tanto, la región variable de la cadena pesada estaba ~ 98 % humanizada.

D. Generación de candidatos humanizados combinatorios

20 Dado que ningún candidato seleccionado de la exploración de ninguna de las bibliotecas estaba completamente humanizado, se diseñó la humanización. Se generó una serie de candidatos en los que se obtuvieron los niveles de humanización deseados. La Vk más humanizada de la biblioteca HT2 se combinó con la Vh más humanizada de las bibliotecas NEW o DP27. Estos candidatos combinatorios se analizaron para determinar cuál conservaba la función específica mientras llevaba el nivel más alto de humanización. Los candidatos elegidos de HT2-NEW fueron HT2-NEW n.º 73 para la cadena pesada y HT2-NEW n.º 115 para la cadena ligera. Los candidatos elegidos de la cadena ligera HT2-DP27 fueron HT2-DP27 n.º 89 y HT2-DP27 n.º 144, y los candidatos para la cadena pesada fueron HT2-  
25 DP27 n.º 123 y HT2-DP27 n.º 276. Para HT2-DP27, las construcciones se realizaron de la siguiente manera: n.º 89 Vk con n.º 276 Vh y n.º 89 Vk con n.º 123 Vh; n.º 144 Vk con n.º 276 Vh y n.º 144 Vk con n.º 123 Vh. Además, se realizó una construcción con n.º 144 Vk DP27 con n.º 73 Vh NEW para determinar si las interacciones NEW y DP27 con la cadena ligera HT2 diferían.

30 Estas combinaciones se analizaron mediante ensayo ELISA para determinar si había alguna pérdida de función adicional tras una humanización adicional. Para estos ensayos, el antígeno IL-13 se capturó en la placa en una cantidad limitante. Los Fab anti IL13 se añadieron después a la placa a una concentración conocida y se valoraron en la placa a una dilución 1: 3. La unión se detectó con un anticuerpo secundario que es específico para Fab. La figura 13 representa los resultados del ensayo funcional. Fig. 13A - 115Vk/73Vh; Fig. 13B-89Vk/276Vh; Fig. 13C - 144Vk/276Vh; Fig. 13D - 144Vk/123Vh; y Fig. 13E - 144Vk/73Vh. De estos datos, los resultados observados sugirieron  
35 que las combinaciones diseñadas de regiones variables humanizadas no afectaron adversamente a la unión de los Fab con el antígeno.

40 Debido a que los resultados de las Figuras 11 y 12 sugirieron que la cadena ligera HT2 podría estar completamente humanizada y todas menos 2 posiciones en DP27 (24 y 94) podrían estar humanizadas, se diseñó el candidato humanizado ideal en el que solo quedaban 2 restos murinos. Tras la generación de este candidato en particular, el clon se analizó en comparación con su precursor y con los otros candidatos para determinar si hubo alguna pérdida de función. A partir de los datos presentados en la figura 14A, este candidato humanizado no muestra una pérdida significativa de función con este alto grado de humanización (89 Vk/276G). La humanización también se realizó para el candidato armazón HT2-NEW. Este candidato tiene un nivel de humanización final del 98 %, ya que hay dos restos murinos que permanecen en la cadena pesada. La Fig. 14B representa los resultados del ensayo ELISA de esta  
45 construcción (115Vk/73Vh FL).

50 Adicionalmente, se intentó humanizar 89Vk/276G reemplazando los dos restos murinos restantes. Después de mutar las posiciones en los restos humanos, los clones candidatos se analizaron mediante ELISA y se compararon con los precursores. Sin embargo, se observó una pérdida significativa de la función al reemplazar los restos murinos con los del molde elegido. Por lo tanto, se generó otra biblioteca en la que las dos posiciones en el Vh se aleatorizaron para permitir todos los aminoácidos posibles en estas dos posiciones. Los candidatos se seleccionaron usando un ensayo ELISA funcional y treinta candidatos que dieron resultados comparables a los del clon original (89Vk/276G) se secuenciaron para determinar qué aminoácidos estaban presentes en las posiciones diana. A continuación, se muestra una lista de los candidatos y los aminoácidos en las dos posiciones.

Candidato	24	94	Candidato	24	94
228B/C	V	G	RL49	A	T
DP27	F	R	RL59	I	M
89/276G	V	G	RL61	s	T

Candidato	24	94	Candidato	24	94
RL19	S	L	RL84	L	T
RL27	G	V	RL88	L	
RL32	G	G	RL89	L	s

Candidato	24	94	Candidato	24	94
RL7	A	S	RL62	T	T
RL8	L	S	RL70	S	L
RL11	T	V	RL72	V	T
RL12	I	I	RL78	I	M
RL15	L	L	RL79	V	T

Candidato	24	94	Candidato	24	94
RL35	S	L	RL91	G	L
RL36	G	V	RL95	I	L
RL40	L	s	RL97	T	T
RL45	T	T	RL18	S	R

5 Por tanto, a partir de esta exploración, hay varios aminoácidos que aparentemente se toleran en las posiciones indicadas y, sin embargo, no producen una pérdida significativa de la función. Por tanto, cambiando los restos estructurales a aminoácidos que no se encuentran en la secuencia murina ni en la región estructural humana, se generó un Fab completamente funcional sin efecto perjudicial sobre la unión al antígeno diana. Los candidatos que se analizaron adicionalmente de esta biblioteca aleatoria fueron RL-19 y RL-36.

### Ejemplo 10

#### Optimización de las CDR

10 Después de determinar la secuencia estructural óptima para el anticuerpo anti IL-13 candidato, se realizó la optimización de las CDR. Para este proceso, la secuencia de aminoácidos de la CDR se aleatorizó y después las bibliotecas se exploraron para identificar aquellos candidatos que tenían una actividad funcional igual o mejor que la del clon original. Para esta biblioteca, el candidato precursor era RL-36 (véase anteriormente). Las seis CDR se aleatorizaron, una posición a la vez y las bibliotecas se exploraron usando un ELISA funcional. Los candidatos fuertemente reactivos se secuenciaron para compararlos con la CDR precursora. Se observa que todas las secuencias exclusivas enumeradas en las tablas a continuación también aparecen en la Figura 20 con los identificadores de SEQ ID NO apropiados.

#### A. Optimización de CDR-L1

20 La CDR-L1 comprende 15 aminoácidos. Cada una de estas posiciones se aleatorizó usando oligonucleótidos sintetizados que se mezclaron en cantidades equimolares para usarse en una reacción de mutagénesis. Se determinó que la eficacia de incorporación de los oligonucleótidos mutagénicos era del 40 %. Usando este porcentaje, el número de candidatos que debía explorarse era de 3 600. Los clones se analizaron usando un ELISA funcional y se secuenciaron los clones que produjeron una actividad funcional comparable. Del número de candidatos que se exploraron, se identificaron 166 candidatos positivos. De este grupo, se secuenciaron 10 candidatos para determinar los cambios dentro de la CDR. De los resultados de secuenciación que se muestran a continuación, las posiciones 11 y 14 que conducen a una afinidad mejorada son N a Q y M a L.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CDR-L1	R	A	S	K	s	V	D	S	Y	G	N	S	F	M	H
L1-21	R	A	S	K	s	V	D	S	Y	G	N	S	F	L	H
L1-39	R	A	s	K	s	V	D	s	Y	G	Q	S	F	M	H
L1-47	K	A	s	K	s	V	D	s	Y	G	N	S	F	M	H
L1-50	R	A	s	K	s	V	D	s	Y	G	N	S	Y	M	H
L1-59	R	A	s	K	s	V	D	s	Y	G	Q	S	F	M	H
L1-61	R	A	s	K	s	V	D	s	Y	G	N	S	F	M	H
L1-62	R	A	s	K	s	V	D	s	Y	G	N	S	F	L	H
L1-63	R	A	s	K	s	V	D	s	Y	G	N	S	F	L	H
L1-117	N	A	s	K	s	V	D	s	Y	G	N	S	F	M	H
L1-125	R	A	s	K	s	V	D	s	Y	G	N	S	F	M	H

#### B. Optimización de CDR2-L2

30 La CDR-L2 comprende 7 aminoácidos. Esta biblioteca se preparó como se describe anteriormente. La eficacia de esta biblioteca fue del 80 % y se analizaron 840 clones. El número de clones positivos identificados a partir del ensayo fue de 75 y 11 de ellos se secuenciaron. De los resultados que se muestran a continuación, varias posiciones dentro de esta CDR produjeron una mejor actividad, aunque las posiciones y los aminoácidos de reemplazo parecían aleatorios. Este resultado confirma la observación de que la CDR-L2 está más alejada del sitio de unión al antígeno y, como tal,

debería ejercer la menor influencia sobre la unión al antígeno.

	1	2	3	4	5	6	7
CDR-L2	L	A	S	N	L	E	S
L2-10	L	A	S	N	L	N	S
L2-13	L	A	s	N	L	E	S
L2-25	L	A	s	N	L	Q	S
L2-37	L	A	T	N	L	E	S
L2-41	L	A	s	N	L	K	S
L2-44	L	A	s	N	L	E	K
L2-45	L	A	s	R	L	E	s
L2-53	L	A	s	N	L	H	s
L2-58	L	A	s	N	L	S	s
L2-65	L	A	s	F	L	E	s
L2-70	L	A	N	N	L	E	s

### C. Optimización de la CDR-L3

5 La CDR-L3 estaba compuesta por 9 aminoácidos. Esta biblioteca, tras la generación, produjo una eficacia del 50 %, requiriendo explorar ~ 1 700 clones. A partir de esta exploración, se identificaron 257 candidatos positivos y diez de ellos se secuenciaron. A partir de estos resultados, solo una posición produjo un cambio de la secuencia precursora. Varios candidatos demostraron la misma secuencia lo que sugirió que este cambio de posición era altamente favorecido (N a A).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
CDR-L3	Q	Q	N	N	E	D	P	R	T
L3-1	Q	Q	N	N	E	D	P	R	T
L3-32	Q	Q	N	A	E	D	P	R	T
L3-90	Q	Q	N	N	E	D	P	R	T
L3-100	Q	Q	N	N	E	D	P	R	T
L3-150	Q	Q	N	N	E	D	P	R	T
L3-170	Q	Q	N	A	E	D	P	R	T
L3-185	Q	Q	N	A	E	D	P	R	T
L3-207	Q	Q	N	A	E	D	P	R	T
L3-225	Q	Q	N	N	E	D	P	R	T

### 10 D. Optimización de la CDR-H1

15 La CDR-H1 comprendía 5 aminoácidos. La eficacia de esta biblioteca fue del 80 %, lo que requiere explorar aproximadamente 600 candidatos. A partir de la exploración, hubo 138 clones positivos y once de ellos se secuenciaron. A partir de los resultados indicados a continuación, la segunda posición dentro de esta CDR parecía ofrecer la mayor posibilidad de mejora de la unión al antígeno. Sin embargo, varios aminoácidos afectan favorablemente a la unión.

	1	2	3	4	5
CDR-H1	A	Y	S	V	N
H1-2	A	K	S	V	N
H1-12	G	Y	s	V	N
H1-18	A	K	s	V	N
H1-24	A	K	s	V	N
H1-31	A	H	s	V	N

## ES 2 775 204 T3

H1-89	A	Y	s	V	N
H1-90	G	Y	s	V	N
H1-114	A	s	s	V	N
H1-115	A	H	s	V	N
H1-123	A	R	s	V	N
H1-126	A	R	s	V	N

### E. Optimización de la CDR-H2

5 La CDR-H2 comprendía 16 aminoácidos. La eficacia de esta biblioteca fue del 70 %, lo que significaba que debían explorarse más de 2 100 candidatos. A partir de la exploración, se identificaron 192 candidatos positivos y trece se secuenciaron para determinar los cambios que se produjeron en la CDR. A partir de los resultados de secuenciación indicados a continuación, varias posiciones mejoraron la afinidad de unión, pero ninguno de los cambios de aminoácidos pareció ser significativamente diferente a los del precursor.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
CDR-H2	M	I	W	G	D	G	K	L	V	Y	N	S	A	L	K	S
H2-38	M	I	W	G	D	G	K	I	S	Y	N	S	A	L	K	S
H2-43	M	I	W	G	D	G	K	I	V	Y	N	S	A	L	E	S
H2-51	M	I	W	G	D	G	K	I	V	Y	N	S	A	L	K	S
H2-66	M	I	W	G	D	G	K	I	S	Y	N	S	A	L	K	S
H2-79	M	I	W	G	D	G	K	I	V	Y	N	S	D	L	K	S
H2-86	M	I	W	G	D	G	K	V	V	Y	N	S	A	L	K	S
H2-101	M	I	W	G	D	G	K	I	V	Γ	N	S	E	L	K	S
H2-109	M	I	W	G	D	G	K	I	A	Y	N	S	A	L	K	S
H2-119	M	I	W	G	D	G	K	I	V	Y	N	S	A	L	K	E
H2-121	M	V	W	G	D	G	K	I	V	Y	N	S	A	L	K	S
H2-129	M	I	W	G	D	G	K	I	V	Y	N	S	A	L	K	S
H2-169	M	I	W	G	D	G	K	I	V	Y	N	S	A	L	A	S
H2-176	M	I	W	G	D	G	K	K	V	Y	N	S	A	L	K	S

### F. Optimización de la CDR-H3

10 La CDR-H3 comprendía 10 aminoácidos. Se cree que esta CDR en general es la que impone la mayor influencia en la unión al antígeno, porque este bucle está generalmente en el medio del sitio de unión. Esta biblioteca tuvo una eficacia del 40 %, por lo que debían explorarse 2 400 candidatos. De estos, se identificaron 174 candidatos positivos y diez se secuenciaron para determinar los cambios dentro de la CDR. Los resultados indicados a continuación, indican que el cambio de Y a R en la tercera posición puede ser importante para mejorar la unión.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
H3	D	G	Y	Y	P	Y	A	M	D	N
H3-1	D	G	R	Y	P	Y	A	M	D	N
H3-30	D	G	Y	Y	P	Y	A	M	S	N
H3-73,	D	G	Y	Y	P	Y	A	M	A	N
H3-89	D	G	Y	Y	P	Y	A	M	A	N
H3-130	D	G	R	Y	P	Y	A	M	D	N
H3-131	D	G	R	Y	P	Y	A	M	D	N
H3-133	D	G	Y	Y	P	Y	A	L	D	N
H3-135	D	G	R	Y	P	Y	A	M	D	N
H3-161	D	G	Y	Y	P	Y	A	M	D	N
H3-162	D	G	Y	Y	P	Y	A	M	K	N

### G. Biblioteca combinatoria

Una vez que se determinaron los cambios dentro de las CDR que produjeron la mayor mejora global en la unión al antígeno, se combinaron los mejores candidatos para ver si estos cambios mejoraban la unión. Por tanto, se diseñó un candidato para combinar todas las sustituciones de aminoácidos favorables.

Para generar la biblioteca combinatoria, el clon inicial fue el que incorporó la alteración en CDR-L1-59 (N a Q). En este clon, los otros cambios se hicieron para CDR-L3, N a A (posición 4), para CDR-H1, Y a cualquiera de R, H, K o S (posición 2), para CDR-H3, Y a R (posición 3) y D a K o S (posición 9). No se realizaron cambios en la CDR-L2 o en la CDR-H2. Utilizando un ensayo ELISA funcional, se exploraron más de 1 100 candidatos de esta biblioteca. Se identificó un total de 120 candidatos que tenían una actividad mayor que la del precursor. Las secuencias de esos clones se muestran en la figura 15.

Para confirmar que estos candidatos combinatorios conservaron la función, se realizó un ensayo de competición. Para este ensayo, la IL-13 se capturó en una placa ELISA. Los candidatos, que son Fab purificados, se premezclaron en concentraciones variables a una concentración constante de Fab anti IL-13 quimérico marcado. Esta mezcla se añadió a la placa ELISA. Se detectaron los anti IL-13 quiméricos marcados capaces de unirse a la IL-13 unida a la placa.

De los resultados de esta competencia, los dos candidatos analizados demostraron una capacidad equivalente para competir con el candidato quimérico (228 B/C n.º 3) para unirse a IL-13 (Fig. 16). El Fab irrelevante es 5I, que no demuestra capacidad para competir. La figura 17 representa las secuencias de tres candidatos madurados por afinidad.

### Ejemplo 11

#### 20 Mapeo epitópico

El AcM anti IL13 228B/C-1 se une a un epítipo conformacional y se une a la IL13 de mono cinomolgo con la misma alta afinidad que a la IL13 humana. Sin embargo, 228B/C no se une a IL13 murina. Por tanto, la estrategia ideada para el mapeo epitópico fue intercambiar pequeñas partes de la IL13 de mono con la secuencia de IL13 de ratón correspondiente. Los oligonucleótidos solapantes se sintetizaron como se muestra en la Figura 18. Se realizaron dos rondas de PCR para ensamblar las construcciones híbridas de IL13 de modo que parte de la IL13 de mono se reemplazó por la secuencia correspondiente de la IL13 de ratón (Fig. 18). Las regiones codificantes de IL13 amplificadas por PCR final se clonaron en el vector pcDNA3.1 en marco con una etiqueta V5 usando el kit de clonación TOPO (Invitrogen). Todas las regiones amplificadas por PCR se confirmaron mediante secuenciación para contener solo las mutaciones de intercambio de dominio deseadas y no una mutación no deseada adicional en los vectores de expresión.

El epítipo de unión al AcM anti IL13 se identificó como un péptido de 8 unidades monoméricas (meros) del aminoácido n.º 49 a 56, ESLINVSQ (SEQ ID NO: 18). Este epítipo se encuentra en la hélice B y en el bucle BC en la IL13 humana. Cuando el péptido epitópico procedente de cino-IL13 se usó para intercambiar la secuencia correspondiente en la IL13 murina, la molécula de IL13 híbrida resultante pudo unirse a 228B/C con afinidad similar a la de la IL13 de cino original, validando adicionalmente que la unión del AcM 228B/C con la IL13 humana o de mono cino en este péptido se producía entre los restos n.º 49-56. La comparación de secuencias entre la IL13 humana, de cinomolgo y murina, revela que en la IL13 humana solo tres restos, Ile52, Val54, Gly56, no se conservan, lo que sugiere que los restos críticos para interacción de la IL13 y del AcM anti IL13 a través de este péptido de 8 meros se determina mediante uno o la combinación de algunos de estos tres restos.

Este epítipo se confirmó adicionalmente por análisis de mancha peptídica. El péptido IL13 humano completo se escaneó con una serie de péptidos de 12 meros solapantes sintetizados a través de MANCHA en la membrana de celulosa. El único péptido reactivo con el AcM anti IL13 se identificó como un péptido de 12 meros del aminoácido n.º 44-56, YCAALESINVS (SEQ ID NO: 19), que se solapa con la región identificada mediante experimentos de intercambio de dominio.

#### 45 Depósitos

Los siguientes cultivos se han depositado en la American Type Culture Collection (Colección Americana de cultivos tipo), 10801 University Boulevard, Manassas Va. 20110-2209 Estados Unidos (ATCC):

Hibridoma	ATCC NO.	Fecha de depósito
anti IL13 228B/C-1	PTA-5657	20 de noviembre de 2003
anti IL13 228A-4	PTA-5656	20 de noviembre de 2003
anti IL13 227-26	PTA-5654	20 de noviembre de 2003
anti IL13 227-43	PTA-5655	20 de noviembre de 2003

5 Este depósito se realizó de conformidad con las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para los fines del procedimiento de patentes y los reglamentos en virtud del mismo (Tratado de Budapest). Esto garantiza el mantenimiento de un cultivo viable durante 30 años a partir de la fecha de depósito. El organismo estará disponible en la ATCC de conformidad con los términos del Tratado de Budapest, que asegura la disponibilidad permanente y sin restricciones de la descendencia del cultivo al público tras la emisión de la patente estadounidense pertinente.

10 El cesionario de la presente solicitud ha acordado que, si el cultivo en depósito muere, se pierde o se destruye cuando se cultiva en condiciones adecuadas, será reemplazado inmediatamente después de la notificación con un espécimen viable del mismo cultivo. La disponibilidad de la cepa depositada no debe interpretarse como una licencia para llevar a la práctica la invención, contraviniendo los derechos otorgados bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patente.

Se considera que la anterior memoria descriptiva escrita es suficiente para permitir a un experto en la materia llevar a la práctica la invención. La presente invención se ilustra mediante las realizaciones depositadas.

15 **Listado de secuencias**

<110> Genentech, Inc.

<120> Nuevos anticuerpos anti-IL 13 y usos de los mismos

<130> P2443 EP / 2 S3

<140>

20 <141>

<150> EP 10 17 8487.4

<151> 23-12-2004

<150> EP 04 81 5562.6

<151> 23-12-2004

25 <150> US 60/532,130

<151> 23-12-2003

<160> 152

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

30 <211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 775 204 T3

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

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

Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala  
35 40 45

Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr  
50 55 60

Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln  
65 70 75 80

Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe  
85 90 95

Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Arg  
100 105 110

Phe Asn

<210> 2

<211> 114

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> característica\_misc

<222> (13)..(13)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

10 <400> 2

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

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

Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala  
35 40 45

Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr  
50 55 60

Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln  
65 70 75 80

Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe  
85 90 95

Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Arg  
100 105 110

Phe Asn

<210> 3

ES 2 775 204 T3

<211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Murinae gen. sp.

5 <220>  
 <221> CADENA  
 <222> (1)..(113)  
 <223> REGIÓN VARIABLE DE LA CADENA LIGERA DE antiCUERPO MONOCLONAL 228B/C

<400> 3  
 Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Ala

15 <210> 4  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Murinae gen. sp.

<220>  
 <221> CADENA  
 <222> (1)..(118)  
 <223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA PESADA DE antiCUERPO MONOCLONAL 228B/C

20 <400> 4

ES 2 775 204 T3

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Thr Val Ser Ser  
115

- 5 <210> 5
- <211> 118
- <212> PRT
- <213> Murinae gen. sp.

- 10 <220>
- <221> CADENA
- <222> (1)..(118)
- <223> REGIÓN VARIABLE DE LA CADENA LIGERA DEL antiCUERPO MONOCLONAL 228A-4

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Thr Val Ser Ser  
115

ES 2 775 204 T3

<210> 6  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Murinae gen. sp.

5 <220>  
 <221> CADENA  
 <222> (1)..(118)  
 <223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA PESADA DEL antiCUERPO MONOCLONAL 228A-4

<400> 6  
 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

10 Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 7  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Murinae gen. sp.

15 <220>  
 <221> CADENA  
 <222> (1)..(114)  
 <223> REGIÓN VARIABLE DE LA CADENA LIGERA DEL antiCUERPO MONOCLONAL 227-26

20 <220>  
 <221> CADENA  
 <222> (1)..(114)  
 <223> REGIÓN VARIABLE DE LA CADENA LIGERA DEL antiCUERPO MONOCLONAL 227-26-1

<400> 7  
 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

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

25 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser



ES 2 775 204 T3

<210> 10  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> ARTIFICIAL

5 <220>  
 <223> Cebador de nucleótidos de oligo inverso de una secuencia mutante de IL13

<400> 10  
 ctcgagggtg aaccgtccct cgcgaaaaag 30

10 <210> 11  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico degenerado directo para el mono IL13

15 <400> 11  
 gyyctrngcy ycatggcgct yt 22

<210> 12  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 20 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico degenerado inverso para mono IL13

<400> 12  
 tttcagttga accgtccyty gcgaa 25

25 <210> 13  
 <211> 399  
 <212> ADN  
 <213> Macaca fascicularis

<400> 13  
 atggcgctct tgttgaccat ggtcattgct ctcaactgcc tggcgggctt tgcctcccca 60

30 agccctgtgc ctccctctac agccctcaag gagctcattg aggagctggt caacatcacc 120

cagaaccaga aggccccgct ctgcaatggc agcatgggtgt ggagcatcaa cctgacagct 180

ggcgtgtact gtgcagccct ggaatccctg atcaacgtgt caggctgcag tgccatcgag 240

aagaccacaga g gatgctgaa cggattctgc ccgcacaagg tctcagctgg gcagttttcc 300

agcttgctgtg tccgagacac caaaatcgag gtggcccagt ttgtaaagga cctgctcgta 360

catttaaga aactttttcg caatggacgg ttcaactga 399

<210> 14  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> ARTIFICIAL

35 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico directo para cynomologus monkey IL13

<400> 14  
 40 aagcttcacc atggcgctct tgttgaccat ggtc 34

<210> 15  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> ARTIFICIAL

45 <220>

ES 2 775 204 T3

<223> Cebador oligonucleotídico inverso para cynomologus monkey IL13

<400> 15  
tcacaagatc tgggctcctc gaggtgaac cgtccattgc 40

5 <210> 16  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> ARTIFICIAL

<220>  
<223> Cebador oligonucleotídico directo para Fc gamma1

10 <400> 16  
ctcgaggagc ccagatcttg tga 23

<210> 17  
<211> 35  
<212> ADN  
15 <213> ARTIFICIAL

<220>  
<223> Cebador oligonucleotídico inverso para Fc gamma 1

<400> 17  
gctctagagc ctcattacc cggagacagg gagag 35

20 <210> 18  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> ARTIFICIAL

<220>  
25 <221> fuente  
<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: SITIO DE ENLACE DE EPÍTOPO"

<400> 18  
Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly  
1 5

<210> 19  
30 <211> 12  
<212> PRT  
<213> ARTIFICIAL

<220>  
35 <221> fuente  
<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: SITIO DE ENLACE DE EPÍTOPO"

<400> 19  
Tyr Cys Ala Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser  
1 5 10

<210> 20  
40 <211> 23  
<212> PRT  
<213> ARTIFICIAL

<220>  
<221> fuente  
<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: FRL1 228B/C-1"

45 <400> 20  
Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys  
20

ES 2 775 204 T3

<210> 21  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

5 <220>  
 <221> fuente  
 <223> / note = "Descripción de la secuencia artificial: MOLDE HT2 DE FRL1"

<400> 21  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys  
 20

10 <210> 22  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 15 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE B DE FRL1"

<400> 22  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys  
 20

20 <210> 23  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <221> fuente  
 25 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE J DE FRL1"

<400> 23  
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys  
 20

30 <210> 24  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE L DE FRL1"

35 <400> 24  
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys  
 20

<210> 25  
 <211> 23

ES 2 775 204 T3

<212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <221> fuente  
 5 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT-NEW # 300 DE FRL1 "

<400> 25  
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys  
 20

<210> 26  
 <211> 23  
 10 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <221> fuente  
 15 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-DP27 DE FRL1  
 #29"

<400> 26  
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Val Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys  
 20

<210> 27  
 <211> 23  
 20 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-DP27 # 53 DE FRL1"

25 <400> 27  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys  
 20

<210> 28  
 <211> 23  
 30 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-DP27 DE FRL1  
 #66"

35 <400> 28  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys  
 20

<210> 29  
 <211> 15

ES 2 775 204 T3

<212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <221> fuente  
 5 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: 228B/C DE FRL2 "

<400> 29  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

<210> 30  
 <211> 32  
 10 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: 288 B/C DE FRL3"

15 <400> 30  
 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

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

<210> 31  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 20 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: HT2 DE FRL3"

<400> 31  
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

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

<210> 32  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

30 <220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE B DE FRL3"

<400> 32  
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

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

35 <210> 33  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <221> fuente  
 40 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE J DE FRL3"

ES 2 775 204 T3

<400> 33  
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

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

5 <210> 34  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE L DE FRL3"

10 <400> 34  
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

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

15 <210> 35  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE N DE FRL3"

<400> 35  
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

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

<210> 36  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

25 <220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE P DE FRL3"

<400> 36  
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

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

<210> 37  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

35 <220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE R DE FRL3 "

<400> 37

ES 2 775 204 T3

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

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

<210> 38  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 5 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-NEW # 1 DE FRL3 "

<400> 38  
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr  
 10 1 5 10 15

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

<210> 39  
 <211> 32  
 15 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-NEW # 9 DE FRL3"

20 <400> 39  
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

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

<210> 40  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 25 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-NEW # DE FRL314"

<400> 40  
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

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

<210> 41  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

35 <220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: HT2-NEW # 21 DE FRL3"

<400> 41

ES 2 775 204 T3

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

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

<210> 42  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 5 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-NEW # 67 DE FRL3 "

<400> 42  
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

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

<210> 43  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

15 <220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-NEW # 74 DE FRL3"

<400> 43  
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

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

20 <210> 44  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

25 <220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-NEW # 78 DE FRL3"

<400> 44  
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

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

30 <210> 45  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <221> fuente  
 35 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-NEW DE FRL3 #322"

<400> 45

ES 2 775 204 T3

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

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

<210> 46  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 5 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-NEW DE FRL3 #162"

10 <400> 46  
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

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

<210> 47  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 15 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-DP27 # 7 DE FRL3"

<400> 47  
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

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

<210> 48  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

25 <220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTW HT2-DP27 # 57 DE FRL3 "

<400> 48  
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

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

30 <210> 49  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-DP27 # 73 DE FRL3 "

<400> 49

ES 2 775 204 T3

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

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

<210> 50

<211> 32

<212> PRT

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<221> fuente

<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-DP27 # 92 DE FRL3 "

<400> 50

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

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

10

<210> 51

<211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<221> fuente

<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-DP27 DE FRL3 #118"

15

<400> 51

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

20

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

<210> 52

<211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<<220>

<221> fuente

<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-DP27 DE FRL3 #123"

30

<400> 52

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

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

<210> 53

<211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<221> fuente

<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-DP27 # 83 DE FRL3 "

40

<400> 53

ES 2 775 204 T3

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

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

<210> 54

<211> 32

<212> PRT

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<221> fuente

<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-DP27 DE FRL3 #135"

10 <400> 54

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

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

<210> 55

<211> 32

<212> PRT

15 <213> ARTIFICIAL

<220>

<221> fuente

<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-DP27 DE FRL3 #273"

20 <400> 55

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

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

<210> 56

<211> 32

<212> PRT

25 <213> ARTIFICIAL

<220>

<221> fuente

<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-DP27 DE FRL3 #301"

30 <400> 56

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

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

<210> 57

<211> 12

<212> PRT

35 <213> ARTIFICIAL

<220>

<221> fuente

<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: 228 B/C DE FRL4"

ES 2 775 204 T3

<400> 57  
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala  
1 5 10

<210> 58  
<211> 11  
5 <212> PRT  
<213> ARTIFICIAL

<220>  
<221> fuente  
<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: HT2 DE FRL4"

10 <400> 58  
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
1 5 10

<210> 59  
<211> 11  
15 <212> PRT  
<213> ARTIFICIAL

<220>  
<221> fuente  
<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE B DE FRL4"

20 <400> 59  
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
1 5 10

<210> 60  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> ARTIFICIAL

25 <220>  
<221> fuente  
<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: 228 B/C DE FRH1"

<400> 60  
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln  
1 5 10 15

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

30 <210> 61  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> ARTIFICIAL

<220>  
35 <221> fuente  
<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: DP27 DE FRH1"

<400> 61  
Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln  
1 5 10 15

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

40 <210> 62  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> ARTIFICIAL

<220>

ES 2 775 204 T3

<221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: NUEVO FRH1 "

<400> 62  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln  
 1 5 10 15

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

5 <210> 63  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 10 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-NEW # 73 DE FRH1"

<400> 63  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln  
 1 5 10 15

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

15 <210> 64  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 20 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: HT2-DP27 # 7 DE FRH1"

<400> 64  
 Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln  
 1 5 10 15

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

25 <210> 65  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 30 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-DP27 DE FRH1 #40"

<400> 65  
 Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln  
 1 5 10 15

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

35 <210> 66  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <221> fuente

ES 2 775 204 T3

<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-DP27 DE FRH1 #268"

<400> 66

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

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

5 <210> 67  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> ARTIFICIAL

<220>  
10 <221> fuente  
<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: 228 B/C DE FRH2 "

<400> 67

Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly  
1 5 10

15 <210> 68  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> ARTIFICIAL

<220>  
<221> fuente  
20 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: DP27 DE FRH2 "

<400> 68

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala  
1 5 10

25 <210> 69  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> ARTIFICIAL

<220>  
<221> fuente  
<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: NUEVO FRH2 "

30 <400> 69  
Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
1 5 10

<210> 70  
<211> 14  
<212> PRT  
35 <213> ARTIFICIAL

<220>  
<221> fuente  
<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 1 DE FRH2 "

<400> 70

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

<210> 71  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> ARTIFICIAL

45 <220>  
<221> fuente

ES 2 775 204 T3

<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 3 DE FRH2 "

<400> 71

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly  
1 5 10

<210> 72

5 <211> 14

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<221> fuente

10 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-DP27 DE FRH2 # 7"

<400> 72

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Gly  
1 5 10

<210> 73

15 <211> 14

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<221> fuente

20 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-DP27 # DE FRH2 43"

<400> 73

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala  
1 5 10

<210> 74

25 <211> 14

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<221> fuente

30 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-DP27 # 50 DE FRH2 "

<400> 74

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

<210> 75

35 <211> 14

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<221> fuente

40 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-DP27 DE FRH2 #100"

<400> 75

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

<210> 76

45 <211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<221> fuente

<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: 228 B/C DE FRH3 "

ES 2 775 204 T3

<400> 76  
 Arg Leu Asn Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys  
 1 5 10 15

Met Ser Ser Leu Gln Ser Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Gly  
 20 25 30

5 <210> 77  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: DP27 DE FRH3 "

10 <400> 77  
 Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr  
 1 5 10 15

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

15 <210> 78  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: NUEVO FRH3 "

<400> 78  
 Arg Val Thr Met Leu Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg  
 1 5 10 15

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

<210> 79  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

25 <220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 1 DE FRH3"

<400> 79  
 Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr  
 1 5 10 15

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

30 <210> 80  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 3 DE FRH3"

35 <400> 80

ES 2 775 204 T3

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

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

<210> 81  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 5 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 4 DE FRH3"

<400> 81  
 Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr  
 1 5 10 15

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

<210> 82  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

15 <220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: HT2-NEW # 1 DE FRH3"

<400> 82  
 Arg Leu Asn Met Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu Arg  
 1 5 10 15

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

20 <210> 83  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

25 <220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-NEW # 9 DE FRH3"

<400> 83  
 Arg Leu Asn Met Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu Arg  
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Gly

30 20 25 30

<210> 84  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

35 <220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-NEW # 14 DE FRH3"

<400> 84

ES 2 775 204 T3

Arg Val Asn Met Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg  
1 5 10 15

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

<210> 85  
<211> 32  
<212> PRT  
5 <213> ARTIFICIAL

<220>  
<221> fuente  
<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-DP27 DE FRH3 #26"

10 <400> 85  
Arg Leu Asn Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr  
1 5 10 15

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

<210> 86  
<211> 32  
<212> PRT  
15 <213> ARTIFICIAL

<220>  
<221> fuente  
<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-DP27 DE FRH3 #275"

20 <400> 86  
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Ile Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr  
1 5 10 15

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

<210> 87  
<211> 32  
<212> PRT  
25 <213> ARTIFICIAL

<220>  
<221> fuente  
<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-DP27 DE FRH3 #301"

30 <400> 87  
Arg Leu Asn Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr  
1 5 10 15

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

<210> 88  
<211> 32  
<212> PRT  
35 <213> ARTIFICIAL

<220>  
<221> fuente  
<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-DP27 DE FRH3 #580"

ES 2 775 204 T3

<400> 88

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

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

<210> 89

<211> 32

5 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<221> fuente

10 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-DP27 DE FRH3 #345"

<400> 89

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

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

<210> 90

<211> 32

15 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<221> fuente

20 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE HT2-DP27 DE FRH3 #634"

<400> 90

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

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

<210> 91

<211> 11

25 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<221> fuente

<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: 228B/C DE FRH4 "

30 <400> 91

Trp Gly His Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
1 5 10

<210> 92

<211> 11

35 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<221> fuente

<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: DP27 DE FRH4 "

<400> 92

40 Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser  
1 5 10

ES 2 775 204 T3

<210> 93  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

5 <220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: CADENA LIGERA VARIABLE DE CL5 "

<400> 93  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

10 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr  
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 94  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

15 <220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: CADENA PESADA VARIABLE DE CL5 "

<400> 94

ES 2 775 204 T3

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

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

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

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

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

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Val Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Lys Asn Trp Gly Gln Gly Ser  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

5 <210> 95  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> ARTIFICIAL

10 <220>  
<221> fuente  
<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: CADENA LIGERA VARIABLE DE CL-13 "

<400> 95  
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

15 <210> 96  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> ARTIFICIAL

ES 2 775 204 T3

<220>

<221> fuente

<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: CADENA PESADA VARIABLE DE CL-13 "

<400> 96

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

5 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Gly Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Lys  
20 25 30

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

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

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

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Val Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Ser Asn Trp Gly Gln Gly Ser  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 97

<211> 112

10 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<221> fuente

<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: CADENA LIGERA VARIABLE DE CL-50 "

15 <400> 97

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 775 204 T3

<210> 98  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

5 <220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: CADENA PESADA VARIABLE DE CL-50 "

<400> 98  
 Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Gly Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Lys  
 20 25 30  
 Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys  
 50 55 60  
 Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu  
 65 70 75 80  
 Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95  
 Val Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Lys Asn Trp Gly Gln Gly Ser  
 100 105 110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

10 <210> 99  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

15 <220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: 228B/C DE CDR-L1 "

<400> 99  
 Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His  
 1 5 10 15

20 <210> 100  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

25 <220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 1 DE CDR-L1 "

<400> 100  
 Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr Gly Gln Ser Phe Met His  
 1 5 10 15

30 <210> 101  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

ES 2 775 204 T3

<220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 2 DE CDR-L1 "

<400> 101  
 Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr Gly Gln Ser Phe Leu His  
 5 1 5 10 15

<210> 102  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

10 <220>  
 <223> CDR-L1 VARIANTE 3

<400> 102  
 Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Tyr Met His  
 1 5 10 15

15 <210> 103  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL  
 <<220>

20 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 4 DE CDR-L1"

<400> 103  
 Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Leu His  
 1 5 10 15

25 <210> 104  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

30 <220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: 228B/C DE CDR-L2"

<400> 104  
 Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
 1 5

35 <210> 105  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 1 DE CDR-L2"

40 <400> 105  
 Leu Ala Ser Asn Leu Asn Ser  
 1 5

<210> 106  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

45 <220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 2 DE CDR-L2"

<400> 106

**Leu Ala Ser Asn Leu Gln Ser**  
 1 5  
 <210> 107  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 5 <213> ARTIFICIAL  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 3 DE CDR-L2"  
 <400> 107  
**Leu Ala Thr Asn Leu Glu Ser**  
 10 1 5  
 <210> 108  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL  
 15 <220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 4 DE CDR-L2"  
 <400> 108  
**Leu Ala Ser Asn Leu Lys Ser**  
 20 1 5  
 <210> 109  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 25 <213> ARTIFICIAL  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 5 DE CDR-L2"  
 <400> 109  
**Leu Ala Ser Asn Leu Glu Lys**  
 30 1 5  
 <210> 110  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL  
 35 <220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 6 DE CDR-L2"  
 <400> 110  
**Leu Ala Ser Arg Leu Glu Ser**  
 1 5  
 40 <210> 111  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL  
 <220>  
 45 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 7 DE CDR-L2"  
 <400> 111  
**Leu Ala Ser Asn Leu His Ser**  
 1 5

ES 2 775 204 T3

<210> 112  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> ARTIFICIAL

5 <220>  
<221> fuente  
<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 8 DE CDR-L2"

<400> 112  
Leu Ala Ser Asn Leu Ser Ser  
1 5

10 <210> 113  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> ARTIFICIAL

<220>  
15 <221> fuente  
<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 9 DE CDR-L2"

<400> 113  
Leu Ala Ser Phe Leu Glu Ser  
1 5

20 <210> 114  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> ARTIFICIAL

<220>  
25 <221> fuente  
<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 10 DE CDR-L2"

<400> 114  
Leu Ala Asn Asn Leu Glu Ser  
1 5

<210> 115  
30 <211> 9  
<212> PRT  
<213> ARTIFICIAL

<220>  
<221> fuente  
<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: 228B/C DE CDR-L3"

35 <400> 115  
Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Arg Thr  
1 5

<210> 116  
40 <211> 9  
<212> PRT  
<213> ARTIFICIAL

<220>  
<221> fuente  
<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 1 DE CDR-L3"

<400> 116  
Gln Gln Asn Ala Glu Asp Pro Arg Thr  
45 1 5

<210> 117  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> ARTIFICIAL

ES 2 775 204 T3

<220>  
<221> fuente  
<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: 228B/C DE CDR-H1"

<400> 117  
Ala Tyr Ser Val Asn  
5 1 5

<210> 118  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> ARTIFICIAL

10 <220>  
<221> fuente  
<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 1 DE CDR-H1"

<400> 118  
Ala Lys Ser Val Asn  
1 5

15 <210> 119  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> ARTIFICIAL

20 <220>  
<221> fuente  
<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 2 DE CDR-H1"

<400> 119  
Ala Asn Ser Val Asn  
1 5

25 <210> 120  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> ARTIFICIAL

30 <220>  
<221> fuente  
<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 3 DE CDR-H1"

<400> 120  
Gly Tyr Ser Val Asn  
1 5

35 <210> 121  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> ARTIFICIAL

<220>  
<221> fuente  
<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 4 DE CDR-H1"

40 <400> 121  
Ala His Ser Val Asn  
1 5

<210> 122  
<211> 5  
<212> PRT  
45 <213> ARTIFICIAL

<220>  
<221> fuente  
<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 5 DE CDR-H1"

ES 2 775 204 T3

<400> 122  
**Ala Arg Ser Val Asn**  
 1 5

<210> 123  
 <211> 16  
 5 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: 228B/C DE CDR-H2"

10 <400> 123  
**Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser**  
 1 5 10 15

<210> 124  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 15 <213> ARTIFICIAL  
 <<220>

<221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 1 DE CDR-H2"

<400> 124  
**Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Ser Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser**  
 20 1 5 10 15

<210> 125  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

25 <220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 2 DE CDR-H2"

<400> 125  
**Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Glu Ser**  
 30 1 5 10 15

<210> 126  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 35 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 3 DE CDR-H2"

<400> 126  
**Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser**  
 40 1 5 10 15

<210> 127  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

45 <220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 4 DE CDR-H2"

<400> 127  
**Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Asp Leu Lys Ser**  
 1 5 10 15

ES 2 775 204 T3

<210> 128  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL  
 5 <220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 5 DE CDR-H2"  
 <400> 128  
**Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Val Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser**  
 1 5 10 15  
 10 <210> 129  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL  
 <220>  
 15 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 6 DE CDR-H2"  
 <400> 129  
**Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Glu Leu Lys Ser**  
 1 5 10 15  
 20 <210> 130  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL  
 <220>  
 <221> fuente  
 25 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 7 DE CDR-H2"  
 <400> 130  
**Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Ala Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser**  
 1 5 10 15  
 30 <210> 131  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 8 DE CDR-H2"  
 35 <400> 131  
**Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Glu**  
 1 5 10 15  
 <210> 132  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 40 <213> ARTIFICIAL  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 9 DE CDR-H2"  
 <400> 132  
**Met Val Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser**  
 45 1 5 10 15  
 <210> 133  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

ES 2 775 204 T3

<220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 10 DE CDR-H2"

<400> 133  
 Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Ala Ser  
 5 1 5 10 15

<210> 134  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

10 <220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 11 DE CDR-H2"

<400> 134  
 Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Lys Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser  
 1 5 10 15

15 <210> 135  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

20 <220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: 228B/C DE CDR-H3"

<400> 135  
 Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn  
 1 5 10

25 <210> 136  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

30 <220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 1 DE CDR-H3"

<400> 136  
 Asp Gly Arg Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn  
 1 5 10

35 <210> 137  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

40 <220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 2 DE CDR-H3"

<400> 137  
 Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Lys Asn  
 1 5 10

45 <210> 138  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 3 DE CDR-H3"

ES 2 775 204 T3

<400> 138  
Asp Gly Arg Tyr Pro Tyr Ala Met Lys Asn  
1 5 10

5 <210> 139  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> ARTIFICIAL

<220>  
<221> fuente  
<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 4 DE CDR-H3"

10 <400> 139  
Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Ser Asn  
1 5 10

<210> 140  
<211> 10  
<212> PRT  
15 <213> ARTIFICIAL

<220>  
<221> fuente  
<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 5 DE CDR-H3"

20 <400> 140  
Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Ala Asn  
1 5 10

<210> 141  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> ARTIFICIAL

25 <220>  
<221> fuente  
<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: VARIANTE 6 DE CDR-H3"

<400> 141  
Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Leu Asp Asn  
1 5 10

30 <210> 142  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> ARTIFICIAL

35 <220>  
<221> fuente  
<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: CADENA LIGERA VARIABLE DE CL-89"

<400> 142

ES 2 775 204 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 143

<211> 118

<212> PRT

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<221> fuente

<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: CADENA PESADA VARIABLE CL-276G"

<400> 143

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

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

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

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

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

10

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

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

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 144

<211> 112

15 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

ES 2 775 204 T3

<220>

<221> fuente

<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: CADENA LIGERA VARIABLE DE RL-36"

<400> 144

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

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

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

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

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

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

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

<210> 145

<211> 118

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

10 <220>

<221> fuente

<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: CADENA PESADA VARIABLE RL-36"

<400> 145

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln

15



ES 2 775 204 T3

<211> 118  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 5 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: CADENA PESADA VARIABLE RL-11"

<400> 147  
 Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln  
 1 5 10 15

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

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

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

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

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

Val Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

10 <210> 148  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <221> fuente  
 15 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: CADENA PESADA VARIABLE RL-8"

<400> 148

ES 2 775 204 T3

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

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

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

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

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

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

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

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 149

<211> 118

<212> PRT

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<221> fuente

<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: CADENA PESADA VARIABLE RL-45 "

<400> 149

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

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

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

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

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

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

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

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 150

ES 2 775 204 T3

<211> 112  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 5 <221> fuente  
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: CADENA LIGERA VARIABLE RL-36-L1,59 "

<400> 150  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

10 <210> 151  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <221> fuente  
 15 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: CADENA PESADA VARIABLE RL36-L1,59 "

<400> 151

ES 2 775 204 T3

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

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

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

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

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

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Val Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 152

<211> 248

<212> PRT

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<221> fuente

<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: FV DE CADENA ÚNICA"

<400> 152

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

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

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

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

10

ES 2 775 204 T3

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

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

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

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Ser Gly  
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro  
130 135 140

Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg  
145 150 155 160

Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr  
165 170 175

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser  
180 185 190

Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
195 200 205

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Val Ala  
210 215 220

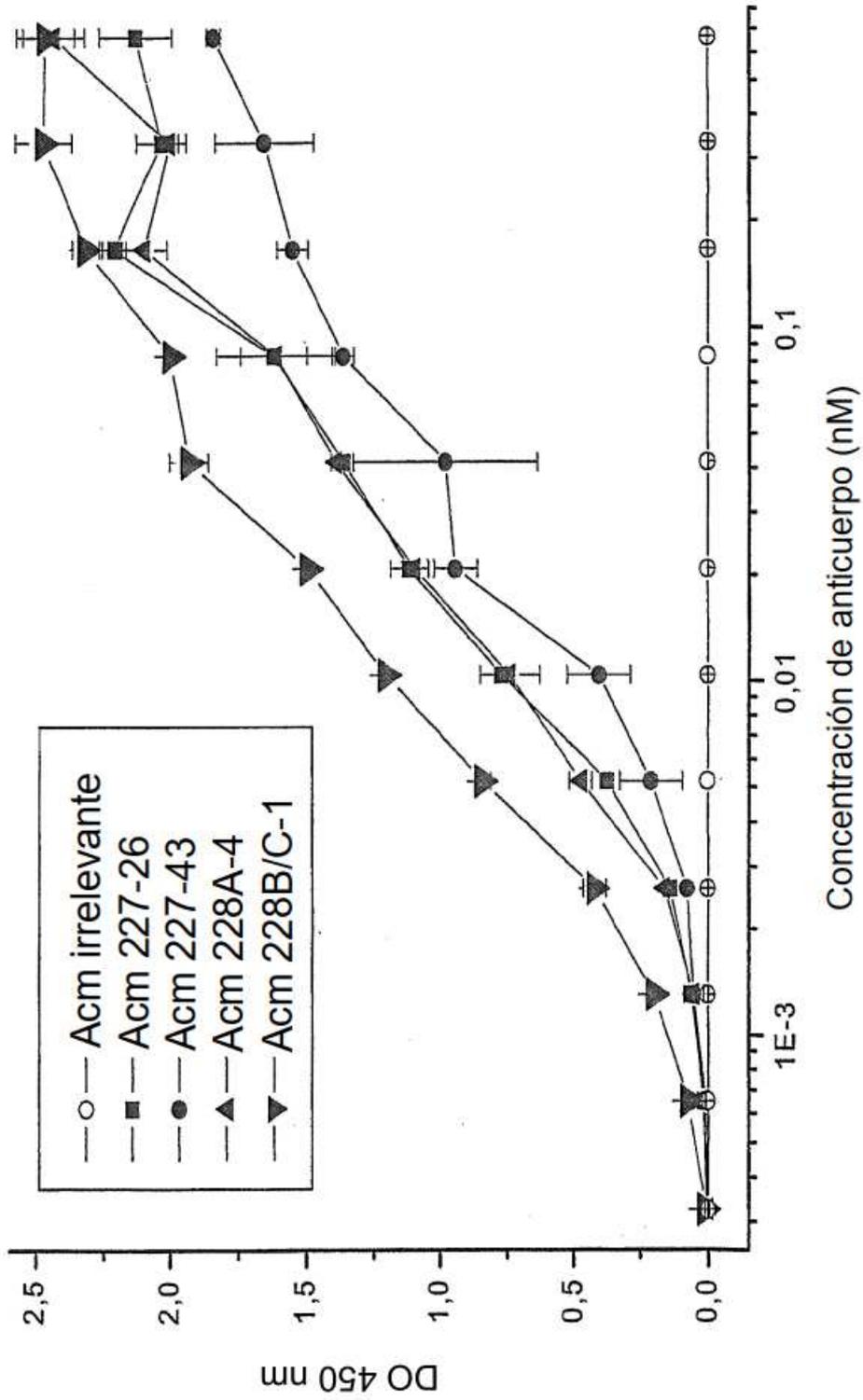
Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly  
225 230 235 240

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
245

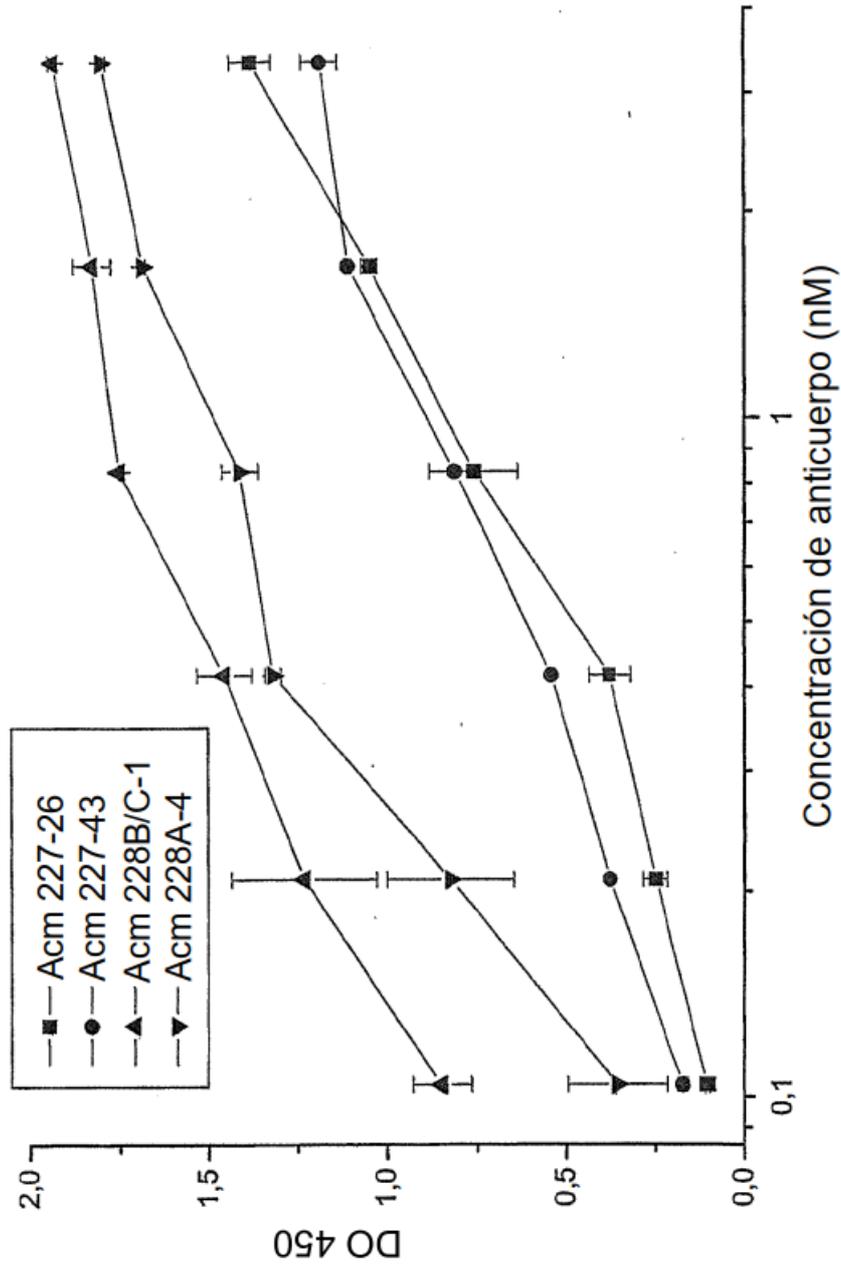
## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antagonista anti IL13 humano, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a la IL13 humana y un transportador fisiológicamente aceptable, en donde dicho anticuerpo anti IL13 humano comprende una región de cadena pesada variable que comprende las regiones determinantes de complementariedad CDRH1, CDRH2 y CDRH3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO:123 y SEQ ID NO:135, respectivamente, y una región de cadena ligera variable que comprende las regiones determinantes de complementariedad CDRL1, CDRL2 y CDRL3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO:104 y SEQ ID NO:115, respectivamente, y en donde dicho anticuerpo anti IL13 humano, o fragmento funcional del mismo, está formulado para administrarse por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea u oral.
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo anti IL13 humano es un anticuerpo humanizado.
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 o 2, en donde dicho anticuerpo anti IL13 humano comprende una región de cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la fórmula: FRH1-CDRH1-FRH2-CDRH2-FRH3-CDRH3-FRH4, en donde FRH1 consiste en SEQ ID NO: 65; CDRH1 consiste en SEQ ID NO: 117; FRH2 consiste en SEQ ID NO: 68; CDRH2 consiste en SEQ ID NO: 123; FRH3 consiste en SEQ ID NO: 80; CDRH3 consiste en SEQ ID NO: 135; y FRH4 consiste en SEQ ID NO: 92 y una región de cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la fórmula: FRL1-CDRL1-FRL2-CDRL2-FRL3-CDRL3-FRL4, en donde FRL1 consiste en SEQ ID NO: 21; CDRL1 consiste en SEQ ID NO: 99; FRL2 consiste en SEQ ID NO: 29; CDRL2 consiste en SEQ ID NO: 104; FRL3 consiste en SEQ ID NO: 31; CDRL3 consiste en SEQ ID NO: 115; y FRL4 consiste en SEQ ID NO: 58.
4. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho anticuerpo anti IL13 humano comprende una región de cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 142 y una región de cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 143.
5. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho anticuerpo anti IL13 humano, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une específicamente y con alta afinidad a la IL13 humana tanto glucosilada como no glucosilada, no se une a la IL13 de ratón, y neutraliza la actividad de la IL13 humana a una relación molar aproximada de 1:2 (AcM:IL13).
6. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho anticuerpo anti IL13 humano, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une al mismo epítipo que el anticuerpo producido por el hibridoma 228B/C-1 (PTA-5657).
7. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho anticuerpo anti IL13 humano es un anticuerpo monoclonal.
8. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho anticuerpo anti IL13 es un anticuerpo monovalente, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo monocatenario, un fragmento Fab, o un fragmento F(ab').
9. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho anticuerpo anti IL13 humano es un anticuerpo multiespecífico que es un anticuerpo biespecífico.
10. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su uso en la prevención de asma bronquial, rinitis alérgica, dermatitis alérgica o anafilaxia.
11. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su uso en el tratamiento de asma bronquial, asma alérgica, asma no alérgica, rinitis alérgica, dermatitis atópica, dermatitis alérgica, conjuntivitis alérgica, eccema, urticaria, alergias a los alimentos, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, colitis ulcerosa, infección por VRS (virus respiratorio sincicial), uveítis, esclerodermia u osteoporosis.
12. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su uso en el tratamiento de fibrosis pulmonar idiopática o enfermedad pulmonar inflamatoria y fibrótica.

**Fig. 1 Unión de los Acm anti IL13 con la IL-13 humana en un ensayo ELISA**



**Fig. 2 Unión de los Acm anti IL13 con MT-IL13/Fc**



**Fig. 3 El Acm anti-IL13 JES10-5A2 no compete con la unión del Acm 228B/C-1-HRP con IL-13 humana en un ensayo ELISA**

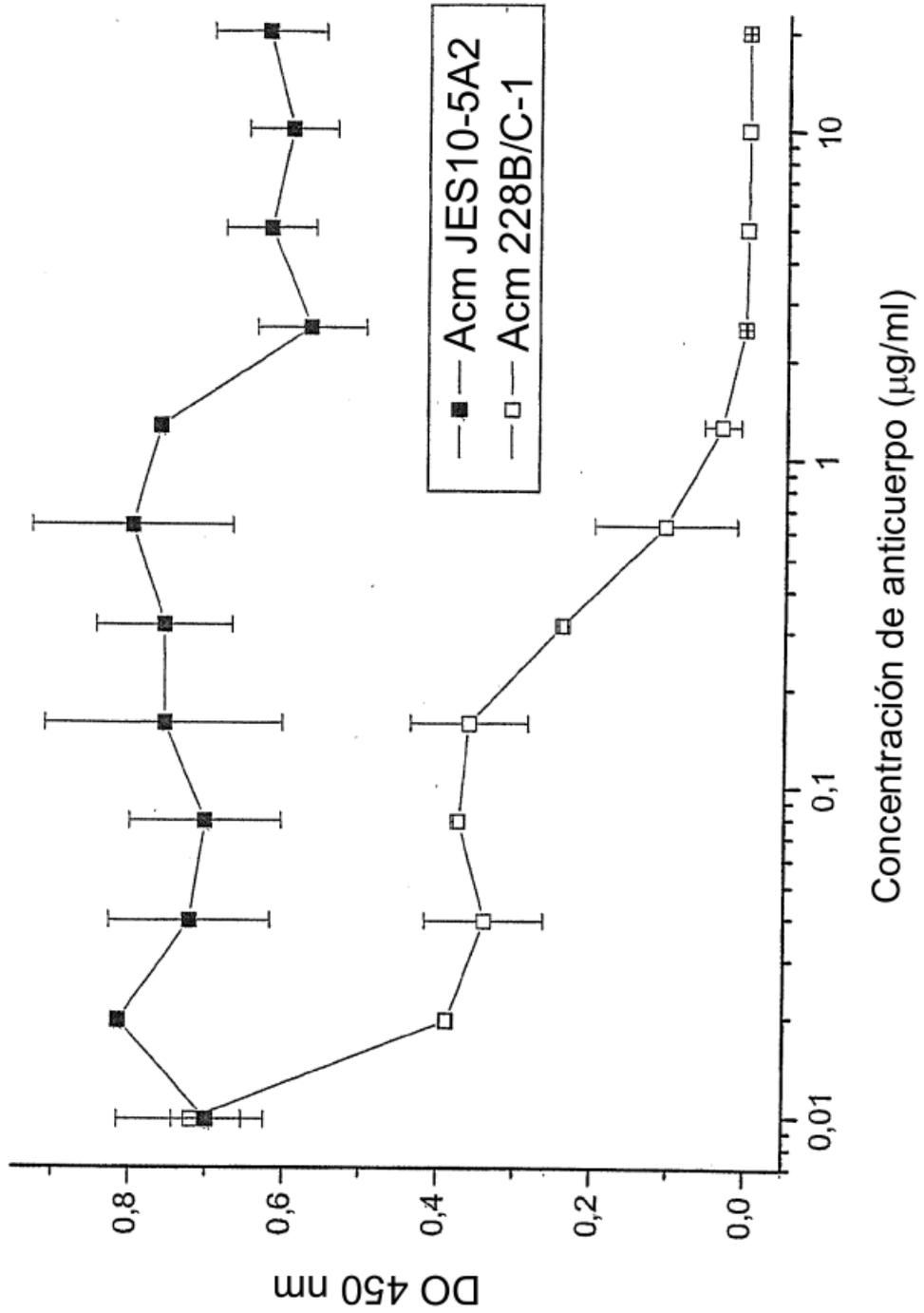
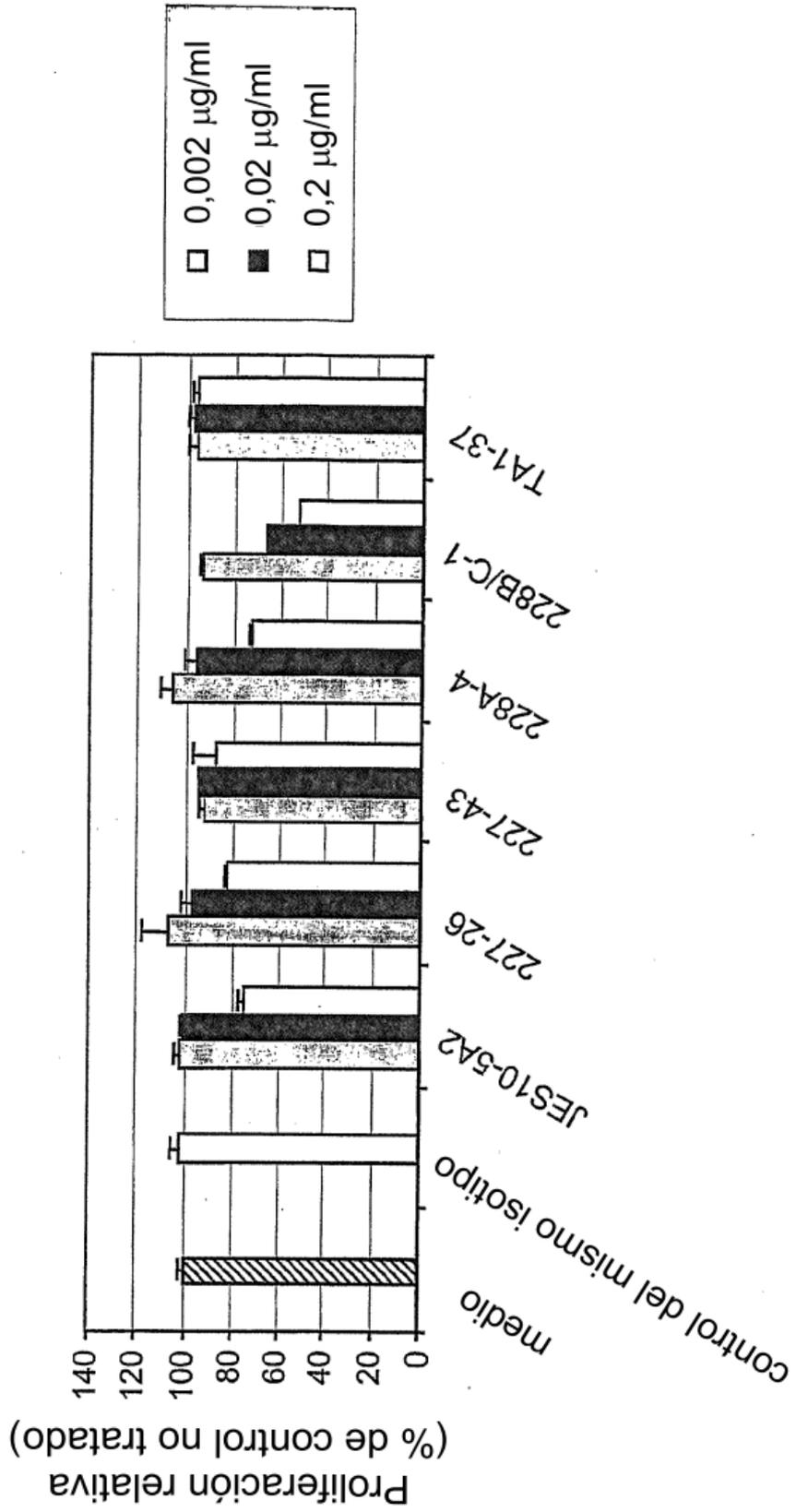
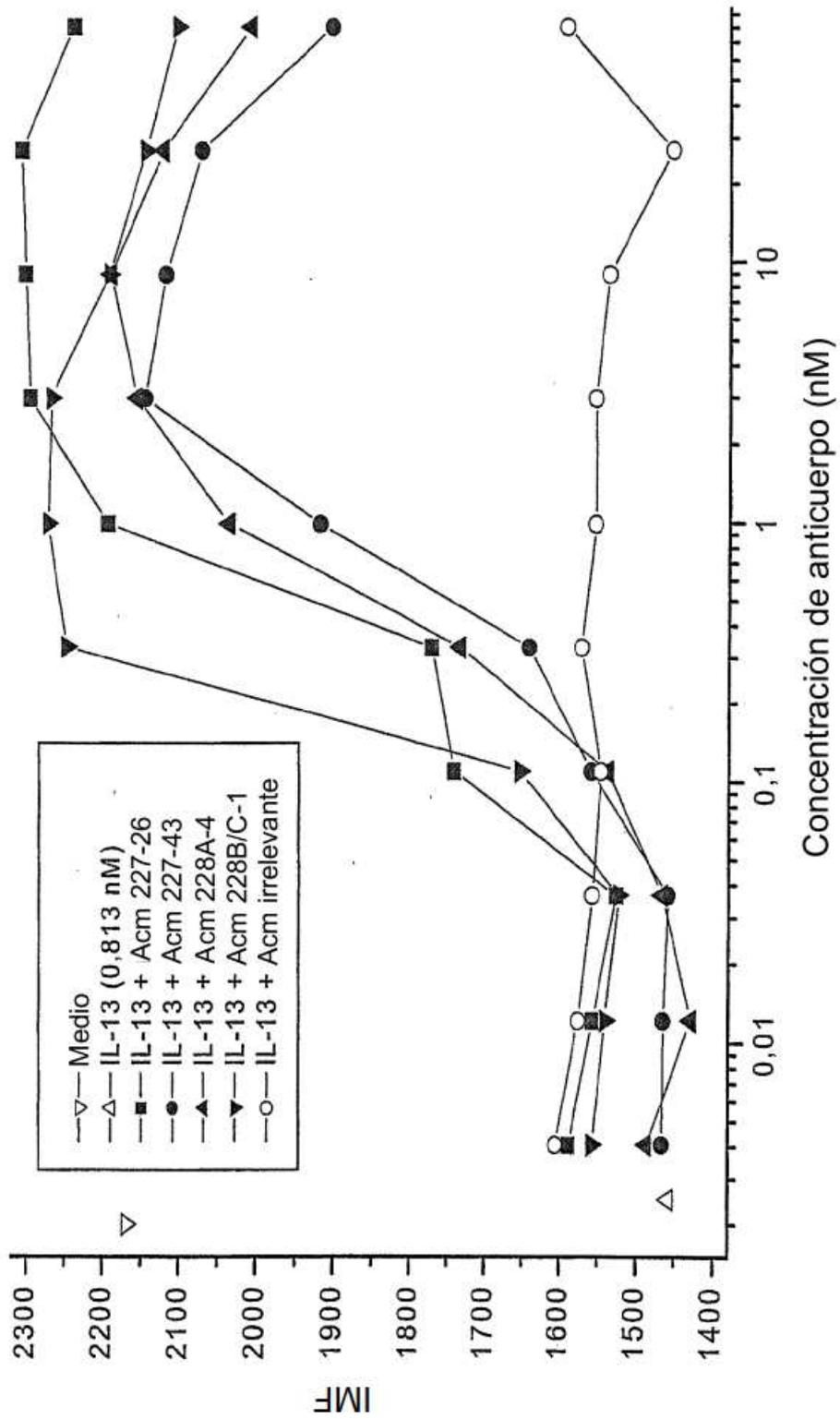


Fig. 4 Efecto de los Acm anti IL13 sobre la proliferación de células L-1236



**Fig. 5 Efecto de los Acm anti IL13 sobre la supresión inducida por IL13 de la expresión de CD14 en monocitos humanos**



**Fig. 6 Efecto de los Acm anti IL13 sobre la regulación positiva inducida por IL13 de la expresión de CD23 en monocitos humanos**

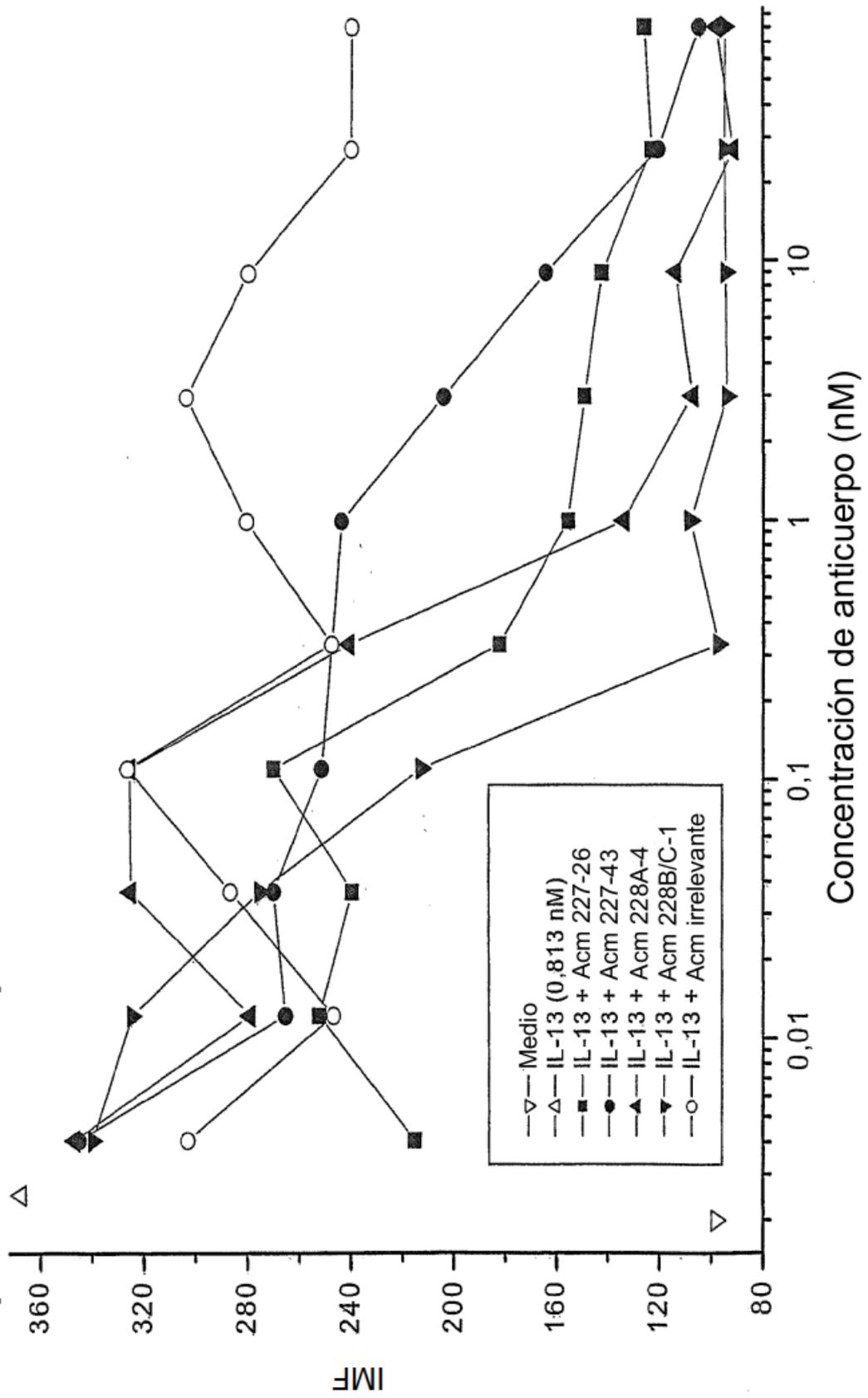
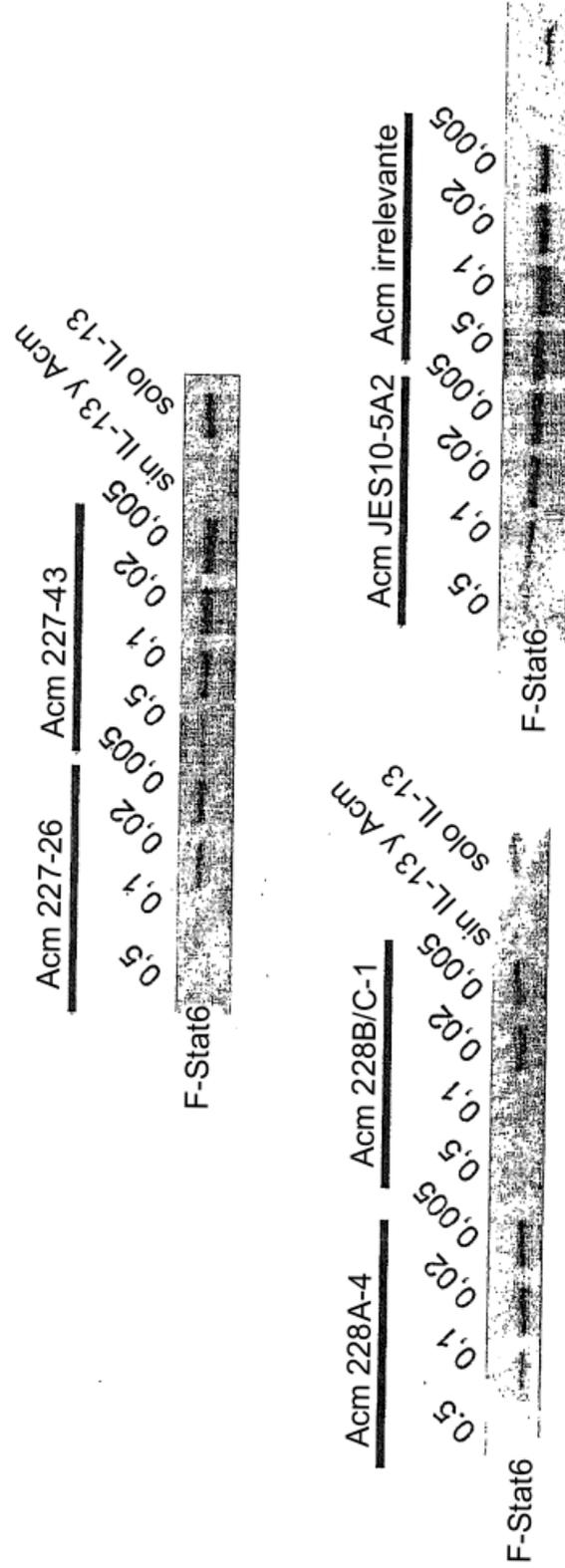


Fig. 7 Los Acm anti IL13 inhiben la fosforilación de Stat6 inducida por IL13 en células THP-1



**FIGURA 8**

**Anticuerpo 228B/C-1**  
**Cadena pesada (VH)**

1 Q V Q L Q E S G P G L V A P S Q S L S I T C T V S G F S L N A Y S V N W V 30  
 40 R Q P P G K G L E W L G M I W G D G K I V Y N S A L K S R L N I S K D S S 65 70  
 80 82 K S Q V F L K M S S L Q S D D T A R Y Y C A G D G Y Y P Y A M D N W G H G T 95 100 b c d e f 101  
 118 S V T V S S (SEQ ID NO 4)

**Cadena ligera (VK)**

10 N I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T I S C R A S K S V D S Y G N S F M H W 30  
 40 Y Q Q K P G Q P P K L L I Y L A S N L E S G V P A R F S G S G S R T D F T L T I 60 70  
 80 D P V E A D D A A S Y Y C Q Q N N E D P R T F G G G T K L E I K R A 113 (SEQ ID NO 3)

Subrayado: CDR de Kabat. Negrita/Cursiva: CDR1 de Chothia.

**FIGURA 9**  
**Anticuerpo 228A-4**  
**Cadena pesada (VH)**

1 10 20 30  
 Q V Q L K E S G P G L V A P S Q S L S I T C T V S G F S L T D Y N I N W I R Q  
 40 50 52a53 60 65 70  
 P P G K G L E W L G M I W G D G S T A Y N S A L K S R L S I S K D N S K S Q I F  
 80 82ab c 83 90 95 100 b c d e f 101 110  
 L K M N S L Q T E D T A R Y Y C A R D G Y F P Y A M A Y W G Q G T

<sup>118</sup>  
 S V T V S S (SEQ ID NO 6)

**Cadena ligera (VK)**

1 10 20 30  
 N I V L T Q S P T S L A V S L G Q R A T I S C R A S E S V D S Y G N G F I H W  
 40 50 60 70  
 Y Q Q K P G Q P P K L L I Y L A S N L E S G V P A R F S G S G S R T D F T L T I  
 80 90 100 113  
 D P M E A D D A A T Y Y C Q Q N N E D P R T F G G G T K L E I K R A (SEQ ID NO 5)

Subrayado: CDR de Kabat. Negrita/Cursiva: CDR1 de Chothia.

**FIGURA 10**  
**Anticuerpo 227-26**  
**Cadena pesada (VH)**

1 Q V Q L Q Q S G D D L V L P G A S V K L S C K A S G Y T F T S Y W I N W I 30  
 40 K Q R P G Q G L E W I G H I A P G S G S T Y F N E M F K G K A T L T V D T 70  
 80 S S S T A Y I Q L S S L S S E D S A V Y F C A R S D I F L S Y A M D Y W G Q 100 b c d e f  
 118 G T S V T V S S (SEQ ID NO 8)

**Cadena ligera (VK)**

1 D V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S I V H S N G N T Y L Q 30  
 40 W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K 70  
 80 I S R V E A E D L G V Y Y C F Q G S H V P Y T F G G G T K L E I K R A 114  
 (SEQ ID NO 7)

Subrayado: CDR de Kabat. Negrita/Cursiva: CDR1 de Chothia.









FIGURA 12A

CADENA VH

	FM1										FR2										SEF ID NO																									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	CDR1	35	37	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	CDR2	
Mujino 2018B/C	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	A	P	S	Q	S	L	S	I	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N	60	W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	L	G	67
DP27	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	A	P	S	Q	S	L	S	I	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N	61	W	V	R	Q	P	P	G	K	A	L	E	W	L	A	68
NEW	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	R	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N	62	W	V	R	Q	P	P	G	R	G	L	E	W	I	G	69
Clon 1	Q	V	T	L	R	E	S	G	P	A	L	V	K	P	T	Q	T	L	T	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	A	L	E	W	L	G	70
Clon 2	Q	V	T	L	R	E	S	G	P	A	L	V	K	P	T	Q	T	L	T	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	A	L	E	W	L	A	71
Clon 3	Q	V	T	L	R	E	S	G	P	A	L	V	K	P	T	Q	T	L	T	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	A	L	E	W	L	G	
Clon 4	Q	V	T	L	R	E	S	G	P	A	L	V	K	P	T	Q	T	L	T	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	A	L	E	W	L	G	
Clon 5	Q	V	T	L	R	E	S	G	P	A	L	V	K	P	T	Q	T	L	T	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	A	L	E	W	L	G	
HT2-NEW n° 1	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	R	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	L	G	
HT2-NEW n° 9	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	R	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	L	G	
HT2-NEW n° 14	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	R	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	L	G	
HT2-NEW n° 17	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	R	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	L	G	
HT2-NEW n° 21	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	R	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	L	G	
HT2-NEW n° 26	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	R	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	L	G	
HT2-NEW n° 65	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	R	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	L	G	
HT2-NEW n° 67	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	R	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	L	G	
HT2-NEW n° 70	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	R	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	A	L	E	W	L	G	
HT2-NEW n° 73	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	R	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	A	L	E	W	L	G	
HT2-NEW n° 74	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	R	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	L	G	
HT2-NEW n° 78	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	R	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	L	G	
HT2-NEW n° 79	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	R	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	L	G	
HT2-NEW n° 80	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	R	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	L	G	
HT2-NEW n° 87	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	R	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	L	G	
HT2-NEW n° 275	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	R	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	L	G	
HT2-NEW n° 284	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	R	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	L	G	
HT2-NEW n° 281	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	R	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	L	G	
HT2-NEW n° 300	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	R	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	L	G	
HT2-NEW n° 302	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	R	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	L	G	
HT2-NEW n° 322	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	R	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	L	G	
HT2-NEW n° 111	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	R	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	L	G	
HT2-NEW n° 115	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	R	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	L	G	
HT2-NEW n° 116	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	R	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	L	G	
HT2-NEW n° 117	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	R	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	L	G	
HT2-NEW n° 143	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	R	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	L	G	
HT2-NEW n° 162	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	R	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	L	G	
HT2-NEW n° 196	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	R	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	L	G	
HT2-NEW n° 177	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	R	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	L	G	
HT2-NEW n° 313	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	R	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	N		W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	L	G	



FIGURA 12B

SEQ ID NO	FR3	FR4	SEQ ID NO
66	R	R	76
67	L	L	77
68	I	L	78
69	S	T	79
70	K	D	80
71	D	S	81
72	T	S	82
73	S	K	83
74	S	S	84
75	K	N	85
76	S	K	86
77	K	N	87
78	N	O	88
79	O	V	89
80	V	V	90
81	V	V	91
82	V	V	92
83	V	V	93
84	V	V	94
85	V	V	95
86	V	V	96
87	V	V	97
88	V	V	98
89	V	V	99
90	V	V	100
91	V	V	101
92	V	V	102
93	V	V	103
94	V	V	104
95	V	V	105
96	V	V	106
97	V	V	107
98	V	V	108
99	V	V	109
100	V	V	110
101	V	V	111
102	V	V	112
103	V	V	113
104	V	V	114
105	V	V	115
106	V	V	116
107	V	V	117
108	V	V	118
109	V	V	119
110	V	V	120
111	V	V	121
112	V	V	122
113	V	V	123
114	V	V	124
115	V	V	125
116	V	V	126
117	V	V	127
118	V	V	128
119	V	V	129
120	V	V	130
121	V	V	131
122	V	V	132
123	V	V	133
124	V	V	134
125	V	V	135
126	V	V	136
127	V	V	137
128	V	V	138
129	V	V	139
130	V	V	140
131	V	V	141
132	V	V	142
133	V	V	143
134	V	V	144
135	V	V	145
136	V	V	146
137	V	V	147
138	V	V	148
139	V	V	149
140	V	V	150
141	V	V	151
142	V	V	152
143	V	V	153
144	V	V	154
145	V	V	155
146	V	V	156
147	V	V	157
148	V	V	158
149	V	V	159
150	V	V	160
151	V	V	161
152	V	V	162
153	V	V	163
154	V	V	164
155	V	V	165
156	V	V	166
157	V	V	167
158	V	V	168
159	V	V	169
160	V	V	170
161	V	V	171
162	V	V	172
163	V	V	173
164	V	V	174
165	V	V	175
166	V	V	176
167	V	V	177
168	V	V	178
169	V	V	179
170	V	V	180
171	V	V	181
172	V	V	182
173	V	V	183
174	V	V	184
175	V	V	185
176	V	V	186
177	V	V	187
178	V	V	188
179	V	V	189
180	V	V	190
181	V	V	191
182	V	V	192
183	V	V	193
184	V	V	194
185	V	V	195
186	V	V	196
187	V	V	197
188	V	V	198
189	V	V	199
190	V	V	200
191	V	V	201
192	V	V	202
193	V	V	203
194	V	V	204
195	V	V	205
196	V	V	206
197	V	V	207
198	V	V	208
199	V	V	209
200	V	V	210
201	V	V	211
202	V	V	212
203	V	V	213
204	V	V	214
205	V	V	215
206	V	V	216
207	V	V	217
208	V	V	218
209	V	V	219
210	V	V	220
211	V	V	221
212	V	V	222
213	V	V	223
214	V	V	224
215	V	V	225
216	V	V	226
217	V	V	227
218	V	V	228
219	V	V	229
220	V	V	230
221	V	V	231
222	V	V	232
223	V	V	233
224	V	V	234
225	V	V	235
226	V	V	236
227	V	V	237
228	V	V	238
229	V	V	239
230	V	V	240
231	V	V	241
232	V	V	242
233	V	V	243
234	V	V	244
235	V	V	245
236	V	V	246
237	V	V	247
238	V	V	248
239	V	V	249
240	V	V	250
241	V	V	251
242	V	V	252
243	V	V	253
244	V	V	254
245	V	V	255
246	V	V	256
247	V	V	257
248	V	V	258
249	V	V	259
250	V	V	260
251	V	V	261
252	V	V	262
253	V	V	263
254	V	V	264
255	V	V	265
256	V	V	266
257	V	V	267
258	V	V	268
259	V	V	269
260	V	V	270
261	V	V	271
262	V	V	272
263	V	V	273
264	V	V	274
265	V	V	275
266	V	V	276
267	V	V	277
268	V	V	278
269	V	V	279
270	V	V	280
271	V	V	281
272	V	V	282
273	V	V	283
274	V	V	284
275	V	V	285
276	V	V	286
277	V	V	287
278	V	V	288
279	V	V	289
280	V	V	290
281	V	V	291
282	V	V	292
283	V	V	293
284	V	V	294
285	V	V	295
286	V	V	296
287	V	V	297
288	V	V	298
289	V	V	299
290	V	V	300
291	V	V	301
292	V	V	302
293	V	V	303
294	V	V	304
295	V	V	305
296	V	V	306
297	V	V	307
298	V	V	308
299	V	V	309
300	V	V	310
301	V	V	311
302	V	V	312
303	V	V	313
304	V	V	314
305	V	V	315
306	V	V	316
307	V	V	317
308	V	V	318
309	V	V	319
310	V	V	320
311	V	V	321
312	V	V	322
313	V	V	323
314	V	V	324
315	V	V	325
316	V	V	326
317	V	V	327
318	V	V	328
319	V	V	329
320	V	V	330
321	V	V	331
322	V	V	332
323	V	V	333
324	V	V	334
325	V	V	335
326	V	V	336
327	V	V	337
328	V	V	338
329	V	V	339
330	V	V	340
331	V	V	341
332	V	V	342
333	V	V	343
334	V	V	344
335	V	V	345
336	V	V	346
337	V	V	347
338	V	V	348
339	V	V	349
340	V	V	350
341	V	V	351
342	V	V	352
343	V	V	353
344	V	V	354
345	V	V	355
346	V	V	356
347	V	V	357
348	V	V	358
349	V	V	359
350	V	V	360
351	V	V	361
352	V	V	362
353	V	V	363
354	V	V	364
355	V	V	365
356	V	V	366
357	V	V	367
358	V	V	368
359	V	V	369
360	V	V	370
361	V	V	371
362	V	V	372
363	V	V	373
364	V	V	374
365	V	V	375
366	V	V	376
367	V	V	377
368	V	V	378
369	V	V	379
370	V	V	380
371	V	V	381
372	V	V	382
373	V	V	383
374	V	V	384
375	V	V	385
376	V	V	386
377	V	V	387
378	V	V	388
379	V	V	389
380	V	V	390
381	V	V	391
382	V	V	392
383	V	V	393
384	V	V	394
385	V	V	395
386	V	V	396
387	V	V	397
388	V	V	398
389	V	V	399
390	V	V	400
391	V	V	401
392	V	V	402
393	V	V	403
394	V	V	404
395	V	V	405
396	V	V	406
397	V		

FIGURA 12D

SEQ ID NO	FR4 ID NO	CDRS1	CDRS2	CDRS3	CDRS4	CDRS5	CDRS6	CDRS7	CDRS8	CDRS9	CDRS10	CDRS11	CDRS12	CDRS13
66	66	RL	IS	IS	IS	IS								
67	67	LN	IS	IS	IS	IS								
68	68	LN	IS	IS	IS	IS								
69	69	LN	IS	IS	IS	IS								
70	70	LN	IS	IS	IS	IS								
71	71	LN	IS	IS	IS	IS								
72	72	LN	IS	IS	IS	IS								
73	73	LN	IS	IS	IS	IS								
74	74	LN	IS	IS	IS	IS								
75	75	LN	IS	IS	IS	IS								
76	76	LN	IS	IS	IS	IS								
77	77	LN	IS	IS	IS	IS								
78	78	LN	IS	IS	IS	IS								
79	79	LN	IS	IS	IS	IS								
80	80	LN	IS	IS	IS	IS								
81	81	LN	IS	IS	IS	IS								
82	82	LN	IS	IS	IS	IS								
83	83	LN	IS	IS	IS	IS								
84	84	LN	IS	IS	IS	IS								
85	85	LN	IS	IS	IS	IS								
86	86	LN	IS	IS	IS	IS								
87	87	LN	IS	IS	IS	IS								
88	88	LN	IS	IS	IS	IS								
89	89	LN	IS	IS	IS	IS								
90	90	LN	IS	IS	IS	IS								

FIGURA 13 A

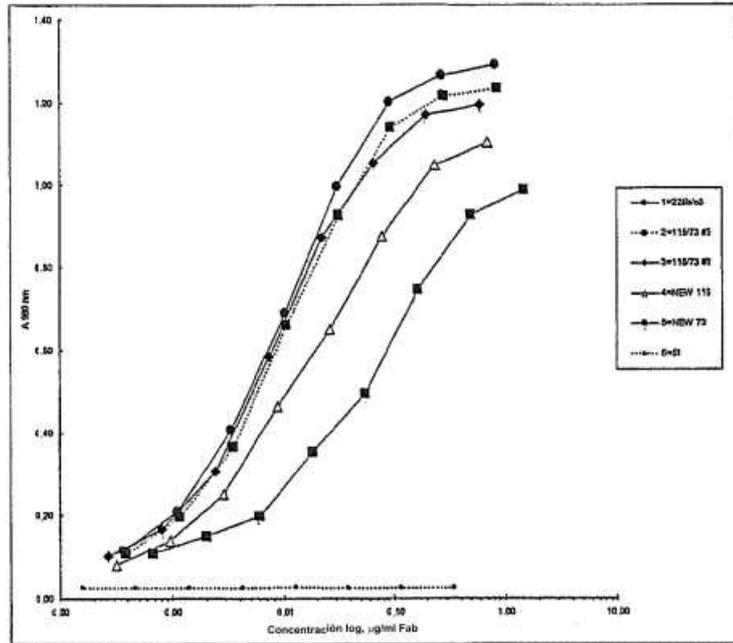


FIGURA 13 B

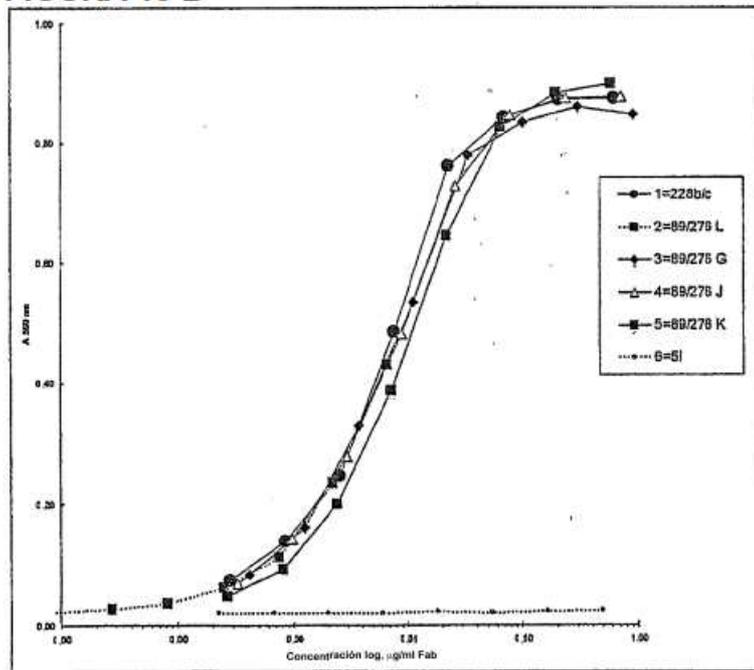


FIGURA 13 C

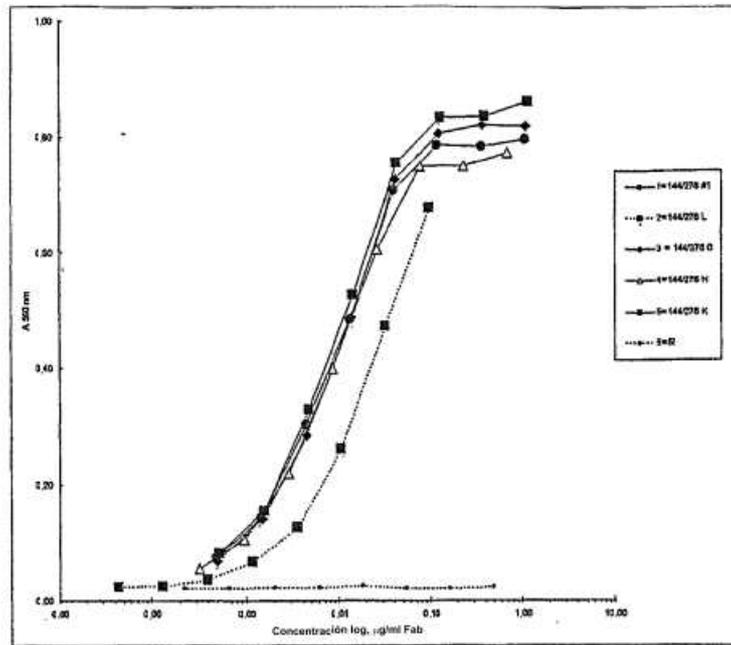


FIGURA 13 C

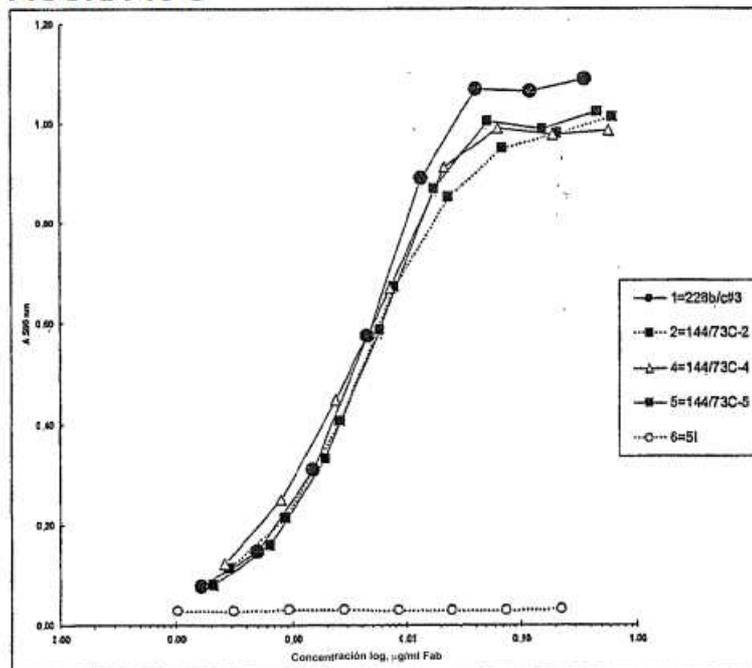


FIGURA 14 A

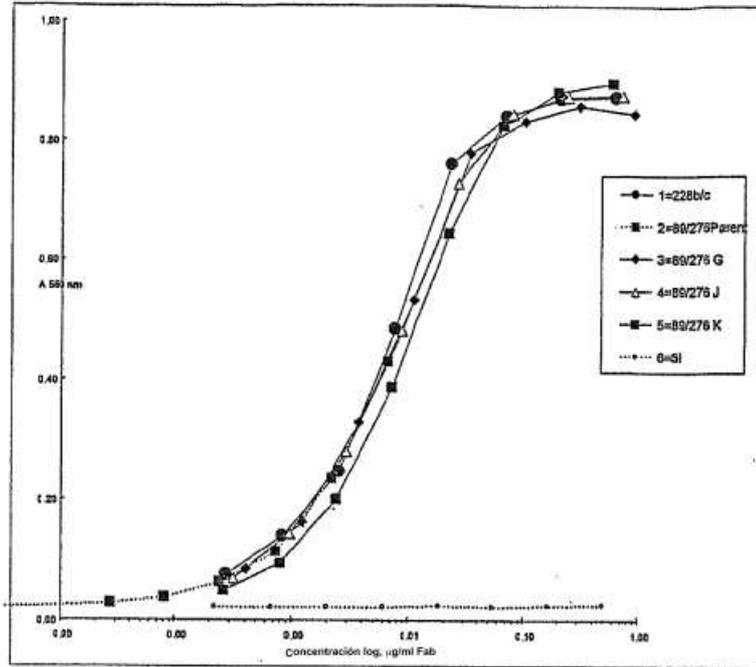


FIGURA 14B

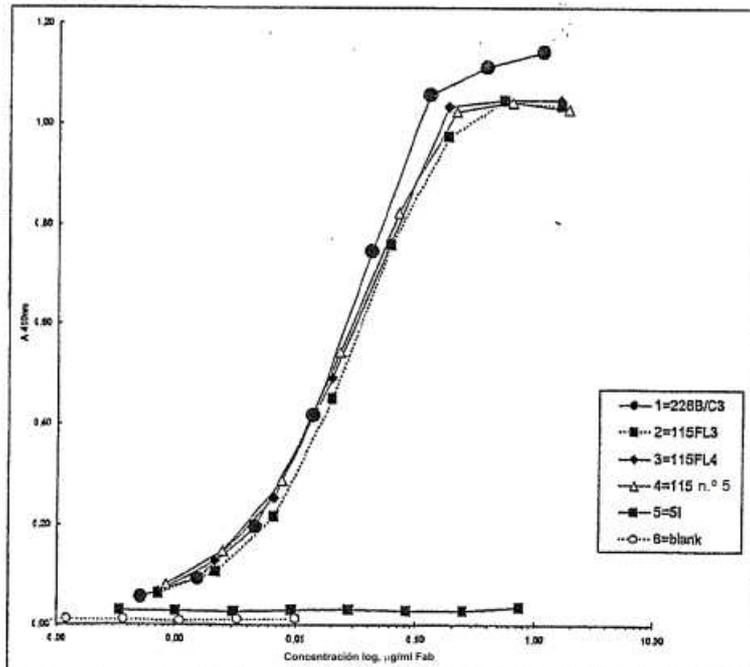


FIGURA 15

L1-59  
(precursor)

CDR-L1	R	A	S	K	S	V	D	S	Y	G	Q	S	F	M	H
CL-5	R	A	S	K	S	V	D	S	Y	G	Q	S	F	M	H
CL-13	R	A	S	K	S	V	D	S	Y	G	Q	S	F	M	H
CL-42	R	A	S	K	S	V	D	S	Y	G	Q	S	F	M	H
CL-48	R	A	S	K	S	V	D	S	Y	G	Q	S	F	M	H
CL-50	R	A	S	K	S	V	D	S	Y	G	Q	S	F	M	H
CL-56	R	A	S	K	S	V	D	S	Y	G	Q	S	F	M	H
CL-65	R	A	S	K	S	V	D	S	Y	G	Q	S	F	M	H
CL-69	R	A	S	K	S	V	D	S	Y	G	Q	S	F	M	H
CL-82	R	A	S	K	S	V	D	S	Y	G	Q	S	F	M	H
CL-94	R	A	S	K	S	V	D	S	Y	G	Q	S	F	M	H

L1-59  
(precursor)

CDR-L3	Q	Q	N	N	E	D	P	R	T
CL-5	Q	Q	N	A	E	D	P	R	T
CL-13	Q	Q	N	N	E	D	P	R	T
CL-42	Q	Q	N	A	E	D	P	R	T
CL-48	Q	Q	N	N	E	D	P	R	T
CL-50	Q	Q	N	A	E	D	P	R	T
CL-56	Q	Q	N	A	E	D	P	R	T
CL-65	Q	Q	N	N	E	D	P	R	T
CL-69	Q	Q	N	A	E	D	P	R	T
CL-82	Q	Q	N	N	E	D	P	R	T
CL-94	Q	Q	N	A	E	D	P	R	T

L1-59  
(precursor)

CDR-H1	A	Y	S	V	N
CL-5	A	Y	S	V	N
CL-13	A	K	S	V	N
CL-42	A	N	S	V	N
CL-48	A	N	S	V	N
CL-50	A	K	S	V	N
CL-56	A	K	S	V	N
CL-65	A	S	S	V	N
CL-69	A	N	S	V	N
CL-82	A	N	S	V	N
CL-94	A	N	S	V	N

L1-59  
(precursor)

CDR-H3	D	G	Y	Y	P	Y	A	M	D	N
CL-5	D	G	Y	Y	P	Y	A	M	K	N
CL-13	D	G	Y	Y	P	Y	A	M	S	N
CL-42	D	G	Y	Y	P	Y	A	M	K	N
CL-48	D	G	Y	Y	P	Y	A	M	K	N
CL-50	D	G	Y	Y	P	Y	A	M	K	N
CL-56	D	G	Y	Y	P	Y	A	M	S	N
CL-65	D	G	R	Y	P	Y	A	M	K	N
CL-69	D	G	Y	Y	P	Y	A	M	D	N
CL-82	D	G	Y	Y	P	Y	A	M	K	N
CL-94	D	G	Y	Y	P	Y	A	M	K	N

FIGURA 16

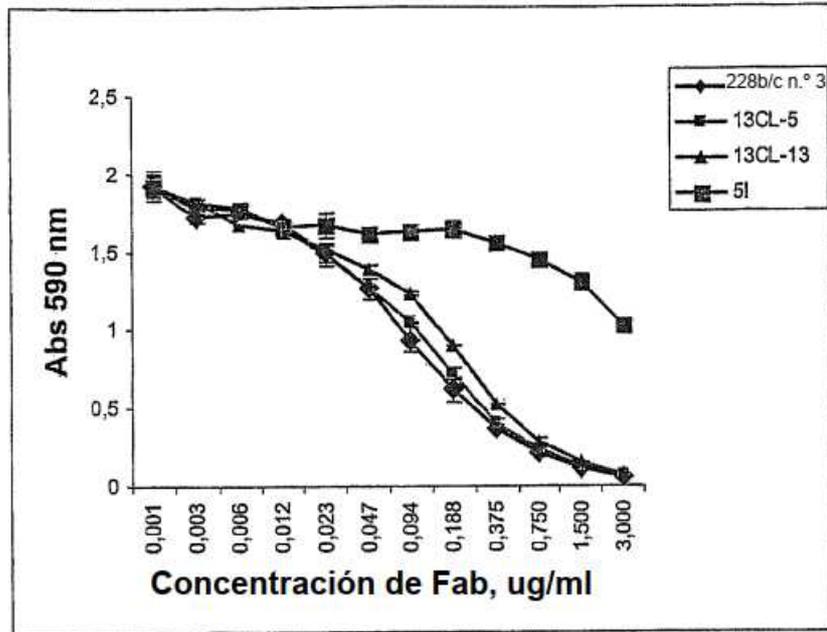


Figura 17 Secuencias de aminoácidos de la región variable de candidatos anti IL13

CL-5 (Candidato madurado por afinidad) Vh:  
 DIVMTQSPDLSVSLGERATINCRASKSVDSYGQSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVDPDRFSGSGGTDFT  
 LTISSLQAEDVAVYYCQQNAEDPRTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO 93)

CL-5 (Candidato madurado por afinidad) Vh:  
 QVTLRESGPALVKPTQTLTCTGSGFSLSAYSYNWIRQPPGKALEWLA MIWGGDGKIVYNSALKSRLTISKDTSKN  
 QVVLTMNMDPVDATYYCAVDGYYPYAMKNWGGSLVTVSS (SEQ ID NO 94)

CL-13 (Candidato madurado por afinidad) Vh:  
 DIVMTQSPDLSVSLGERATINCRASKSVDSYGQSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVDPDRFSGSGGTDFT  
 LTISSLQAEDVAVYYCQONNEDPRTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO 95)

CL-13 (Candidato madurado por afinidad) Vh:  
 QVTLRESGPALVKPTQTLTCTGSGFSLSAKSVNWIRQPPGKALEWLA MIWGGDGKIVYNSALKSRLTISKDTSKN  
 QVVLTMNMDPVDATYYCAVDGYYPYAMSNWGGSLVTVSS (SEQ ID NO 96)

CL-50 (Candidato madurado por afinidad) Vh:  
 DIVMTQSPDLSVSLGERATINCRASKSVDSYGQSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVDPDRFSGSGGTDFT  
 LTISSLQAEDVAVYYCQQNAEDPRTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO 97)

CL-50 (Candidato madurado por afinidad) Vh:  
 QVTLRESGPALVKPTQTLTCTGSGFSLSAKSVNWIRQPPGKALEWLA MIWGGDGKIVYNSALKSRLTISKDTSKN  
 QVVLTMNMDPVDATYYCAVDGYYPYAMKNWGGSLVTVSS (SEQ ID NO 98)





FIGURA 20

<b>CDR-L1</b>			<b>CDR-H1</b>		
P	RASKSVDSYGNSFMH	SEQ ID NO 99	P	AYSVN	SEQ ID NO 117
V1	RASKSVDSYGQSFMH	SEQ ID NO 100	V1	AKSVN	SEQ ID NO 118
V2	RASKSVDSYGQSFHLH	SEQ ID NO 101	V2	ANSVN	SEQ ID NO 119
V3	RASKSVDSYGNSYMH	SEQ ID NO 102	V3	GYSVN	SEQ ID NO 120
V4	RASKSVDSYGNSFLH	SEQ ID NO 103	V4	AHSVN	SEQ ID NO 121
			V5	ARSVN	SEQ ID NO 122
<b>CDR-L2</b>			<b>CDR-H2</b>		
P	LASNLES	SEQ ID NO 104	P	MIWGDGKIVYNSALKS	SEQ ID NO 123
V1	LASNLNS	SEQ ID NO 105	V1	MIWGDGKISYNSALKS	SEQ ID NO 124
V2	LASNLQS	SEQ ID NO 106	V2	MIWGDGKIVYNSALES	SEQ ID NO 125
V3	LATNLES	SEQ ID NO 107	V3	MIWGDGKIVYNSALKS	SEQ ID NO 126
V4	LASNLKS	SEQ ID NO 108	V4	MIWGDGKIVYNSDLKS	SEQ ID NO 127
V5	LASNLEK	SEQ ID NO 109	V5	MIWGDGKVVYNSALKS	SEQ ID NO 128
V6	LASRLS	SEQ ID NO 110	V6	MIWGDGKIVYNSSELKS	SEQ ID NO 129
V7	LASNLHS	SEQ ID NO 111	V7	MIWGDGKIAVYNSALKS	SEQ ID NO 130
V8	LASNLSS	SEQ ID NO 112	V8	MIWGDGKIVYNSALKE	SEQ ID NO 131
V9	LASFLES	SEQ ID NO 113	V9	MVWGDGKIVYNSALKS	SEQ ID NO 132
V10	LANNLES	SEQ ID NO 114	V10	MIWGDGKIVYNSALAS	SEQ ID NO 133
			V11	MIWGDGKIVYNSALKS	SEQ ID NO 134
<b>CDR-L3</b>			<b>CDR-H3</b>		
P	QQNNEDPRT	SEQ ID NO 115	P	DGYYPYAMDND	SEQ ID NO 135
V1	QQNAEDPRT	SEQ ID NO 116	V1	DGRYPYAMDND	SEQ ID NO 136
			V2	DGYYPYAMKND	SEQ ID NO 137
			V3	DGRYPYAMKND	SEQ ID NO 138
			V4	DGYYPYAMSN	SEQ ID NO 139
			V5	DGYYPYAMAN	SEQ ID NO 140
			V6	DGYYPYALDN	SEQ ID NO 141

Figura 21A: Secuencias de aminoácidos de la región variable para determinados candidatos anti IL 13:

CL-89 Vh (SEQ ID NO: 142):

DIVMTQSPDLSVSLGERATINCRAKSVDSYGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVDPDRFSGSGGT  
DFTLTISLQAEDVAVYYCQNNEDPRIFGGGTKVEIKR

CL-276G Vh (SEQ ID NO 143):

QVTLRESGPALVKPTQTLTCTVSGFSL SAYSVNWIRQPPGKALEWLA MIWGDGKIVYNSALKSRLTISKDTS  
KNQVVLTMTNMDPVDATYYCAGDGYYPYAMD~~NW~~GGSLVTVSS

RL-36 (Candidato de biblioteca aleatoria) Vk (SEQ ID NO 144):

DIVMTQSPDLSVSLGERATINCRAKSVDSYGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVDPDRFSGSGGT  
DFTLTISLQAEDVAVYYCQNNEDPRIFGGGTKVEIKR

RL-36 (Candidato de biblioteca aleatoria) Vh (SEQ ID NO 145):

QVTLRESGPALVKPTQTLTCTVSGFSL SAYSVNWIRQPPGKALEWLA MIWGDGKIVYNSALKSRLTISKDTS  
KNQVVLTMTNMDPVDATYYCAVDGYYYPYAMD~~NW~~GGSLVTV  
SS

RL-39 (Candidato de biblioteca aleatoria) Vh (SEQ ID NO 146):

QVTLRESGPALVKPTQTLTCTVSGFSL SAYSVNWIRQPPGKALEWLA MIWGDGKIVYNSALKSRLTISKDTS  
KNQVVLTMTNMDPVDATYYCALDGYYPYAMD~~NW~~GGSLVTV  
SS

Figura 21B: Secuencias de aminoácidos de la región variable para determinados candidatos anti IL 13:

RL-11 (Candidato de biblioteca aleatoria) Vh (SEQ ID NO 147):

QVTLRESGPALVKPTQTLTCTTSGFSLAYSVNWIRPPGKALEWLA MIWGDGKIVYNSALKSRLLTISKDTS  
KNQVVLTMNDPVDATYYCAVDGYPYAMDNDWGGSLVTV  
SS

RL-8 (Candidato de biblioteca aleatoria) Vh (SEQ ID NO 148):

QVTLRESGPALVKPTQTLTCTTSGFSLAYSVNWIRPPGKALEWLA MIWGDGKIVYNSALKSRLLTISKDTSK  
NQVVLTMNDPVDATYYCASDGYYPYAMDNDWGGSLVTV  
SS

RL-45 (Candidato de biblioteca aleatoria) Vh (SEQ ID NO 149):

QVTLRESGPALVKPTQTLTCTTSGFSLAYSVNWIRPPGKALEWLA MIWGDGKIVYNSALKSRLLTISKDTS  
KNQVVLTMNDPVDATYYCATDGYYPYAMDNDWGGSLVTV  
SS

RL36-L1.59 (Candidato L1 madurado por afinidad) Vk (SEQ ID NO 150):

DIVMTQSPDSL SVSLGERATINCRASKSVDSYGQSFMHWYQQKPGQPKLLIYLASNLESGVDPDRFSGSGSGT  
DFTLTISLQAEDVAVYCCQNNEDPRIFGGGKVEIKR

RL36-L1.59 (Candidato L1 madurado por afinidad) Vh (SEQ ID NO 151):

QVTLRESGPALVKPTQTLTCTTSGFSLAYSVNWIRPPGKALEWLA MIWGDGKIVYNSALKSRLLTISKDTS  
KNQVVLTMNDPVDATYYCAVDGYPYAMDNDWGGSLVTVSS

Candidato de scFV n.º 212 (SEQ ID NO 152):

QVTLRESGPALVKPTQTLTCTTSGFSLAYSVNWIRPPGKALEWLA MIWGDGKIVYNSALKSRLLTISKDTS  
KNQVVLTMNDPVDATYYCAGDGYYPYAMDNDWGGSLVTV  
SSGGSSRSSSSGGGGGGGDIJMTQSPDSL SVSLGERATINCRASKSVDSYGNSFMHWYQQKPGQPPKLLI  
YLAASNLESGVDPDRFSGSGTDFLTLTISVQAEDVAVYCCQN  
NEDPRIFGGGKVEIKR