



STaw 2:

BT W/ 288

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA



Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

09-123670

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO "ANTICUERPOS CONTRA LA
IL-25"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE MEDICAL RESEARCH COUNCIL

DOMICILIO LONDON W1B 1AL, REINO UNIDO

74. APODERADO HUMBERTO RUBIO CAMACHO
COD. 4134

22. BOGOTÁ, D.C., 3 DE NOVIEMBRE /2009



No. 09-123670-00000-0000

Fecha: 2009-11-03 15:10:14 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 68

PETITORIO

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I Capítulo II

SOLICITANTE (71) Nombre: **MEDICAL RESEARCH COUNCIL**
Dirección: **20 Park Crescent**
Teléfono: **3132408** Fax: **3131647**
Domicilio: **LONDRES W1B 1AL, REINO UNIDO**
Lugar de constitución: **LONDRES W1B 1AL, REINO UNIDO**

REPRESENTANTE (74) Nombre: **HUMBERTO RUBIO CAMACHO** IDENTIFICACIÓN
O APODERADO Dirección: **Carrera 7 No. 74 - 64, Of. 506** C.C. **17'192.062**
Teléfono: **3132408** Fax: **3131647** T.P. **50.007 CSJ**

INVENTOR(ES) (72) Nombre y Dirección: **1- Andrew Neil James MACKENZIE**
Medical Research Council, Laboratory of Molecular Biology, Hills Road,
Cambridge, Cambridgeshire CB2 2QH, Reino Unido
2- Sarah BALLANTYNE
Medical Research Council, Laboratory of Molecular Biology, Hills
Road, Cambridge, Cambridgeshire CB2 2QH, Reino Unido

PCT (86)

Solicitud Internacional No. **PCT/GB2008/001365** Fecha **17 DE ABRIL DE 2008**
Publicación Internacional No. **WO 2008/129263** Fecha **30 DE OCTUBRE DE 2008**

TITULO (54) "ANTICUERPOS CONTRA LA IL-25"

Clasificación Internacional (51) **C07K 16/24 A61P 11/06 A61K 39/395**

Prioridad	(33) País de origen	(32) Fecha	(31) Número de solicitud
SI ☒ NO	REINO UNIDO	0707505.4	18 DE ABRIL DE 2007
	ESTADOS UNIDOS		
	DE AMERICA	60/912,474	18 DE ABRIL DE 2007

Comprobante de pago No. **09-81,709** Fecha: **30 DE OCTUBRE DE 2009**
09-81,711 **30 DE OCTUBRE DE 2009**

**EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION
DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL**

(21) No. SOLICITUD: (51) INT. CL.:
(22) FECHA DE PRESENTACIÓN: (71) SOLICITANTE: **MEDICAL RESEARCH COUNCIL**
(30) PRIORIDAD: **BRITANICA
ESTADOUNIDENSE**
(31) No. DE SOLICITUD: **0707505.4** (72) INVENTORES: **1- Andrew Neil James MACKENZIE
60/912,474 2- Sarah BALLANTYNE**
(32) FECHA DE PRESENTACIÓN: **18 DE ABRIL DE 2007**
(33) PAÍS: **REINO UNIDO** (74) APODERADO: **Humberto RUBIO CAMACHO
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**

Solicitud Internacional No. **PCT/GB2008/001365** Fecha **17 DE ABRIL DE 2008**
Publicación Internacional No. **WO 2008/129263** Fecha **30 DE OCTUBRE DE 2008**

FECHA ENTRADA EN FASE NACIONAL:

(54) TITULO: "ANTICUERPOS CONTRA LA IL-25"

RESUMEN:

Un miembro de unión a diana que se une a IL-25 y que comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente como la indicada en la SEC ID N°: 7.

ANEXOS

- X Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- X Comprobante de pago de la tasa por excedente de Reivindicaciones.
Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
Poderes, si fuere el caso.
Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
Declaraciones
- X Copia de la publicación PCT
- X Copia informe búsqueda internacional.
Copia de Opinión escrita
- X Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
Copia del informe del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional (IPEA). (Incluye modificaciones)
Traducción de los anexos del examen preliminar internacional.
Copia de las modificaciones efectuadas de acuerdo con el Artículo PCT en Fase Nacional.
De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
Arte final 12 x 12
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- X Otros - Informe Preliminar Internacional de Patentabilidad Cap 1 (Form PCT/IB/273) y Opinión escrita emitida por la Autoridad encargada
- Listado de secuencias

(11) Figura característica:

(12)

HUMBERTO RUBIO CAMACHO

FIRMA



C.C. 17'192.062 de Bogotá

T.P. 50.007 Consejo Superior de
La Judicatura

PARA USO EXCLUSIVO DE
HUMBERTO RUBIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-123670- -00000-0000

Fecha: 2009-11-03 15:10:14 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 68

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 81,709
FECHA : OCTUBRE 30 DE 2009

SOLICITUD DE PATENTE FASE NACIONAL
PCT/GB2008/001365

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
HUMBERTO RUBIO & CIA ABOG	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	104934336	30/10/2009	1,996,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

PARA USO EXCLUSIVO DE
HUMBERTO RUBIO & CIA. LTDA.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 8001760

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-123670- -00000-0000

Fecha: 2009-11-03 15:10:14

Dep. 2020 NUECREACIONE

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 68

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 81,711

FECHA : OCTUBRE 30 DE 2009

EXCEDENTE REIVINDICACIONES PATENTE FASE NACIONAL
PCT/GB2008/001365

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
HUMBERTO RUBIO & CIA ABOG	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	104934336	30/10/2009	1,996,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
10	50005-01-01	SOLICITUDES	
		*** REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL	250,000.00
		TOTAL :	\$ 250,000.00

SON: DOSCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
30 October 2008 (30.10.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/129263 A1

(51) International Patent Classification:

C07K 16/24 (2006.01) A61P 11/06 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/GB2008/001365

(22) International Filing Date: 17 April 2008 (17.04.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

0707505.4 18 April 2007 (18.04.2007) GB
60/912,474 18 April 2007 (18.04.2007) US

(71) Applicant (for all designated States except US): MEDICAL RESEARCH COUNCIL [—/GB]; 20 Park Crescent, London W1B 1AL (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): MCKENZIE, Andrew, Neil, James [GB/GB]; Medical Research Council, Laboratory of Molecular Biology, Hills Road, Cambridge, Cambridgeshire CB2 2QH (GB). BALLANTYNE, Sarah [GB/GB]; Medical Research Council, Laboratory of Molecular Biology, Hills Road, Cambridge, Cambridgeshire CB2 2QH (GB).

(74) Agents: BRASNETT, Adrian et al.; Mewburn Ellis LLP, York House, 23 Kingsway, London, Greater London WC2B 6HP (GB).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaration under Rule 4.17:

— of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

— with international search report
— with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

(54) Title: ANTIBODIES AGAINST IL-25

(57) Abstract: The invention provides the antibody 2C3 and target binding members based on 2C3 which binds interleukin-25. These are useful in therapy, e.g. the treatment of asthma.

WO 2008/129263 A1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2008/001365

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/24 A61K39/395 A61P11/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, CHEM ABS Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	BALLANTYNE ET AL: "Blocking IL-25 prevents airway hyperresponsiveness in allergic asthma" JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, MOSBY - YEARLY BOOK, INC, US, vol. 120, no. 6, 1 December 2007 (2007-12-01); pages 1324-1331, XP022383425 ISSN: 0091-6749 the whole document ----- -/--	1-25

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the International filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 August 2008

Date of mailing of the international search report

14/08/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bernhardt, Wiebke

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

international application No
PCT/GB2008/001365

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	ANGKASEKWINAI PORNPIMON ET AL: "Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses." THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE 9 JUL 2007, vol. 204, no. 7, 9 July 2007 (2007-07-09), pages 1509-1517, XP009104230 ISSN: 0022-1007 abstract; figure 2D page 1515, right-hand column	1-25
Y	ANGKASEKWINAI ET AL: "The Role Of IL-25 In Airway Allergic Response" JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, MOSBY - YEARLY BOOK, INC, US, vol. 119, no. 1, 1 January 2007 (2007-01-01), page S134, XP005756443 ISSN: 0091-6749 abstract	1-4,8-25
Y	US 2003/008815 A1 (CHEN JIAN [US] ET AL CHEN JIAN [US] ET AL) 9 January 2003 (2003-01-09) paragraphs [0021] - [0024], [0106]; figures 5,6; examples 3,15; sequences 5, 6	1-4,8-25
Y	DAVIES J ET AL: "Affinity improvement of single antibody VH domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding" IMMUNOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, NL, vol. 2, no. 3, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 169-179, XP004070292 ISSN: 1380-2933 abstract	1,8-25
Y	HOLT L J ET AL: "Domain antibodies: proteins for therapy" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 11, 1 November 2003 (2003-11-01), pages 484-490, XP004467495 ISSN: 0167-7799 abstract	1,8-25
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2008/001365

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LITTLE M ET AL: "Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies" IMMUNOLOGY TODAY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 8, 1 August 2000 (2000-08-01), pages 364-370, XP004215163 ISSN: 0167-5699 page 367; figure 3	2-4, 8-25
A	SHARKHUU T ET AL: "Mechanism of interleukin-25 (IL-17E)-induced pulmonary inflammation and airways hyper-reactivity." CLINICAL AND EXPERIMENTAL ALLERGY : JOURNAL OF THE BRITISH SOCIETY FOR ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY DEC 2006, vol. 36, no. 12, December 2006 (2006-12), pages 1575-1583, XP009104227 ISSN: 0954-7894 abstract; figures 1-4	1-25
A	TAMACHI ET AL: "IL-25 enhances allergic airway inflammation by amplifying a TH2 cell-dependent pathway in mice" JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, MOSBY - YEARLY BOOK, INC, US, vol. 118, no. 3, 1 September 2006 (2006-09-01), pages 606-614, XP005627040 ISSN: 0091-6749 abstract; figures	1-25
A	OWYANG ALEXANDER M ET AL: "Interleukin 25 regulates type 2 cytokine-dependent immunity and limits chronic inflammation in the gastrointestinal tract" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE,, vol. 203, no. 4, 1 April 2006 (2006-04-01), pages 843-849, XP002485613 abstract	1-25
A	BUDELSKY ET AL: "Transgenic Mice Overexpressing Human IL-17E Exhibit an Asthma-Like Phenotype that is Exacerbated in an Ovalbumin-Induced Model of Asthma" JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, MOSBY - YEARLY BOOK, INC, US, vol. 117, no. 2, 1 February 2006 (2006-02-01), page S253, XP005360382 ISSN: 0091-6749 abstract	1-25
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2008/001365

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LETUVE ET AL: "IL-17E upregulates the expression of proinflammatory cytokines in lung fibroblasts" JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, MOSBY - YEARLY BOOK, INC, US, vol. 117, no. 3, 1 March 2006 (2006-03-01), pages 590-596, XP005396907 ISSN: 0091-6749 abstract	1-25
A	FALLON PADRAIC G ET AL: "Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion." THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE 17 APR 2006, vol. 203, no. 4, 17 April 2006 (2006-04-17), pages 1105-1116, XP009104217 ISSN: 0022-1007 abstract	1-25
A	FORT M M ET AL: "IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo" IMMUNITY, CELL PRESS, US, vol. 15, no. 6, 1 December 2001 (2001-12-01), pages 985-995, XP003022486 ISSN: 1074-7613 abstract; figures 1,3,6	1-25
A	KAWAGUCHI M ET AL: "IL-17 cytokine family" JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, MOSBY - YEARLY BOOK, INC, US, vol. 114, no. 6, 1 December 2004 (2004-12-01), pages 1265-1273, XP004666361 ISSN: 0091-6749 abstract; table 1	1-25
A	MARKS J D ET AL: "BY-PASSING IMMUNIZATION. HUMAN ANTIBODIES FROM V-GENE LIBRARIES DISPLAYED ON PHAGE" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 222, no. 3, 5 December 1991 (1991-12-05), pages 381-397, XP000608908 ISSN: 0022-2836 abstract	22-25
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2008/001365

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 92/01047 A (CAMBRIDGE ANTIBODY TECH [GB]; MEDICAL RES COUNCIL [GB]) 23 January 1992 (1992-01-23) pages 1-12	22-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2008/001365

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003008815	A1	09-01-2003	NONE	
WO 9201047	A	23-01-1992	AT 358720 T	15-04-2007
			AT 145237 T	15-11-1996
			AT 212663 T	15-02-2002
			AT 339497 T	15-10-2006
			AU 664155 B2	09-11-1995
			AU 8221691 A	04-02-1992
			CA 2086936 A1	11-01-1992
			DE 69123156 D1	19-12-1996
			DE 69123156 T2	17-04-1997
			DE 69132920 D1	14-03-2002
			DE 69132920 T2	21-11-2002
			DE 69133545 T2	24-05-2007
			DE 69133568 T2	03-01-2008
			DK 1433846 T3	20-08-2007
			DK 589877 T3	07-04-1997
			DK 774511 T3	13-05-2002
			DK 0844306 T3	29-01-2007
			EP 0589877 A1	06-04-1994
			EP 0774511 A1	21-05-1997
			ES 2096655 T3	16-03-1997
			GR 3022126 T3	31-03-1997
			JP 3176917 B2	18-06-2001
			JP 5508076 T	18-11-1993
			US 5969108 A	19-10-1999

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY (Chapter I of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 44bis)

Applicant's or agent's file reference AHBCP6539118	FOR FURTHER ACTION See item 4 below	
International application No. PCT/GB2008/001365	International filing date (<i>day/month/year</i>) 17 April 2008 (17.04.2008)	Priority date (<i>day/month/year</i>) 18 April 2007 (18.04.2007)
International Patent Classification (8th edition unless older edition indicated) See relevant information in Form PCT/ISA/237		
Applicant MEDICAL RESEARCH COUNCIL		

1. This international preliminary report on patentability (Chapter I) is issued by the International Bureau on behalf of the International Searching Authority under Rule 44 <i>bis</i>.1(a). 2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet. In the attached sheets, any reference to the written opinion of the International Searching Authority should be read as a reference to the international preliminary report on patentability (Chapter I) instead.																
3. This report contains indications relating to the following items: <table> <tr> <td>☒ Box No. I</td> <td>Basis of the report</td> </tr> <tr> <td>☒ Box No. II</td> <td>Priority</td> </tr> <tr> <td>☐ Box No. III</td> <td>Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</td> </tr> <tr> <td>☐ Box No. IV</td> <td>Lack of unity of invention</td> </tr> <tr> <td>☒ Box No. V</td> <td>Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</td> </tr> <tr> <td>☒ Box No. VI</td> <td>Certain documents cited</td> </tr> <tr> <td>☐ Box No. VII</td> <td>Certain defects in the international application</td> </tr> <tr> <td>☐ Box No. VIII</td> <td>Certain observations on the international application</td> </tr> </table> 4. The International Bureau will communicate this report to designated Offices in accordance with Rules 44bis.3(c) and 93bis.1 but not, except where the applicant makes an express request under Article 23(2), before the expiration of 30 months from the priority date (Rule 44bis .2).	☒ Box No. I	Basis of the report	☒ Box No. II	Priority	☐ Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability	☐ Box No. IV	Lack of unity of invention	☒ Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement	☒ Box No. VI	Certain documents cited	☐ Box No. VII	Certain defects in the international application	☐ Box No. VIII	Certain observations on the international application
☒ Box No. I	Basis of the report															
☒ Box No. II	Priority															
☐ Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability															
☐ Box No. IV	Lack of unity of invention															
☒ Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement															
☒ Box No. VI	Certain documents cited															
☐ Box No. VII	Certain defects in the international application															
☐ Box No. VIII	Certain observations on the international application															

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 82 70	Date of issuance of this report 20 October 2009 (20.10.2009)
	Authorized officer Dorothee Mülhausen e-mail: pt01.pct@wipo.int

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

To:

see form PCT/ISA/220

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/GB2008/001365

International filing date (day/month/year)
17.04.2008

Priority date (day/month/year)
18.04.2007

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV: C07K16/24 A61K39/395 A61P11/06

Applicant
MEDICAL RESEARCH COUNCIL

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☒ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Bernhardt, Wiebke

Telephone No. +49 89 2399-2804



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/GB2008/001365

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☒ contained in the international application as filed.
 - ☒ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

Box No. II Priority

1. ☒ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43bis.1 and 64.1) is the claimed priority date.
2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43bis.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
3. Additional observations, if necessary:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/GB2008/001365

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-25</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>5-7</u>
	No: Claims	<u>1-4,8-25</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-25</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43bis.1 and 70.10)
and /or
2. Non-written disclosures (Rules 43bis.1 and 70.9)

see form 210

Re Item V

**Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial
applicability; citations and explanations supporting such statements**

1. Reference is made to the following documents:

- D1: ANGKASEKWINAI ET AL: "The Role Of Il-25 In Airway Allergic Response" JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, MOSBY - YEARLY BOOK, INC, US, vol. 119, no. 1, 1 January 2007 (2007-01-01), page S134, XP005756443 ISSN: 0091-6749
- D2: DAVIES J ET AL: "Affinity improvement of single antibody VH domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding" IMMUNOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, NL, vol. 2, no. 3, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 169-179, XP004070292 ISSN: 1380-2933
- D3: HOLT L J ET AL: "Domain antibodies: proteins for therapy" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 11, 1 November 2003 (2003-11-01), pages 484-490, XP004467495 ISSN: 0167-7799
- D4: LITTLE M ET AL: "Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies" IMMUNOLOGY TODAY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 8, 1 August 2000 (2000-08-01), pages 364-370, XP004215163 ISSN: 0167-5699
- D5: SHARKHUU T ET AL: "Mechanism of interleukin-25 (IL-17E)-induced pulmonary inflammation and airways hyper-reactivity." CLINICAL AND EXPERIMENTAL ALLERGY : JOURNAL OF THE BRITISH SOCIETY FOR ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY DEC 2006, vol. 36, no. 12, December 2006 (2006-12), pages 1575-1583, XP009104227 ISSN: 0954-7894
- D6: TAMACHI ET AL: "IL-25 enhances allergic airway inflammation by amplifying a TH2 cell-dependent pathway in mice" JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, MOSBY - YEARLY BOOK, INC, US, vol. 118, no. 3, 1 September 2006 (2006-09-01), pages 606-614, XP005627040 ISSN: 0091-6749
- D7: US 2003/008815 A1 (CHEN JIAN [US] ET AL CHEN JIAN [US] ET AL) 9 January 2003 (2003-01-09)

2. Rule 39 / 67 PCT

Claim 20 relates to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 39.1(iv) / 67.1(iv) PCT. The patentability can be dependent upon the formulation of the claims.

The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment.

3. Industrial applicability (Art. 33(4) PCT)

Claims 1-25 meet the requirements for industrial applicability according to Art. 33(4) PCT.

4. Novelty (Art. 33(2) PCT)

The subject-matter of claims 1-25 is novel in the sense of Art. 33(2) PCT as there is no prior art document at hand which discloses a target binding member that binds IL-25 and comprises a VH CDR having the amino acid sequence as set out in Seq ID No. 7. Consequently, also the nucleic acid encoding said target binding member, the expression vector, the host cell, the composition comprising said target binding member as well as methods of producing said target binding member and the medical use of said target binding member are considered novel.

5. Inventive Step (Art. 33(3) PCT)

5.1 The present application does not meet the criteria of Art. 33(1) PCT because the subject-matter of claims 1-4 and 8-25 does not involve an inventive step in the sense of Art. 33(3) PCT.

5.2 Claim 1 refers to a target binding member that binds IL-25 and comprises a VH

CDR3 having an amino acid sequence as set out in Seq ID NO. 7, i.e. the binding member is only defined by one CDR. D2 and D3 disclose that a single CDR is not sufficient to give rise to a functional antibody molecule (abstr. of D2 and D3). The subject-matter of claim 1 does not contain all essential features necessary for the definition of the invention. Consequently, the underlying problem is not considered to be solved. No inventive merit can be acknowledged for claim 1.

5.3 Moreover, claim 2 refers to a target binding member comprising only a V_H domain. D4 discloses that the smallest antibody fragment contains at least one V_H domain, however, their "sticky patch" for interactions with V_L domains adversely affects their solubility and stability (pg. 367, fig. 3). Hence, unless the application shows the contrary, said claims lack support and consequently, the underlying problem cannot be considered to be solved over the whole scope of the claim.

5.4 The considerations under 5.2 and 5.3 apply *mutatis mutandis* to claims 3, 4, and 8-25, all containing a reference to claims 1 and 2.

5.5 The subject-matter of claims 5-7 refers to a target binding member defined by at least 6 CDR sequences. The application shows that an antibody comprising said CDRs results in a marked abrogation in airways hyperresponsiveness (AHR) and reduction of levels of cellular infiltration and goblet cell hyperplasia in the airways.

D1 which can be considered as the closest prior art discloses that treatment with neutralizing IL-25 antibody results in reduction of lung eosinophil and CD4⁺ T cell infiltration and Th2 cytokine production in an allergen-induced experimental asthma model (abstract).

The underlying problem can be regarded as the provision of further antagonistic antibodies against IL-25.

The solution provided by the present application, i.e. an antibody with the CDRs as set out in Seq ID Nos. 5-7 and 8-10 is considered inventive for the following reasons:

The role of IL-25 in allergic airway inflammation, airways hyperreactivity and asthma has been elucidated in several publications (e.g. D5 and D6: both

abstracts). D1 discloses the use of neutralizing IL-25 antibodies as a treatment in an experimental asthma model, however the antibody is only specified by the function with no reference to parts of its sequence. The present application, however, discloses one antibody defined by CDR sequences. The application furthermore states that said antibody was difficult to generate: only one blocking antibody out of seventy screened could be recovered (pg. 3, lines 1-6). Thus, the generation of blocking antibodies against IL-25 cannot be considered as a standard procedure. An inventive merit is to be acknowledged for the subject-matter of claims 5-7.

For the sake of completeness, it is noted that also D7 can be considered as the closest prior art. It discloses IL-25 (syn. IL-17E, PRO10272) and furthermore claims antagonistic antibodies although no specific antibody is disclosed. D1 also discloses the treatment of immune diseases including asthma (fig. 5 and 6; Seq ID No. 5 and 6; examples 3, 15; paragraphs 21-24, 160). Regarding the inventive step of the present application over D7 the same considerations as above apply.

Re Item VI

Certain published documents (Rules 43bis.1 and 70.10 PCT)

- D8: BALLANTYNE ET AL: "Blocking IL-25 prevents airway hyperresponsiveness in allergic asthma" JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, MOSBY - YEARLY BOOK, INC, US, vol. 120, no. 6, 1 December 2007 (2007-12-01), pages 1324-1331, XP022383425 ISSN: 0091-6749
- D9: ANGKASEKWINAI PORNPIMON ET AL: "Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses." THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE 9 JUL 2007, vol. 204, no. 7, 9 July 2007 (2007-07-09), pages 1509-1517, XP009104230 ISSN: 0022-1007

Should the priority of the present application not be valid, D8 and D9 would be relevant with respect to novelty and inventive step (Art. 33(2) and (3) PCT).

ANTICUERPOS CONTRA LA IL-25

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a anticuerpos, incluyendo fragmentos de
5 unión de los mismos, dirigidos contra la interleuquina 25 (IL-25). Las realizaciones
preferidas de la presente invención emplean los dominios VH y/o VL de anticuerpo
del anticuerpo 2C3. En otro aspecto, la invención proporciona una o más de las
CDR de los dominios VH y VL descritos en el presente documento injertados en
regiones flanqueantes de VH y VL, respectivamente.

10

Antecedentes de la Invención

El asma es un trastorno inflamatorio crónico común de las vías
respiratorias. El número de pacientes ha aumentado espectacularmente durante
las últimas décadas y la Organización Mundial de la Salud estima que
15 aproximadamente 300 millones de personas en todo el mundo padecen asma. El
asma alérgica se caracteriza por una hiperrespuesta de las vías respiratorias
(AHR) incontrolable inducida por una diversidad de estímulos de provocación y
está asociada con infiltrados inflamatorios de tipo-2 en los pulmones.

Las citoquinas de tipo-2 juegan un papel importante en la mediación de la
20 inmunidad protectora contra la infección parasitaria por helmintos, regulando
funciones efectoras tales como el crecimiento de células B y la secreción de IgE,
que inducen hiperplasia de células caliciformes y la producción de moco asociado,
eosinofilia, mastocitosis y fibrosis (1). Es el papel central que juegan estas
citoquinas en la regulación de estas funciones efectoras el que ha hecho que sean
25 dianas terapéuticas clave en el asma. De hecho, los modelos de ratón en los que
se expresan en exceso estas citoquinas muestran características significativas del
asma. Por lo tanto, es sorprendente que los esfuerzos para mejorar el asma
experimental bloqueando citoquinas de tipo-2 específicas, con la excepción de la
inhibición de la IL-13, no hayan tenido éxito.

30 La inhibición de IL-13 reprime tanto la AHR como la inflamación de las vías
respiratorias aunque sigue sin estar claro el mecanismo (2, 3). Sin embargo, dada
la compleja patofisiología y la etiología poco entendida del asma, hay
incertidumbre sobre si el establecimiento como objetivo de rutas individuales
finalmente resultará satisfactorio desde el punto de vista terapéutico.

35 Recientemente se ha demostrado que el exceso de expresión de IL-25/IL-
17E, un miembro de la familia de citoquinas relacionadas estructuralmente

conocida como IL-17 (8), induce respuestas de tipo-2 *in vivo* (4-6) y aumenta la capacidad de respuesta a agonistas de las vías respiratorias (7). Los ratones *IL25^{-/-}* no expulsaron parásitos helmintos; un indicador clave de una respuesta de tipo-2 poco eficaz (9, 10).

5 La estructura básica de un anticuerpo es bien conocida en la técnica. Un anticuerpo natural normalmente tiene cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas conectadas por enlaces disulfuro. Las cadenas pesadas y ligeras tienen una región (o dominio) constante y una región (o dominio) variable. Las regiones variables son principalmente
10 responsables de la unión al antígeno. Dentro de cada región variable, tres subregiones, conocidas como regiones determinantes de complementariedad (CDR) entran en contacto con el antígeno. Las CDR de cada dominio variable están numeradas, desde el extremo N al extremo C, como CDR1, CDR2 y CDR3. Entre el extremo N y el extremo C hasta las CRD hay cuatro regiones conocidas
15 como regiones flanqueantes, que realizan pocos contactos, si realizan alguno, con el antígeno. En muchos de los documentos citados más adelante, que se incorporan en el presente documento como referencia, se ilustran más detalles en relación con las estructuras de los anticuerpos.

20 Descripción de la Invención

Los presentes inventores han producido anticuerpos contra IL-25 y han identificado una molécula de anticuerpo que se une con alta afinidad y especificidad a IL-25. Como la IL-25 de humano y de ratón comparten una identidad de secuencia del 80%, se creyó que sería poco probable que fuera
25 posible generar anticuerpos anti-IL-25 útiles por inmunización convencional de ratones o ratas, ya que el grado de similitud reduciría el número de epítomos inmunogénicos. Además, probablemente la interfaz receptor-ligando mostraría el mayor grado de conservación impidiendo de esta manera la generación de anticuerpos capaces de bloquear la interacción de la IL-25 con su receptor. Para
30 solucionar estos problemas, los presentes inventores inmunizaron ratones que se habían modificado por ingeniería genética para que carecieran de la expresión de IL-25 (*IL-25^{-/-}*) con la creencia de que esta estrategia aumentaría la probabilidad de desarrollar anticuerpos dirigidos contra la interfaz IL-25/IL-25R.

Esta estrategia fue muy satisfactoria para generar anticuerpos contra IL-25,
35 probablemente debido a que la propia IL-25 aumenta la respuesta inmune humoral. Sin embargo, incluso usando esta estrategia sólo se identificaron dos

anticuerpos de bloqueo de los setenta explorados, y sólo pudo recuperarse uno de éstos.

Habiendo solucionado el problema de la similitud entre la IL-25 murina y humana que se creía que imposibilitaba la generación de anticuerpos de bloqueo eficaces por medios convencionales, se cree que esta similitud de secuencia
5 puede permitir la generación de un anticuerpo que es igualmente eficaz en el bloqueo de la IL-25 de ratón y humana al interaccionar con sus receptores. La presente invención ahora demuestra que efectivamente éste es el caso.

Aunque existen otros anticuerpos contra IL-25, se considera que la
10 presente invención es la primera demostración de que dichos anticuerpos pueden bloquear la bioactividad de la IL-25. En particular, la presente descripción proporciona ensayos realizados en modelos murinos de asma que demuestran que un anticuerpo de la invención tiene propiedades ventajosas e inesperadas, especialmente su capacidad de impedir o reducir la hiperrespuesta de las vías
15 respiratorias *in vivo*, un síntoma clave del asma.

Aunque también se ha notificado que la administración de una proteína de fusión IL-25R-FC soluble reduce la inflamación de tipo-2 de las vías respiratorias, los efectos fueron menos dramáticos que los presentados en el presente documento y la AHR no se evaluó críticamente (11). Los presentes inventores
20 ahora demuestran que la IL-25 juega papeles críticos en la inflamación de las vías respiratorias y la AHR, actuando inicialmente para potenciar la inflamación mediada por citoquinas de tipo-2, pero también jugando un papel importante en la inducción de la AHR independientemente de las citoquinas clásicas de tipo-2. La identificación de la AHR dependiente de la IL-25 ofrece la posibilidad de identificar
25 nuevas dianas terapéuticas que están aguas abajo de la IL-25. En el momento actual no se sabe si la IL-25 actúa directamente sobre el músculo liso de las vías respiratorias para inducir broncoconstricción o si sus efectos están mediados por la inducción de broncoconstrictores conocidos tales como los leucotrienos. Sin embargo, la actividad bifásica de la IL-25 hace que sea una excelente diana
30 terapéutica para la supresión de la inflamación de las vías respiratorias y la inhibición de la hiperrespuesta de las vías respiratorias *in vivo*.

Por consiguiente, la presente invención se refiere al nuevo anticuerpo y, más generalmente, a miembros de unión a diana que comprenden las secuencias de CDR del anticuerpo, así como al uso de miembros de unión a diana en el
35 tratamiento de afecciones tales como el asma.

En una realización, la invención proporciona un miembro de unión a diana

que se une a IL-25 y que comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende una CDR3 de VH con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 7. Ésta es la secuencia de la CDR3 de VH del anticuerpo 2C3 de la presente invención.

En realizaciones más específicas, un miembro de unión a diana de la invención es un dominio VH que comprende una CDR3 de VH de la SEC ID N° 7 junto con una CDR1 de la SEC ID N° 5 y una CDR2 de la SEC ID N° 6.

El dominio VH puede tener regiones flanqueantes humanas, o las regiones flanqueantes mostradas en la SEC ID N° 2.

Los dominios VH pueden emparejarse con un dominio VL de la invención, por ejemplo, un dominio VL con una CDR1 de la SEC ID N° 8, una CDR2 de la SEC ID N° 9 y una CDR3 de la SEC ID N° 10. Estas CDR pueden estar en un dominio VL que tiene regiones flanqueantes humanas o puede ser el dominio VL de la SEC ID N° 4.

De esta manera, en un aspecto, la presente invención proporciona un miembro de unión a diana que se une a IL-25 y comprende el dominio VH de 2C3 (SEC ID N° 2) y/o el dominio VL de 2C3 (SEC ID N° 4).

La invención también proporciona un ácido nucleico aislado que codifica los miembros de unión a diana de la invención, vectores que comprenden el ácido nucleico y métodos para expresar el ácido nucleico en una célula hospedadora para producir miembros de unión a diana de la invención.

La invención también proporciona el uso de miembros de unión a diana de la invención, por ejemplo, en forma de una composición farmacéutica, para el tratamiento de enfermedades, incluyendo el asma.

Estos y otros aspectos de la invención se describen con más detalle a continuación y haciendo referencia a los ejemplos adjuntos.

Descripción de las Figuras

La Figura 1 muestra la neutralización de la IL-25 antes de la sensibilización y también durante la exposición al asma. (A) Se determinó la sensibilidad a metacolina de ratones sensibilizados a OVA un día después de la última exposición al antígeno en un aerosol. Se combinan los datos de 2 experimentos y representan la media $\pm$ SEM de 14-18 ratones/grupo. (*p < 0,05 frente a control de isotipo, **p < 0,01 frente a control de isotipo) (B) Se tiñeron secciones de pulmón con Giemsa y se puntuó la infiltración perivascular, n=8 por grupo. (C) Se determinó el contenido de moco por tinción con ácido peryódico-Schiff (PAS) de secciones pulmonares, n=8 por grupo. (D) Se midió la IgE en suero con especificidad de antígeno por ELISA, y las lecturas de DO se convirtieron en

unidades arbitrarias por comparación con un suero estándar, n=8 por grupo. (E) La proporción de eosinófilos en BAL se determinó por recuento diferencial de células de citocentrifugaciones teñidas con Giemsa, n=6 por grupo. (F) Producción de citoquinas inducida por antígeno a partir de células de ganglio linfático mediastinal reestimuladas. Se determinaron los niveles de proteína por ELISA, n=6 por grupo. Los símbolos representan animales individuales y la media se representa por una barra. Los datos son representativos de al menos 2 experimentos independientes. Sens = anticuerpo administrado antes de la sensibilización, aero = anticuerpo administrado 4 horas antes de cada exposición al aerosol.

La Figura 2 muestra la neutralización de la IL-25 durante la exposición a asma únicamente. (A) se determinó la sensibilidad a metacolina de ratones sensibilizados con OVA un día después de la última exposición al antígeno en un aerosol. Se combinan los datos de 2 experimentos y representan la media $\pm$ SEM de 14-18 ratones/grupo. (*p < 0,05 frente a control de isotipo, ** p < 0,01 frente a control de isotipo) (B) Se tiñeron secciones pulmonares con Giemsa y se puntuó la infiltración perivascular, n=8 por grupo. (C) El contenido de moco se determinó por tinción con ácido peryódico-Schiff (PAS) de secciones pulmonares, n=8 por grupo. (D) La proporción de eosinófilos en BAL se determinó por recuento diferencial de células de citocentrifugaciones teñidas con Giemsa, n=6 por grupo. (E) Se midió la IgE de suero con especificidad de antígeno por ELISA, y las lecturas de DO se convirtieron en unidades arbitrarias por comparación con un suero estándar, n=8 por grupo. (F) Producción de citoquinas inducida por antígeno a partir de células de ganglio linfático mediastinal reestimuladas. Los niveles de proteína se determinaron por ELISA, n=6 por grupo. Los símbolos representan animales individuales y la media se representa por una barra. Los datos son representativos de al menos 2 experimentos independientes. Sens = anticuerpo administrado antes de la sensibilización, aero = anticuerpo administrado 4 horas antes de cada exposición al aerosol.

La Figura 3 muestra la administración de rIL-25 a ratones no sometidos previamente a ninguna experimentación. A ratones de tipo silvestre (A), *il13*^{-/-} (B) o *il4*^{-/-} *il5*^{-/-} *il9*^{-/-} *il13*^{-/-} (C) se les administraron 1,8 μ g de rIL-25 o PBS por vía intranasal. Se determinó la sensibilidad a metacolina 16 horas después de la exposición. *p < 0,05 frente a control de isotipo, **p < 0,01 frente a control de isotipo, n=4-8 por grupo. Los datos son representativos de al menos 2 experimentos independientes.

Secuencias:

Los miembros de unión a diana de la presente invención se describen con más detalle en el presente documento haciendo referencia a los siguientes números de identificación de secuencia:

	SEC ID Nº 1	secuencia de nucleótidos que codifica VH de 2C3
5	SEC ID Nº 2	secuencia de aminoácidos de VH de 2C3
	SEC ID Nº 3	secuencia de nucleótidos que codifica VL de 2C3
	SEC ID Nº 4	secuencia de aminoácidos de VL de 2C3
	SEC ID Nº 5	secuencia de aminoácidos de CDR1 de VH de 2C3
	SEC ID Nº 6	secuencia de aminoácidos de CDR2 de VH de 2C3
10	SEC ID Nº 7	secuencia de aminoácidos de CDR3 de VH de 2C3
	SEC ID Nº 8	secuencia de aminoácidos de CDR1 de VL de 2C3
	SEC ID Nº 9	secuencia de aminoácidos de CDR2 de VL de 2C3
	SEC ID Nº 10	secuencia de aminoácidos de CDR3 de VL de 2C3

En la lista de secuencias adjunta se proporcionan otras secuencias adicionales.

Descripción detallada de la invención

Miembro de unión a diana

Esta expresión describe un miembro de un par de moléculas que tienen especificidad de unión entre sí. Los miembros de un par de unión específico pueden tener procedencia natural o pueden producirse en su totalidad o en parte por síntesis. Un miembro del par de moléculas tiene un área, o una cavidad, en su superficie con la que se une específicamente el otro miembro del par de moléculas, y por lo tanto es complementaria a una organización espacial y polar particular del otro miembro del par de moléculas. De esta manera, los miembros del par tienen la propiedad de unirse específicamente entre sí. Son ejemplos de tipos de pares de unión específicos antígeno-anticuerpo, biotina-avidina, hormona-receptor de hormona, receptor-ligando y enzima-sustrato.

Esta solicitud se refiere a reacciones de tipo antígeno-anticuerpo. Por consiguiente, un miembro de unión a diana de la invención comprenderá al menos una parte de una molécula de anticuerpo, más específicamente al menos parte del dominio de unión a antígeno de dicha molécula.

En general, la región variable de cadena pesada (dominio VH) de un anticuerpo juega un papel significativo en la unión de un anticuerpo a un antígeno. Se ha descubierto que la región CDR3 de un dominio VH tiene mayor diversidad que las regiones CDR1 y CDR2, y por lo tanto en la mayoría de los anticuerpos proporciona especificidad por la diana del anticuerpo. De esta manera, los

miembros de unión a diana de la invención se basan en la región CDR3 de VH del anticuerpo 2C3. Los miembros de unión a diana de la invención, más preferiblemente, comprenden las tres CDR de las regiones de VH del anticuerpo 2C3.

5 La estructura de un miembro de unión a diana que comprende una CDR de la invención generalmente será una secuencia de cadena pesada o ligera de una molécula de anticuerpo o una parte sustancial de la misma en la que la CDR está localizada en un sitio correspondiente a la CDR de dominios variables de anticuerpo VH y VL naturales codificados por genes de inmunoglobulina reordenados. Las estructuras y localizaciones de los dominios variables de
10 inmunoglobulina pueden determinarse por referencia a Kabat, E. A. et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest. 4ª edición. US Department of Health and Human Services. 1987, y actualizaciones del mismo. Si se tiene alguna duda sobre esta base de datos se dispone de varios recursos académicos y
15 comerciales on-line. Por ejemplo, véase Martin, A.C.R. Accessing the Kabat Antibody Sequence Database by Computer *PROTEINS: Structure, Function and Genetics*, **25** (1996), 130-133 y el recurso on-line asociado, actualmente en la página web <http://www.bioinf.org.uk/abs/simkab.html>.

Generalmente, un miembro de unión a diana comprende un dominio VH
20 emparejado con un dominio VL para proporcionar un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo, aunque como se describe con detalle más adelante puede usarse un dominio VH solo para unirse al antígeno. En una realización preferida, el dominio VH de 2C3 (SEC ID N° 2) se empareja con el dominio VL de 2C3 (SEC ID N° 4), de manera que se forma un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo que
25 comprende tanto el dominio VH como el dominio VL de 2C3. En otras realizaciones, el VH de 2C3 se empareja con un dominio VL distinto de VL de 2C3.

En la técnica está bien establecida la promiscuidad de la cadena ligera, como se describe con más detalle en el presente documento.

Un miembro de unión a diana de acuerdo con la presente invención puede
30 unirse a IL-25 con una afinidad sustancialmente similar a la de 2C3, por ejemplo $\pm$ 10%. Un miembro de unión a diana generalmente será específico para la IL-25. De esta manera, el miembro de unión a diana no mostrará ninguna unión significativa a moléculas distintas de su compañero o compañeros de unión específicos. Por ejemplo, se ha descubierto que el anticuerpo 2C3 no presenta reacción cruzada
35 con IL-4, IL-5 e IL-13 y, por lo tanto, una característica deseable de los miembros de unión a diana de esta invención es la evitación de dicha reactividad cruzada

con otras citoquinas implicadas en el asma y procesos similares.

Típicamente, la especificidad puede determinarse por medio de un ensayo de unión tal como un ELISA que emplea un panel de antígenos. Un miembro de unión a diana de acuerdo con la presente invención puede reconocer a la IL-25 y
 5 no a otros miembros de la familia IL-17, en particular cualquiera de IL-17A, IL-17B e IL-17C; más preferiblemente las tres de IL-17A, IL-17B e IL-17C. La unión de un miembro de unión a diana de acuerdo con la invención con IL-25 puede anularse por competición con IL-25 recombinante.

La afinidad de unión y la potencia de neutralización de diferentes miembros
 10 de unión a diana pueden compararse en condiciones apropiadas.

Molécula de anticuerpo

Esta expresión describe una inmunoglobulina, tanto si se produce de forma natural como si se ha producido de forma sintética en su totalidad o en parte. Se ha demostrado que fragmentos de un anticuerpo entero pueden realizar la función
 15 de unirse a antígenos. De esta manera, la referencia a un anticuerpo también incluye cualquier polipéptido o proteína que comprende un fragmento de unión de anticuerpo.

Son ejemplos de fragmentos de unión: (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios
 20 VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward, E. S. et al., Nature 341, 544-546 (1989)), que consiste en un dominio VH; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F (ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos; (vii) moléculas Fv monocatenarias (scFv), donde un dominio VH y un dominio VL están
 25 unidos por un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a antígeno (Bird, et al, Science, 242, 423-426, 1988; Huston et al, PNAS USA, 85, 5879-5883, 1988); (viii) dímeros de Fv monocatenarios biespecíficos (documento PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por fusión génica
 30 (documento WO94/13804; P. Holliger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448, 1993). Las moléculas de Fv, scFv o diacuerpo pueden estabilizarse por la incorporación de enlaces disulfuro que unen los dominios VH y VL (Y. Reiter, et al, Nature Biotech, 14, 1239-1245, 1996). También pueden realizarse minicuerpos que comprenden un scFv unido a un dominio CH3 (S. Hu et al, Cancer Res., 56,
 35 3055-3061, 1996).

Cuando se van a usar anticuerpos biespecíficos éstos pueden ser

anticuerpos biespecíficos convencionales que pueden fabricarse de una diversidad de formas (Holliger, P. y Winter G. Current Opinion Biotechnol. 4, 446-449 (1993)), por ejemplo, puede prepararse químicamente o partir de hibridomas híbridos, o pueden ser cualquiera de los fragmentos de anticuerpo biespecíficos mencionados
5 anteriormente. Los diacuerpos y scFv pueden construirse sin una región Fc, usando sólo dominios variables, reduciendo potencialmente los efectos de la reacción anti-idiotípica.

Los diacuerpos biespecíficos, a diferencia de los anticuerpos enteros biespecíficos, también pueden ser particularmente útiles porque pueden
10 construirse y expresarse fácilmente en *E. coli*. Los diacuerpos (y muchos otros polipéptidos tales como fragmentos de anticuerpo) de especificidades de unión apropiadas pueden seleccionarse fácilmente usando presentación en fagos (documento WO94/13804) a partir de bibliotecas. Si un brazo del diacuerpo se va a mantener constante, por ejemplo, con una especificidad dirigida contra la IL-25,
15 entonces puede obtenerse una biblioteca en la que se varía el otro brazo y se selecciona un anticuerpo de la especificidad apropiada. Los anticuerpos enteros biespecíficos pueden obtenerse por la tecnología de "botón en ojal" (J. B. B. Ridgeway et al, Protein Eng., 9, 616-621, 1996). Es posible coger anticuerpos monoclonales y otros anticuerpos y usar técnicas de la tecnología de ADN
20 recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que conserven la especificidad del anticuerpo original. Estas técnicas pueden implicar la introducción de ADN que codifica la región variable de inmunoglobulina, o las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo en las regiones constantes, o regiones constantes más regiones flanqueantes, de una
25 inmunoglobulina diferente. Véanse, por ejemplo, los documentos EP-A-184187, GB 2188638A o EP-A-239400.

Preferiblemente, las regiones CDR se injertan en una región flanqueante humana. La región flanqueante humana puede seleccionarse por varios métodos, por ejemplo, comparando la región flanqueante de ratón o secuencias de la región
30 V de ratón con secuencias flanqueantes o de regiones V humanas conocidas y seleccionando una región flanqueante humana que tenga el mayor grado, o uno de los mayores grados de similitud o identidad de aminoácidos. Pueden realizarse modificaciones en regiones flanqueantes de secuencias humanas nativas para optimizar adicionalmente los anticuerpos con injertos de CDR resultantes.

35 Aunque en un aspecto preferido de la invención se prefieren moléculas de anticuerpo que comprenden un par de dominios VH y VL, constituyen otros

aspectos de la invención dominios de unión individuales basados en secuencias de dominio VH o VL. Se sabe que los dominios de inmunoglobulina individuales, especialmente dominios VH, pueden unirse a antígenos diana de una manera específica.

5 En el caso de los dominios de unión monocatenarios, estos dominios pueden usarse para seleccionar dominios complementarios capaces de formar un miembro de unión a diana de dos dominios capaz de unirse a IL-25, como se describe adicionalmente en este documento más adelante.

10 Las moléculas de anticuerpo de la presente invención pueden comprender además regiones constantes de anticuerpo o partes de las mismas. Por ejemplo, un dominio VL puede unirse por su extremo C a dominios constantes de cadena ligera de anticuerpo que incluyen cadenas C_{κ} o C_{λ} , preferiblemente cadenas C_{λ} . De forma similar, un miembro de unión a diana basado en un dominio VH puede unirse por su extremo C a todo o parte de una cadena pesada de inmunoglobulina
15 procedente de cualquier isotipo de anticuerpo, por ejemplo, IgG, IgA, IgE e IgM y cualquiera de las subclases de isotipo, particularmente IgG1 e IgG4. Se prefiere IgG4. Pueden emplearse regiones Fc tales como Δ_{nab} y Δ_{nac} como se describe en el documento WO99/58572.

20 Por lo tanto, se incluyen moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión a diana, o equivalente, fusionado a otro polipéptido. En los documentos EP-A-0120694 y EP-A-0125023 se describen la clonación y expresión de anticuerpos quiméricos.

25 Las regiones flanqueantes de las moléculas de anticuerpo de la invención también pueden incluir secuencias de glicosilación que incluyen uno o más sitios de glicosilación. Dependiendo de la célula hospedadora en la que se expresa el miembro de unión a diana, puede variar el patrón de glicosilación. De esta manera, las construcciones de ácido nucleico que codifican los sitios de glicosilación pueden modificarse para retirar el sitio o, como alternativa, estos sitios pueden introducirse en la proteína. Por ejemplo, los sitios de N-glicosilación
30 en las proteínas eucariotas se caracterizan por un triplete de aminoácidos Asn-X-Y, donde X es cualquier aminoácido excepto Pro e Y es Ser o Thr. Las sustituciones, adiciones o deleciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica estos tripletes tendrá como resultado la prevención de la unión de restos de carbohidrato a la cadena lateral de Asn. La alteración de un solo
35 nucleótido, elegido de forma que la Asn se reemplace por un aminoácido diferente, por ejemplo, es suficiente para inactivar un sitio de N-glicosilación. Los

procedimientos conocidos para inactivar los sitios de N-glicosilación en las proteínas incluyen los descritos en la Patente de Estados Unidos Nº 5.071.972 y en el documento EP 276.846.

Dominio de unión a antígeno

5 Esta expresión describe la parte de una molécula de anticuerpo que comprende el área que se une específicamente y es complementaria a parte o a todo el antígeno. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo puede unirse sólo a una parte particular del antígeno, denominándose dicha parte epítopo. Un dominio de unión a antígeno puede proporcionarse por uno o más dominios
10 variables de anticuerpo (por ejemplo, un denominado fragmento de anticuerpo Fd consistente en un dominio VH). Preferiblemente, un dominio de unión a antígeno comprende al menos una parte sustancial de una región variable de cadena ligera de anticuerpo (VL) y al menos una parte sustancial de una región variable de cadena pesada de anticuerpo (VH).

15 Una parte sustancial de un dominio variable de inmunoglobulina comprenderá al menos las tres regiones CDR, junto con sus regiones flanqueantes intermedias. Preferiblemente, la parte también incluirá al menos aproximadamente un 50% de la primera y cuarta regiones flanqueantes, o de ambas, siendo el 50% el extremo C de la primera región flanqueante y el 50% el
20 extremo N de la cuarta región flanqueante. Los restos adicionales en el extremo N o el extremo C de la parte sustancial del dominio variable pueden ser los que no están asociados normalmente con las regiones de dominio variable naturales. Por ejemplo, la construcción de los miembros unión a diana de la presente invención obtenidos por técnicas de ADN recombinante puede dar como resultado la
25 introducción de restos N o C terminales codificados por enlazadores introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación. Otras etapas de manipulación incluyen la introducción de enlazadores para unir dominios variables de la invención a otras secuencias de proteína que incluyen cadenas pesadas de inmunoglobulina, otros dominios variables (por ejemplo, en la producción de
30 diacuerpos) o marcadores de proteína como se describe con más detalle más adelante.

Comprende

Este término se usa generalmente en el sentido de incluye, es decir, que permite la presencia de una o más características o componentes.

35 ***Aislado***

Este término se refiere al estado en el que los miembros de unión a diana

de la invención, o el ácido nucleico que codifica dichos miembros de unión, generalmente están de acuerdo con la presente invención. Los miembros y el ácido nucleico carecerán o carecerán sustancialmente de material con el que están asociados en la naturaleza tales como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los que se encuentran en su entorno natural, o el entorno en el que se preparan (por ejemplo, el cultivo celular) cuando dicha preparación es por tecnología de ADN recombinante realizada *in vitro* o *in vivo*.

Los miembros de un ión a diana y el ácido nucleico pueden formularse con diluyentes o adyuvantes y con fines prácticos pueden aislarse - por ejemplo, los miembros normalmente se mezclarán con gelatina u otros vehículos si se usan para recubrir placas de microtitulación para uso en inmunoensayos, o se mezclarán con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables cuando se usen en diagnósticos o en terapia. Los miembros de unión a diana pueden estar glicosilados, de forma natural o por sistemas de células eucariotas heterólogas (por ejemplo, células CHO o NSO (ECACC 85110503), o pueden estar (por ejemplo, si se producen por expresión en una célula procariota) no glicosilados.

Otras características de miembros de unión a diana.

Además de las secuencias de anticuerpo, un miembro de unión a diana de acuerdo con la presente invención puede comprender otros aminoácidos, por ejemplo, formando un péptido o un polipéptido, tal como un dominio plegado, para impartir a la molécula otras características funcionales además de su capacidad de unirse al antígeno. Los miembros de unión a diana de la invención pueden llevar un marcador detectable, o pueden conjugarse con una toxina o enzima (por ejemplo, a través de un enlace peptídico o un enlazador).

Los marcadores detectables incluyen radiomarcadores tales como ^{131}I o ^{99}Tc , que pueden unirse a anticuerpos de la invención usando la química convencional conocida en la técnica de formación imágenes de anticuerpos. Los marcadores también incluyen marcadores enzimáticos tales como peroxidasa de rábano picante. Los marcadores además incluyen restos químicos tales como biotina que pueden detectarse por unión a un resto detectable afín específico, por ejemplo avidina marcada.

Cuando la característica adicional es un dominio polipeptídico o un marcador, el miembro de unión a la diana puede producirse por técnicas recombinantes, es decir, por la expresión de un ácido nucleico que codifica una fusión del miembro de unión a diana y el dominio adicional.

Miembros de unión a diana adicionales de la invención

Variantes de Secuencia

Pueden obtenerse variantes de los dominios VH y VL y CDR cuyas secuencias se presentan en el presente documento y que pueden emplearse en miembros de unión a diana para IL-25 por medio de métodos de alteración, mutación y exploración de secuencia. Estos métodos también se proporcionan por la presente invención.

Un miembro de unión a diana de acuerdo con la invención también puede ser uno que compite por la unión a un antígeno con cualquier miembro de unión a diana que se une al antígeno y comprende un miembro de unión a diana, un dominio VH y/o VL descrito en el presente documento, o la CDR3 de VH, de 2C3, o una variante de cualquiera de éstos cuya secuencia es sustancialmente como se indica en el presente documento. De esta manera, un aspecto adicional de la presente invención proporciona un miembro de unión a diana que comprende un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo humano que compite con 2C3 por la unión a IL-25. La competición entre miembros de unión puede ensayarse fácilmente *in vitro*, por ejemplo usando ELISA y/o añadiendo una molécula indicadora específica a un miembro de unión que puede detectarse en presencia de otro miembro o miembros de unión no marcados, para permitir la identificación de miembros de unión a diana que se unen al mismo epítipo o a un epítipo parcialmente coincidente.

En la técnica se dispone de diversos métodos para obtener miembros de unión a diana contra IL-25 y que pueden competir con 2C3 por la unión a IL-25.

De acuerdo con la presente invención pueden emplearse variantes de secuencia de aminoácidos de dominio variable de cualquiera de los dominios VH y VL cuyas secuencias se describen específicamente en el presente documento, según se ha descrito. Las variantes particulares pueden incluir una o más alteraciones de secuencias de aminoácidos (adición, delección, sustitución y/o inserción de un resto aminoacídico), pueden tener menos de aproximadamente 20 alteraciones, menos de aproximadamente 15 alteraciones, menos de aproximadamente 10 alteraciones o menos de aproximadamente 5 alteraciones, 4, 3, 2 ó 1. Las alteraciones pueden realizarse en una o más regiones flanqueantes y/o una o más CDR.

En un aspecto, una secuencia de aminoácidos de CDR sustancialmente como se indica en el presente documento se lleva como una CDR en un dominio variable humano o una parte sustancial del mismo. Las secuencias de CDR3 de VH sustancialmente como se indica en este documento representan realizaciones

preferidas de la presente invención y se prefiere que cada una de éstas se lleve como una CDR3 de VH en un dominio variable de cadena pesada humana o una parte sustancial del mismo.

Por "sustancialmente como se indica" se entiende que la CDR relevante o el dominio VH o VL de la invención serán idénticos o muy similares a las regiones especificadas cuya secuencia se presenta en el presente documento. Por "muy similar", se contempla que pueden realizarse de 1 a 5, preferiblemente de 1 a 4, tal como de 1 a 3 o 1 o 2, o 3 o 4, sustituciones de aminoácidos en la CDR y/o en el dominio VH o VL.

Pueden generarse variantes de secuencia de miembros de unión a diana de la invención realizando mutagénesis aleatoria de uno o los dos genes de VH y/o VL de 2C3 para generar mutaciones dentro del dominio variable entero. Esta técnica se describe por Gram et al (1992, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89: 3576-3580), que usaron PCR propensa a errores.

Otro método que puede usarse es dirigir la mutagénesis a regiones CDR de genes de VH o VL. Estas técnicas se describen por Barbas et al, (1994, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91: 3809-3813) y Schier et al (1996, J. Mol. Biol. 263: 551-567).

Todas las técnicas descritas anteriormente se conocen como tales en la técnica y por sí mismas no forman parte de la presente invención. El especialista en la técnica podrá usar estas técnicas para proporcionar miembros de unión a diana de la invención usando una metodología rutinaria en la técnica.

Por consiguiente, en un aspecto adicional, la invención proporciona un método para obtener un anticuerpo contra IL-25 que comprende:

proporcionar un ácido nucleico de partida que codifica un miembro de unión a diana que tiene una o más de las secuencias de CDR de la SEC ID N° 2 o la SEC ID N° 4;

modificar dicho ácido nucleico para alterar la secuencia o secuencias de CDR;

expresar dicho miembro de unión a diana modificado; y
ensayar dicho miembro de unión a diana modificado con respecto a la unión contra IL-25.

Preferiblemente, la modificación se realizará sobre una pluralidad de moléculas de ácido nucleico de partida para proporcionar un repertorio de secuencias modificadas que tienen una diversidad de afinidades de unión.

En un aspecto, el ácido nucleico de partida comprende las tres CDR de cadena pesada de la SEC ID N° 2, en forma de la propia SEC ID N° 2 o llevadas

en otra secuencia flanqueante.

En una realización, las modificaciones pueden dirigirse en una sola CDR, por ejemplo, la CDR3, o las modificaciones pueden dirigirse a dos o tres regiones CDR simultáneamente.

5 Producción de Miembros de Unión a Diana basados en CDR3

Pueden obtenerse dominios variables empleados en la invención a partir de cualquier línea germinal o dominio variable humano reordenado, o pueden ser un dominio variable sintético basado en secuencias consenso de dominios variables humanos conocidos. Una secuencia de CDR de la invención (por ejemplo CDR3)
10 puede introducirse en un repertorio de dominios variables que carecen de una CDR (particularmente CDR3), usando la tecnología de ADN recombinante.

Por ejemplo, Marks et al (Bio/Technology, 1992, 10: 779-783) describen métodos para producir repertorios de dominios variables de anticuerpo en los que se usan cebadores consenso dirigidos o adyacentes al extremo 5' del área del
15 dominio variable junto con cebadores consenso para la tercera región flanqueante de genes de VH humanos para proporcionar un repertorio de dominios variables de VH que carecen de una CDR3. Marks et al describen además cómo puede combinarse este repertorio con una CDR3 de un anticuerpo particular. Usando técnicas análogas, las secuencias derivadas de CDR3 de la presente invención
20 pueden intercambiarse con repertorios de dominios VH o VL que carecen de una CDR3, y los dominios VH o VL completos intercambiados pueden combinarse con un dominio VL o VH afín para proporcionar miembros de unión a diana de la invención. El repertorio después puede presentarse en un sistema hospedador adecuado tal como el sistema de presentación en fagos del documento
25 WO92/01047 de forma que puedan seleccionarse miembros de unión a diana adecuados. Un repertorio puede consistir en cualquier cantidad desde 10^4 miembros individuales en adelante, por ejemplo, de 10^6 a 10^8 o 10^{10} miembros.

También se describen técnicas de intercambio o combinatorias análogas por Stemmer (Nature, 1994, 370: 389-391), que describe la técnica en relación con
30 un gen de β -lactamasa pero observa que la estrategia puede usarse para la generación de anticuerpos.

Otro aspecto de la invención, por lo tanto, proporciona un método para preparar un miembro de unión a diana específico para IL-25, comprendiendo dicho método:

- 35 (a) proporcionar un repertorio de partida de ácidos nucleicos que codifican un dominio VH que incluye una CDR3 a reemplazar o que carece de una

región codificante de CDR3;

- (b) combinar dicho repertorio con un ácido nucleico donante que codifica una secuencia de aminoácidos sustancialmente como la indicada en el presente documento para una CDR3 de VH de tal forma que dicho ácido nucleico donante se inserte en la región CDR3 en el repertorio, para proporcionar un repertorio de productos de ácidos nucleicos que codifican un dominio VH;
- (c) expresar los ácidos nucleicos de dicho repertorio de productos;
- (d) seleccionar un miembro de unión a diana específico para IL-25; y
- (e) recuperar dicho miembro de unión a diana o el ácido nucleico que lo codifica.

El repertorio de productos puede co-expresarse a partir del mismo vector o de un vector diferente, con un dominio VL. El dominio VL puede ser el dominio VL de la presente invención o puede ser uno o más dominios VL diferentes, como se describe más adelante en relación con el intercambio de cadenas.

- Puede emplearse un método análogo en el que una CDR3 de VL de la invención se combina con un repertorio de ácidos nucleicos que codifican un dominio VL que incluye una CDR3 a reemplazar o que carece de una región codificante de CDR3. Como ocurre con el método anterior, el repertorio de productos de VL puede co-expresarse a partir del mismo vector o un vector diferente, con un dominio VH. El dominio VH puede ser el dominio VH de la presente invención o puede ser uno o más dominios VH diferentes, como se describe más adelante en relación con el intercambio de cadenas.

- De forma similar, una o más, o las tres CDR pueden injertarse en un repertorio de dominios VH o VL que después se exploran en relación con un miembro de unión a diana o miembros de unión a diana específicos para IL-25.

Los miembros de unión a diana obtenidos de esta manera constituyen un aspecto adicional de la invención.

Intercambio de Cadenas

- Otro aspecto de la invención proporciona un método para obtener un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo para IL-25, comprendiendo el método proporcionar la combinación de un dominio VH de un miembro de unión a diana de la invención (incluyendo variantes como se ha descrito anteriormente) con uno o más dominios VL, y ensayar la combinación o combinaciones de VH/VL con respecto al dominio de unión a antígeno del anticuerpo para IL-25.

- Dicho dominio VL puede tener una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente como se indica en el presente documento.

Puede emplearse un método análogo en el que una o más variantes de secuencia de un dominio VL descrito en el presente documento se combinan con uno o más dominios VH.

5 Esto puede conseguirse por métodos de selección de presentación en fagos que usan la denominada estrategia combinatoria dual jerárquica descrita en el documento WO 92/01047 en la que una colonia individual que contiene un clon de cadena H o L se usa para infectar una biblioteca completa de clones que codifican la otra cadena (L o H) y el miembro de unión a diana bicatenario resultante se selecciona de acuerdo con técnicas de presentación en fagos, tales
10 como las descritas en esa referencia.

De esta manera, la presente invención proporciona un método para la selección de una molécula de anticuerpo para IL-25, comprendiendo el método:

- (a) proporcionar un dominio VH que comprende un miembro de unión a diana que se une a IL-25 y que comprende un dominio VH de anticuerpo que
15 comprende una CDR3 de VH con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 7;
- (b) combinar dicho dominio VH con una pluralidad de dominios VL de anticuerpo para proporcionar moléculas de anticuerpo;
- (c) explorar en dichas moléculas de anticuerpo la unión a IL-25; y
- (d) seleccionar una molécula de anticuerpo que se una a IL-25.

20 Los dominios VH y VL pueden proporcionarse en forma de proteínas expresadas por ADN recombinante, particularmente por un ADN de fago o fagémido.

La pluralidad de dominios VL puede ser cualquier cantidad desde 10^4 dominios individuales en adelante, por ejemplo, de 10^6 a 10^8 o 10^{10} dominios.

25 Pueden constituir una parte adicional de la presente invención moléculas de anticuerpo y ácidos nucleicos que codifican dichas moléculas.

IL-25

La IL-25, también conocida en la técnica como IL-17E, está disponible en fuentes comerciales (por ejemplo, R & D Systems, MN, USA) o puede clonarse o
30 sintetizarse por referencia a las secuencias de IL-25 disponibles en la técnica. La IL-25 murina (Proteína de NCBI NP_542767) se describe por Hurst et al, 2002 (Ref. 7 más adelante). La IL-25 humana (Proteína de NCBI Q9H293) se describe por Fort et al (Ref. 4 más adelante). Para la producción de anticuerpos o uso en inmunoensayos, pueden usarse fragmentos de IL-25 recombinante,
35 particularmente los truncados en el extremo N. Por ejemplo, la IL-25 humana recombinante disponible en el mercado (IL-17E) comprende la secuencia de la

proteína madura de Tyr 33 - Gly 177 con el número de acceso Q9H293) y la IL-25 murina disponible en el mercado comprende los restos Val 17 - Ala 169 de la IL-17E de ratón (número de acceso NP_542767).

Ácidos Nucleicos y Vectores

5 En otros aspectos, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un miembro de unión a diana, un dominio VH, o dominio VL de acuerdo con la presente invención, y métodos para preparar un miembro de unión a diana, un dominio VH, o un dominio VL de la invención, que comprenden expresar dicho ácido nucleico en condiciones para permitir la
10 producción de dicho miembro de unión a diana, dominio VH o dominio VL, y recuperarlo.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un ácido nucleico, generalmente aislado, que codifica una secuencia de CDR de VH o una secuencia de CDR de VL descrita en este documento, especialmente una CDR de VH
15 seleccionada entre las SEC ID N°: 5, 6 y 7, una CDR de VL seleccionada entre las SEC ID N°: 8, 9 y 10, y más preferiblemente la CDR3 de VH de 2C3 (SEC ID N° 7).

Los ácidos nucleicos de la invención pueden comprender las secuencias, o partes relevantes de las mismas (por ejemplo, regiones que codifican CDR) de la
20 SEC ID N°: 1 o la SEC ID N°: 3. Sin embargo, el uso de codones puede variarse, por ejemplo, para optimizar la expresión de la secuencia en una célula hospedadora deseada.

La presente invención además proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un miembro de unión a diana de la presente invención. El ácido nucleico
25 incluye ADN y ARN. En un aspecto preferido, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica una CDR o un dominio VH o VL de la invención como se ha definido anteriormente.

El ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede comprender ADN o ARN y puede ser total o parcialmente sintético. La referencia a una
30 secuencia de nucleótidos como se presenta en este documento incluye una molécula de ADN con la secuencia especificada, e incluye una molécula de ARN con la secuencia especificada en la que la T se sustituye por U, a menos que el contexto requiera otra cosa.

La presente invención también proporciona vectores, por ejemplo, en forma
35 de plásmidos, virus, por ejemplo, fagos o fagémidos, cósmidos o casetes de transcripción o de expresión que comprenden al menos un ácido nucleico como se

ha indicado anteriormente.

Los vectores adecuados pueden elegirse o construirse de forma que contengan secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias
5 potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias cuando sea apropiado. Si se desean detalles adicionales véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 2ª edición, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Los vectores de la invención también incluyen vectores virales capaces de infectar células humanas *in vivo*, por ejemplo, vectores adenovirales, retrovirales o
10 de virus adenoasociados. Estos vectores pueden ser útiles para la expresión de un miembro de unión a diana de la invención en las células de un ser humano o un animal, para permitir la producción y la liberación del miembro de unión a diana en dicho sujeto.

En un aspecto, una secuencia de ácido nucleico que codifica un miembro
15 de unión a diana de la invención se unirá de forma operativa a un promotor para realizar la expresión del miembro de unión a diana en una célula hospedadora. La secuencia puede incluir en su extremo 5' una secuencia líder para facilitar la expresión y/o secreción del miembro de unión a diana en y/o desde una célula hospedadora. En la técnica se conocen como tales numerosas secuencias líder
20 adecuadas y pueden seleccionarse por una persona de experiencia habitual en la técnica teniendo en cuenta la célula hospedadora.

En *Current Protocols in Molecular Biology*, Segunda Edición, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, 1992 se describen con detalle muchas técnicas conocidas y protocolos para la manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo en
25 la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas. Las descripciones de Sambrook et al. y Ausubel et al. se incorporan en el presente documento como referencia.

Células Hospedadoras y Producción de Miembros de Unión a Diana

30 Otro aspecto proporciona una célula hospedadora transformada con un ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico en forma de un vector) de la invención.

En una realización, el ácido nucleico de la invención se integra en el genoma (por ejemplo, cromosoma) de la célula hospedadora. La integración
35 puede promoverse por inclusión de secuencias que promueven la recombinación con el genoma, de acuerdo con técnicas convencionales.

Otro aspecto proporciona un método de producción de un miembro de unión a diana de la invención, incluyendo el método producir la expresión a partir de un ácido nucleico codificante. Dicho método puede comprender cultivar células hospedadoras en condiciones para la producción de dicho miembro de unión a diana.

Después de la producción por la expresión de un dominio VH o VL, puede aislarse y/o purificarse el miembro de unión a diana usando cualquier técnica adecuada, y después usarse cuando sea apropiado. Un método de producción puede comprender una etapa de aislamiento y/o purificación del producto.

Después de la purificación del producto, el miembro de unión a diana puede modificarse por medios físicos o químicos, por ejemplo para introducir grupos protectores que alteran, por ejemplo, aumentan, la estabilidad o semivida biológica de la proteína. Por ejemplo, la PEGilación de proteínas para conseguir estos efectos se conoce como tal en la técnica y los miembros de unión a diana de la invención pueden estar en forma PEGilada.

Un método de producción puede comprender la formulación del producto en una composición que incluye al menos un componente adicional, tal como un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también proporciona una célula hospedadora recombinante que comprende uno o más ácidos nucleicos o vectores como se ha indicado anteriormente. Un ácido nucleico que codifica cualquier CDR, dominio VH o VL, o miembro de unión a diana proporcionado constituye por sí mismo un aspecto de la presente invención, así como un método de producción del producto codificado, comprendiendo dicho método la expresión a partir de un ácido nucleico codificante para el mismo.

Se conocen bien sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una diversidad de células hospedadoras diferentes. Las células hospedadoras adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, levaduras y sistemas de baculovirus. Las líneas celulares de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino, células HeLa, células de riñón de cría de hámster, células de melanoma de ratón NS0, células de mieloma de rata YB2/0 y muchas otras. Un hospedador bacteriano preferido común es *E. coli*.

La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo en células procariotas tales como *E. coli* está bien establecida en la técnica. Como revisión, véase por ejemplo Plückthun, A. Bio/Technology 9: 545-551 (1991). La expresión

en células eucariotas en cultivo también está disponible para los especialistas en la técnica como opción para la producción de un miembro de unión a diana, véanse como revisiones recientes, por ejemplo, Ref, M.E. (1993) Curr. Opinion Biotech. 4: 573-576; Trill J.J. et al. (1995) Curr. Opinion Biotech 6: 553-560.

5 **Composiciones**

De esta manera, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención, y para uso de acuerdo con la presente invención, pueden comprender, además del ingrediente activo, un excipiente, vehículo, tampón, estabilizante u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos para los especialistas en la técnica. Estos materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir con la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser oral, o por inyección, por ejemplo por vía intravenosa.

Pueden prepararse formulaciones terapéuticas del miembro de unión a diana para el almacenamiento mezclando el miembro de unión a diana que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables opcionales (véase, por ejemplo, "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20ª edición, 2000, pub. Lippincott, Williams & Wilkins), en forma de polvo liofilizado o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los destinatarios a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como Tween, Pluronic o polietilenglicol (PEG).

Para que el miembro de unión a diana se use para la administración *in vivo*, debe ser estéril. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de la liofilización y reconstitución. El miembro de unión a diana normalmente se almacenará en forma liofilizada o en solución.

Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden estar en

forma de un comprimido, una cápsula, un polvo o un líquido. Un comprimido puede comprender un vehículo sólido tal como gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente comprenden un vehículo líquido tal como agua, aceites de petróleo, animales o vegetales, aceite mineral o
 5 aceite sintético. Pueden incluirse solución fisiológica salina, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles tales como el etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

Para la inyección intravenosa, o la inyección en el sitio de afección, el ingrediente activo estará en forma de una solución acuosa aceptable para la vía
 10 parenteral que carezca de pirógenos y que tenga los valores adecuados de pH, isotonicidad y estabilidad. Los especialistas relevantes en la técnica podrán preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como Inyección de Cloruro Sódico, Inyección de Ringer o Inyección de Ringer con Lactato. Pueden incluirse, si se requiere, conservantes, estabilizantes, tampones,
 15 antioxidantes y/u otros aditivos.

Usos Terapéuticos de la Invención

La presente invención proporciona por primera vez una demostración de que los anticuerpos contra IL-25 son eficaces en la prevención o reducción de la hiperrespuesta de las vías respiratorias *in vivo*, un síntoma clave del asma. De
 20 esta manera, en un aspecto, la invención proporciona un método para prevenir o reducir la hiperrespuesta de las vías respiratorias en un sujeto (por ejemplo un ser humano) que necesita tratamiento, que comprende administrar al sujeto un miembro de unión a diana, particularmente una molécula de anticuerpo, que se une a IL-25. En otro aspecto, la invención proporciona un método para prevenir,
 25 reducir o tratar el asma en un sujeto que necesita tratamiento, que comprende administrar al sujeto un miembro de unión a diana, particularmente una molécula de anticuerpo, que se une a IL-25.

Los métodos anteriores pueden ponerse en práctica con miembros de unión a diana (incluyendo composiciones de los mismos) de acuerdo con la presente
 30 invención, que son útiles para unirse y preferiblemente antagonizar la acción de la IL-25, con potencial terapéutico en diversas enfermedades y trastornos en los que interviene la IL-25. Los métodos también pueden ponerse en práctica con otros miembros de unión a diana (incluyendo composiciones de los mismos) que se unen a IL-25, que pueden obtenerse como se describe más adelante en los
 35 ejemplos adjuntos.

Los miembros de unión a diana (incluyendo las composiciones de los

mismos) de acuerdo con la invención pueden usarse en un método de tratamiento (incluyendo el tratamiento profiláctico) o diagnóstico en un ser humano o animal. Dicho método de tratamiento o diagnóstico (que puede incluir el tratamiento profiláctico) puede comprender administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un miembro de unión a diana de la invención. Más adelante se describen con detalle enfermedades y trastornos ilustrativos.

También se proporciona el uso de un miembro de unión a diana (incluyendo una composición del mismo) de la invención en la fabricación de un medicamento para la administración a un ser humano o animal.

Las indicaciones clínicas en las que puede usarse un miembro de unión a diana anti-IL-25 para proporcionar un efecto terapéutico beneficioso incluyen cualquier afección en la que la IL-25 tenga consecuencias patológicas. De esta manera, en general, el miembro de unión a diana de la invención puede usarse en el tratamiento de cualquier afección asociada con una respuesta Th-2 indeseada. Por ejemplo, el miembro de unión a diana de la invención puede usarse para el tratamiento de alergia y asma, particularmente asma.

El tratamiento anti-IL-25 puede administrarse por inyección (por ejemplo, por vía intravenosa) o por métodos de administración local. El anti-IL-25 puede administrarse por tecnologías mediadas por genes. Las estrategias de formulación alternativas pueden proporcionar preparaciones adecuadas para la vía oral o por supositorios. La vía de administración puede determinarse por las características fisicoquímicas del tratamiento, por las consideraciones especiales para la enfermedad, para optimizar la eficacia o para minimizar los efectos secundarios.

De acuerdo con la presente invención, las composiciones proporcionadas pueden administrarse a individuos. La administración preferiblemente es en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo ésta suficiente para mostrar un efecto beneficioso en un paciente. Este efecto beneficioso puede ser al menos la mejora de al menos un síntoma. La cantidad real administrada, y la velocidad y evolución en el tiempo de la administración dependerán de la naturaleza y gravedad de lo que se esté tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones sobre la dosificación, etc., está dentro de la responsabilidad de los especialistas generales y otros médicos. Las dosis apropiadas de anticuerpos son bien conocidas en la técnica; véase Ledermann J.A. et al. (1991) *Int. J. Cancer* 47: 659-664; Bagshawe K.D. et al. (1991) *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals* 4: 915-922.

La dosis precisa dependerá de varios factores que incluyen si el anticuerpo

es para diagnóstico o para tratamiento, el tamaño y localización del área a tratar, la naturaleza precisa del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo entero, fragmento o diacuerpo), y la naturaleza de cualquier marcador detectable u otra molécula unida al anticuerpo. Una dosis de anticuerpo típica estará en el intervalo de 0,5 mg - 1,0 g, y puede administrarse como una inyección en embolada por vía intravenosa. Otros modos de administración incluyen la infusión intravenosa durante varias horas para conseguir una dosis acumulativa total similar. Ésta es una dosis para un solo tratamiento de un paciente adulto, que puede ajustarse proporcionalmente para niños y lactantes, y también ajustarse para otros formatos de anticuerpo en proporción al peso molecular. Los tratamientos pueden repetirse diariamente, dos veces por semana, semanalmente o a intervalos mensuales, a la discreción del médico.

Otro modo de administración emplea el recubrimiento previo, o la incorporación de otra manera en dispositivos internos, para los que la cantidad óptima de anticuerpo se determinará por medio de experimentos apropiados.

En algunas realizaciones preferidas de la invención, una molécula de anticuerpo es un fragmento monomérico, tal como F(ab) o scFv. Estos fragmentos de anticuerpo pueden tener la ventaja de una semivida relativamente corta y menos riesgo de activación plaquetaria, que puede ocasionarse por agrupamiento de receptores. El agrupamiento que da lugar a la activación plaquetaria podría ser de moléculas de IL-25 o de IL-25 con moléculas de FcγRII, por ejemplo.

Si se usa un anticuerpo entero, preferiblemente está en una forma que no puede activar y/o destruir plaquetas. Son elecciones preferidas el isotipo IgG4 o, como alternativa, isotipos de "diseño" derivados del esqueleto de IgG1 (nuevas construcciones génicas de Fc, documento WO99/58572, Clark, Armour, Williamson). Pueden usarse fragmentos de anticuerpo más pequeños tales como F(ab')₂. Además, pueden usarse anticuerpos enteros o fragmentos (por ejemplo F(ab')₂ o diacuerpos) con especificidad de epítipo dual (por ejemplo, para los epítopos reconocidos por scFv 2C3). Aunque dicha realización puede promover el agrupamiento de receptores, una alta velocidad de asociación a receptores individuales puede eliminar este problema.

Los miembros de unión a diana de la presente invención normalmente se administrarán en forma de una composición farmacéutica que puede comprender al menos un componente además del miembro de unión a diana.

Un miembro de unión a diana de la invención puede administrarse solo o en combinación con otros tratamientos, simultánea o secuencialmente dependiendo

de la afección a tratar. Otros tratamientos pueden incluir la administración de dosis adecuadas de fármacos que alivian el dolor tales como fármacos antiinflamatorios no esteroides (por ejemplo, aspirina, paracetamol, ibuprofeno o ketoprofeno) u opiáceos tales como morfina; la administración de antieméticos; o la
 5 administración de al menos otro compuesto activo contra el asma, generalmente un agente broncodilatador que produce relajación de las vías respiratorias o aumenta la eliminación de moco, por ejemplo un beta-agonista (por ejemplo, salbutamol, salmeterol), cromoglicato disódico, esteroides o un inhibidor de PDE_{IV}.

Métodos de Ensayo

10 La presente invención proporciona un método que comprende causar o permitir la unión de un miembro de unión a diana proporcionado en el presente documento a IL-25. Como se ha indicado, dicha unión puede realizarse *in vivo*, por ejemplo, después de la administración de un miembro de unión a diana, o un ácido nucleico que codifica un miembro de unión a diana, o puede tener lugar *in vitro*,
 15 por ejemplo en ELISA, transferencia de Western, inmunocitoquímica, inmunoprecipitación o cromatografía de afinidad.

Puede determinarse la cantidad de unión de miembro de unión a diana a IL-25. La cuantificación puede relacionarse con la cantidad de antígeno en una muestra de ensayo, lo cual puede tener un interés de diagnóstico.

20 Las reactividades de los anticuerpos en una muestra pueden determinarse por cualquier medio apropiado. Una posibilidad es un radioinmunoensayo (RIA). El antígeno marcado radiactivo se mezcla con antígeno no marcado (la muestra de ensayo) y se deja que se una al anticuerpo. El antígeno unido se separa físicamente del antígeno no unido y se determina la cantidad de antígeno
 25 radiactivo unido al anticuerpo. Cuanto más antígeno hay en la muestra de ensayo menos antígeno radiactivo se unirá al anticuerpo. También puede usarse un ensayo de unión competitivo con antígeno no radiactivo, usando antígeno o un análogo unido a una molécula indicadora. La molécula indicadora puede ser un fluorocromo, fósforo o un colorante láser con características de absorción o
 30 emisión aisladas espectralmente. Los fluorocromos adecuados incluyen fluoresceína, rodamina, ficoeritrina y Rojo Texas. Los colorantes cromogénicos adecuados incluyen diaminobencidina.

Otros indicadores incluyen partículas coloidales macromoleculares o material en forma de partículas tales como perlas de látex que están coloreadas,
 35 magnéticas o paramagnéticas, y agentes activos biológica o químicamente que pueden producir directa o indirectamente señales detectables que se observarán

visualmente, se detectarán electrónicamente o se registrarán de otra manera. Estas moléculas pueden ser enzimas que catalizan reacciones que desarrollan o cambian colores o producen cambios en las propiedades eléctricas, por ejemplo. Pueden ser excitables molecularmente, de tal forma que las transiciones
5 electrónicas entre los estados de energía produzcan absorciones o emisiones espectrales características. Pueden incluir entidades químicas usadas junto con biosensores. Pueden emplearse sistemas de detección de biotina/avidina o biotina/estreptavidina y fosfatasa alcalina.

Las señales generadas por conjugados de anticuerpo-indicador individuales
10 pueden usarse para obtener datos absolutos o relativos cuantificables de la unión del anticuerpo relevante en las muestras (normal y de ensayo).

La presente invención también proporciona el uso de un miembro de unión a diana como se ha mencionado anteriormente para medir niveles de antígeno en un ensayo competitivo, es decir, un método para medir el nivel de antígeno en una
15 muestra empleando un miembro de unión a diana como el proporcionado por la presente invención en un ensayo competitivo. Esto puede ocurrir cuando no es necesaria la separación física del antígeno unido del no unido. Una posibilidad es la asociación de una molécula indicadora al miembro de unión a diana de forma que se produzca un cambio físico u óptico sobre la unión. La molécula indicadora
20 puede generar directa o indirectamente señales detectables, y preferiblemente medibles. La asociación de moléculas indicadoras puede ser directa o indirecta, covalente, por ejemplo a través de un enlace peptídico, o no covalente. La asociación a través de un enlace peptídico puede ser como resultado de la expresión recombinante de una fusión génica que codifica el anticuerpo y la
25 molécula indicadora.

La presente invención también permite la medición de los niveles de antígeno directamente, empleando un miembro de unión a diana de acuerdo con la invención, por ejemplo, en un sistema biosensor.

El modo de determinar la unión no es una característica de la presente
30 invención y los especialistas en la técnica pueden elegir un modo adecuado de acuerdo con su preferencia y conocimiento general.

La presente invención además incluye un miembro de unión a diana que compite por la unión a IL-25 con cualquier miembro de unión a diana que se une al antígeno y comprende un dominio V incluyendo una CDR con aminoácidos
35 sustancialmente como los indicados en el presente documento o un dominio V con una secuencia de aminoácidos sustancialmente como la indicada en el presente

documento. La competición entre los miembros de unión puede ensayarse fácilmente *in vitro*, por ejemplo, marcando una molécula indicadora específica para un miembro de unión que pueda detectarse en presencia de otro miembro o miembros de unión no marcados, para permitir la identificación de miembros de unión a diana que se unen al mismo epítipo o a un epítipo parcialmente coincidente. La competición puede determinarse, por ejemplo, usando ELISA o citometría de flujo.

Puede usarse una reacción competitiva para seleccionar uno o más miembros de unión a diana tales como derivados de 2C3, que pueden tener una o más propiedades adicionales o mejoradas. Esto es análogo al método de selección para 2C3 de acuerdo con la invención, con la excepción de que IL-25 no se eluye de su mini-ligando, sino de una molécula de anticuerpo. Esto puede ser importante ya que produciría una mayor proporción de anticuerpos hijos que compiten directamente con el parental. De hecho, estos anticuerpos hijos como los seleccionados pueden tener una mayor afinidad por el antígeno que el parental (permitiendo mejoras en la avidéz que pueden deberse a la presentación de más de una molécula de anticuerpo por fago). Los métodos actuales para seleccionar anticuerpos "hijos" en fagos de afinidad mejorada incluyen:

el uso de concentraciones de antígeno diana (marcado) menores que la constante de disociación del anticuerpo parental original;

el uso de exceso de antígeno diana no marcado como competidor como se demuestra en Hawkins et al. (1992). Sin embargo, no necesariamente especifican que el anticuerpo "mejorado" deba desplazar/ocupar el mismo epítipo que el parental. La incorporación de la etapa de elución debe producir una mayor proporción de anticuerpos hijos que desplazan al parental. Los anticuerpos hijos seleccionados de esta forma pueden unirse a un epítipo muy similar al del anticuerpo parental, pero con una mayor afinidad.

Para ensayar la competición puede emplearse un fragmento peptídico del antígeno, especialmente un péptido que incluye un epítipo de interés. Puede usarse un péptido que tenga la secuencia del epítipo más uno o más aminoácidos en cualquier extremo. Puede decirse que dicho péptido "consiste esencialmente" en la secuencia especificada. Los miembros de unión a diana de acuerdo con la presente invención pueden ser tales que su unión al antígeno se inhiba por un péptido con o que incluye la secuencia dada. En el ensayo de esto, puede usarse un péptido con cualquier secuencia más uno o más aminoácidos.

Los miembros de unión a diana que se unen a un péptido específico

pueden aislarse, por ejemplo a partir de una biblioteca de presentación en fagos por selección con el péptido o los péptidos.

Ejemplos

A continuación se ilustrarán aspectos y realizaciones de la presente invención a modo de ejemplo haciendo referencia a la siguiente experimentación.

Ejemplo 1: Generación de Anticuerpos contra IL-25

Se exploró un gran panel de anticuerpos, generados en ratones *il25^{-/-}* inmunizados contra IL-25 murina (R&D Systems). Se descubrió que uno de estos anticuerpos anti-IL-25 (2C3) inhibía tanto la interacción entre rmIL-25 y una proteína de fusión mIL-25R-Fc soluble de una forma dependiente de la dosis como la producción dependiente de IL-25 de IL-13 por células no-B, no-T de ratón primarias en un bioensayo *in vitro*. El anticuerpo también inhibía la interacción entre hIL-25 y una fusión hIL-25R-Fc soluble. La combinación de estas propiedades se investigó adicionalmente en sistemas *in vivo* para demostrar la utilidad en el tratamiento del asma.

Ejemplo 2: Modelo Experimental de Asma Alérgica

Primero se sensibilizaron ratones BALB/c con el antígeno ovoalbúmina (OVA), antes de exponerse a OVA en aerosol. Los ratones BALB/c sensibilizados y expuestos desarrollaron un fenotipo de asma característico. Se caracterizaba por una mayor AHR después de la exposición al agente de provocación metacolina, infiltración de eosinófilos de las vías respiratorias, hiperplasia de células caliciformes y secreción de IgE en suero, en comparación con ratones BALB/c de control expuestos a PBS (Fig. 1).

Por el contrario, la administración del mAb anti-IL-25 antes de cada sensibilización y aerosolización con OVA produjo una notable anulación de la AHR después de la exposición a la metacolina aerosolizada, con valores de resistencia comparables a los de los ratones de control con PBS (Fig. 1A). La administración de un mAb de control de isotipo correspondiente no suprimía la AHR (Fig. 1A).

El mAb anti-IL-25 también reducía significativamente los niveles de infiltración celular alrededor del sistema vascular pulmonar (Fig. 1B y 3A), la hiperplasia de células caliciformes en las vías respiratorias (Fig. 1C y 3B) y los niveles de IgE en suero con especificidad de antígeno (Fig. 1D).

El análisis del lavado broncoalveolar (BAL) demostró que la infiltración de eosinófilos también se suprimía significativamente después de la administración del mAb anti-IL-25 en comparación con los ratones tratados con control de isotipo (Fig. 1E). Como se sabe que las citoquinas de tipo 2 regulan estas funciones

efectoras, se determinaron los niveles de citoquinas secretadas a partir de células aisladas procedentes de ganglios linfáticos mediastinales drenantes después de la reestimulación con el antígeno. A diferencia de los niveles elevados de citoquinas de tipo 2, IL-4, IL-5 e IL-13, inducidos por sensibilización con OVA y exposición en ratones BALB/c, la administración del mAb anti-IL-25 produjo una reducción significativa en los niveles de estas citoquinas (Fig. 1F).

Estos datos confirman la hipótesis de que por medio del bloqueo de la señalización de IL-25, se ha limitado la producción de citoquinas de tipo 2 que conducen a la anulación de las funciones efectoras de tipo 2, incluyendo la inflamación y AHR. De esta manera, los antagonistas de IL-25 reprimen eficazmente la inflamación de tipo 2 si se administran desde el inicio de la respuesta.

Materiales y Métodos:

Ratones

Se obtuvieron ratones BALB/c a partir de Harlan UK y se mantuvieron en SABU/CBS o en las instalaciones del National Heart and Lung Institute en medios específicos sin patógenos. Todos los experimentos animales indicados en este informe se realizaron con la aprobación del UK Home Office.

Sensibilización y exposición a alérgeno

Se sensibilizaron ratones BALB/c (6-12 semanas) por administración intraperitoneal de ovoalbúmina (20 µg/inyección) complejada con alumbre, o alumbre solo (controles) los días 0 y 12. La administración de aerosol de ovoalbúmina al 1% se realizó los días 19, 20 y 21 durante 20 minutos al día. El día 22, los animales se analizaron usando pletismografía para evaluar la AHR.

Administración de anticuerpos monoclonales anti-rmIL-25

Se indujo hiperrespuesta de las vías respiratorias (AHR) como se describe y se administró mAb anti-IL-25 (500 µg/dosis) por vía intraperitoneal el día antes de cada sensibilización intraperitoneal a OVA, el día antes de la exposición inicial a OVA en los pulmones y 4 horas antes de cada aerosolización de OVA. En experimentos adicionales, el mAb anti-IL-25 (500 µg/dosis) se administró por vía intraperitoneal sólo el día de cada aerosolización, pero antes de ésta. Los ratones de control recibieron solución salina o control de isotipo (500 µg/dosis) en lugar de mAb anti-IL25. El control de isotipo era anti-c-myc (IgG1 de ratón, clon 9E10.2).

Medición de la respuesta de las vías respiratorias

Los animales se anestesiaron, se traqueostomizaron y se pusieron en un ventilador (serie SAR-830, CWE Inc) a un ritmo de 150 respiraciones/min, con un

volumen tidal de 0,2 ml. Los ratones se monitorizaron en un pletismógrafo de cuerpo entero (EMKA Technologies, Paris) y se evaluó la presión transpulmonar a través de un transductor en línea. Después de registrar la resistencia pulmonar basal estable, se administraron concentraciones crecientes de cloruro de acetil-β-metilcolina (metacolina) (Sigma, Dorset, UK) por medio de un aerosol durante 15 s a cada concentración con un nebulizador ultrasónico, y se registró la resistencia pulmonar durante un periodo de 5 min. Se usó un software IOX para analizar la resistencia de las vías respiratorias, la distensibilidad y los parámetros pulmonares convencionales.

10 **Lavado broncoalveolar (BAL)**

Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se inyectaron 4 alícuotas de 500 µl de PBS a través de la traqueostomía y después se recuperaron. Se realizaron recuentos de células diferenciales en 150 células en citocentrifugaciones con tinción giemsa.

15 **Ejemplo 3: Administración Antes de la Exposición**

También se evaluó si el mAb anti-IL-25 era eficaz cuando se administraba sólo antes de la exposición a la aerosolización con OVA. El tratamiento con mAb anti-IL-25 redujo espectacularmente la resistencia de las vías respiratorias inducida por provocación con metacolina incluso cuando se administraba después en la respuesta (Fig. 2A). Por el contrario, la administración del mAb de control de isotipo correspondiente no anulaba la AHR.

Significativamente, el análisis de las secciones de histología pulmonar no mostró cambios significativos en los niveles de infiltrado celular alrededor de los vasos sanguíneos (Fig. 2B) o la hiperplasia de células caliciformes de las vías respiratorias (Fig. 2C) entre los ratones tratados con el mAb anti-IL-25 y los controles BALB/c expuestos a OVA o los controles tratados con mAb de isotipo correspondiente.

Además, no hubo ninguna reducción observable en la proporción de eosinófilos en el fluido BAL (Fig. 2D) o en los niveles de IgE en suero con especificidad de antígeno (Fig. 2E), después de la administración del mAb anti-IL-25. Sorprendentemente, los niveles de las citoquinas de tipo 2 IL-5 e IL-13 se mantuvieron comparables a los de los controles BALB/c expuestos a OVA o los controles tratados con mAb de isotipo correspondiente después de la reestimulación con antígeno (Fig. 2F), y los niveles de IL-13 en el BAL también permanecieron intactos. De esta manera, la administración de anti-IL-25 durante la fase de exposición de la respuesta puede anular específicamente la AHR aunque

las citoquinas de tipo 2 y sus efectores aguas abajo no se regulen negativamente. Estos descubrimientos sugieren que la IL-25 puede iniciar la AHR por una ruta que es independiente de la respuesta de tipo 2 clásica.

Materiales y Métodos

- 5 Los materiales y métodos fueron los descritos anteriormente para el ejemplo 2, con la adición de:

Recogida e histología de tejido pulmonar

- Se fijaron pulmones en Formalina (formaldehído al 10% en solución salina al 0,9%) para el análisis histológico. Se tiñeron secciones pulmonares con giemsa para el infiltrado inflamatorio y con ácido peryódico-Schiff (PAS) para las células caliciformes. Las células caliciformes teñidas con PAS en el epitelio de las vías respiratorias se midieron con un diseño ciego usando un sistema de puntuación numérico (0: <5% de células caliciformes; 1: 5-25%; 2: 25-50%; 3: 50-75%; 4: >75%). La suma de puntuaciones de las vías respiratorias de cada pulmón se dividió por el número de vías respiratorias examinadas, 20-40 vías respiratorias/ratón, y el valor resultante se expresó como puntuación PAS en unidades arbitrarias. La inflamación se evaluó usando un sistema de puntuación numérico para evaluar números de células infiltrantes alrededor de los vasos sanguíneos (0: capa de células inflamatorias infiltrantes <2 células de espesor alrededor del vaso, 1: 2-4 células de espesor, 2: 5-8 células de espesor, 3: > 8 células de espesor). La suma de las puntuaciones de las vías respiratorias de cada pulmón se dividió por el número de vasos examinados, 20-40 vías respiratorias/ratón, y el resultado se expresó en unidades arbitrarias.

25 ***Ejemplo 4: IL-25 Actúa a través de una ruta independiente de tipo 2***

- Se evaluó si rmlL-25 administrado exógenamente podía inducir la AHR potenciada incluso en ausencia de sensibilización o exposición al antígeno. Ya a las 16 horas después de la administración intranasal de rmlL-25 a ratones BALB/c se detectó una resistencia a las vías respiratorias significativamente elevada (Fig. 3A). Ciertos informes previos han indicado el papel central jugado por IL-13 en el fenotipo del asma y particularmente en la AHR. Para determinar si IL-25 estaba mediando su papel en la AHR a través de la IL-13 se administró rmlL-25 a ratones *il13^{-/-}*. De nuevo se observó una elevación de la AHR después del tratamiento con rmlL-25 (Fig. 3B). Como se ha demostrado que las otras citoquinas de tipo 2 contribuyen al fenotipo del asma, también se evaluó la respuesta de *il4^{-/-} il5^{-/-} il9^{-/-} il113^{-/-}* a rmlL-25 administrado por vía intranasal. Incluso en ausencia de todas las

citoquinas de tipo 2 clásicas, el tratamiento con IL-25 aumentó la AHR después de la provocación con metacolina (Fig. 3C). Estos datos confirman un papel para IL-25 en la exacerbación de la AHR a través de una ruta independiente de citoquinas de tipo 2.

5 Materiales y Métodos

Los materiales y métodos los descritos anteriormente para los ejemplos 2 y 3, con la adición de:

Ratones

Los ratones transgénicos *il4^{-/-} il5^{-/-} il9^{-/-} il113^{-/-}* (P. G. Fallon et al., 2002. *Immunity* 17, 7) y ratones *il113^{-/-}* (G. J. McKenzie et al., 1998. *Curr Biol.* 8, 339) en un fondo BALB/c fueron como se ha descrito. Los ratones *il125^{-/-}* en un fondo C57BL/6 x 129 F2 fueron como se ha descrito (P. G. Fallon et al., 2006. *J. Exp. Med.* 203, 1105).

Administración intranasal de IL-25

Se administraron a ratones 1,8 µg de rIL-25 (R&D Systems) o 1,8 µg de rIL-13 (Peprotech) en 40 µl de PBS por ratón por vía intranasal el día 0. Los animales de control recibieron PBS únicamente.

Ejemplo 5: Clonación de Dominios Variables de 2C3

Se aisló ARN de tres subclones de 2c3 y se preparó el ADNc por una reacción de transcripción inversa.

El ADNc de la cadena pesada de inmunoglobulina (IgH) se amplificó por PCR usando un cebador de región VH 5' conservado, MHV7 (SEC ID N°: 11) en combinación con un cebador de región constante de IgG1 MHCG1 (SEC ID N°: 12).

De forma similar, la cadena ligera de inmunoglobulina (IgK) se amplificó usando cebadores de región de IgK 5' conservados, MKV9 (SEC ID N°: 13) en combinación con el cebador de región constante kappa MKC (SEC ID N°: 14).

Para las reacciones PCR se realizó la polimerasa termoestable Phusion (NEV F-531L) a lo largo de todo el proceso.

Los productos de amplificación de 2c3 de las reacciones de PCR cebadas por VH7 + MHCG1 a partir de tres ADNc independientes se ligaron directamente en el vector pCRII®Blunt-TOPO® usando el kit de clonación® TOPO-blunt (Cat 45-0245), así como los productos de amplificación de la reacción de amplificación de cadena ligera. Se clonaron bacterias *E. coli* TOP10 transformadas con las construcciones del vector pCRII-blunt ligado en placas de agar LB-ampicilina-XGal, repicando colonias blancas en una rejilla de agar y en la mezcla de

selección de PCR. Se amplificaron por PCR los insertos de plásmidos clonados. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en gel y se identificaron los productos previstos. Se procesaron cultivos de una noche (5 ml) de cada clon, produciendo el producto de amplificación de PCR del tamaño
5 correcto, usando el Protocolo del Kit QIAprep Spin Miniprep (cat. 27106) para producir minipreparaciones de ADN plasmídico.

Los plásmidos se secuenciaron usando el Kit BugDye® Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction (ABI cat. 4390242). Cada plásmido seleccionado se secuenció en las dos direcciones usando cebadores directo e
10 inverso de M13 ciclados en una máquina de PCR GeneAmp9600. El análisis de la secuencia electroforética se realizó en un secuenciador capilar ABI.

El ciclo completo de RT-PCR, clonación y análisis de la secuencia de ADN se repitió para obtener tres series completamente independientes de información de secuencia para cada cadena de inmunoglobulina.

15 La secuencia de nucleótidos deducida completa de los genes VH y Vkappa se muestran como SEC ID N°: 15 y SEC ID N°: 16 respectivamente. Estas secuencias incluyen las secuencias líder al principio de cada segmento génico variable que codifica una secuencia señal que se usa para transportar las cadenas de anticuerpo recién sintetizadas al retículo endoplásmico; no están presentes en
20 las cadenas pesada y ligera finales.

Referencias

1. P. G. Fallon et al., *Immunity* **17**, 1 (Jul, 2002).
2. G. Grunig et al., *Science* **282**, 2261 (1998).
3. M. Wills-Karp et al., *Science* **282**, 2258 (1998).
- 25 4. M. M. Fort et al., *Immunity* **15**, 985 (Dec, 2001).
5. M. R. Kim et al., *Blood* **100**, 2330 (Oct 1, 2002).
6. G. Pan et al., *J Immunol* **167**, 6559 (Dec 1, 2001).
7. S. D. Hurst et al., *J Immunol* **169**, 443 (Jul 1, 2002).
8. T. A. Moseley, D. R. Haudenschield, L. Rose, A. H. Reddi, *Cytokine Growth*
30 *Factor Rev* **14**, 155 (Apr, 2003).
9. P. G. Fallon et al., *J Exp Med* **203**, 1105 (Apr 17, 2006).
10. A. M. Owyang et al., *J Exp Med* **203**, 843 (Apr 17, 2006).
11. T. Tamachi et al., *J Allergy Clin Immunol* **118**, 606 (Sep, 2006).

REIVINDICACIONES

1. Un miembro de unión a diana que se une a IL-25 y que comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende una CDR3 de VH que tiene una
5 secuencia de aminoácidos sustancialmente como la indicada en la SEC ID N°: 7.
2. El miembro de unión a diana de la reivindicación 1, donde el dominio VH comprende además una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente como la indicada en la SEC ID N°: 5 y una CDR2 que tiene una
10 secuencia de aminoácidos sustancialmente como la indicada en la SEC ID N°: 6.
3. El miembro de unión a diana de la reivindicación 1 ó 2, donde el dominio VH comprende una región flanqueante humana.
- 15 4. El miembro de unión a diana de la reivindicación 1 ó 2, donde el dominio VH comprende la SEC ID N°: 2.
5. El miembro de unión a diana de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un dominio VL con una CDR1 que tiene una
20 secuencia de aminoácidos sustancialmente como la indicada en la SEC ID N°: 8, una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente como la indicada en la SEC ID N°: 9 y una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente como la indicada en la SEC ID N°: 10.
- 25 6. El miembro de unión a diana de la reivindicación 5, donde el dominio VL comprende una región flanqueante humana.
7. El miembro de unión a diana de la reivindicación 5, donde el dominio VL comprende la SEC ID N°: 4.
30
8. El miembro de unión a diana de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que es un fragmento de anticuerpo Fab, F(ab')₂ o scFV.
9. El miembro de unión a diana de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a
35 7, que comprende una región constante de anticuerpo.

10. El miembro de unión a diana de la reivindicación 9, donde la región constante es una región constante de IgG1 o IgG4.

11. El miembro de unión a diana de la reivindicación 9, que comprende un anticuerpo entero.

12. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el miembro de unión a diana de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

13. Un vector de expresión para la expresión del miembro de unión a diana de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo el vector de expresión el ácido nucleico de la reivindicación 12 unido de forma operativa a un promotor.

14. Una célula hospedadora que lleva el vector de expresión de la reivindicación 13.

15. Un método para producir un miembro de unión a diana, comprendiendo el método cultivar células hospedadoras de acuerdo con la reivindicación 14 en condiciones para la producción de dicho miembro de unión a diana.

16. Un método de acuerdo con la reivindicación 15, que comprende además aislar dicho miembro de unión a diana.

17. Un método de acuerdo con la reivindicación 15 o la reivindicación 16, que comprende además formular el miembro de unión a diana en una composición que incluye al menos un componente adicional.

18. Una composición que comprende el miembro de unión a diana de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

19. La composición de la reivindicación 18 en forma de un polvo liofilizado.

20. Un método para el tratamiento o prevención de asma, comprendiendo dicho

método administrar a un sujeto que necesita tratamiento una cantidad eficaz de un miembro de unión a diana de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o la composición de la reivindicación 18.

5 21. Un miembro de unión a diana de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o la composición de la reivindicación 18 para uso en el tratamiento o prevención del asma.

22. Un método para producir un anticuerpo contra IL-25 que comprende:

10 (a) proporcionar un dominio VH que comprende un miembro de unión a diana que se une a IL-25 y que comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente como la indicada en la SEC ID N°: 7;

(b) combinar dicho dominio VH con una pluralidad de dominios VL de anticuerpo para proporcionar moléculas de anticuerpo;

15 (c) explorar dichas moléculas de anticuerpo con respecto a la unión a IL-25; y

(d) seleccionar una molécula de anticuerpo que se une a IL-25.

20 23. El método de la reivindicación 22, donde el dominio VH es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4.

24. Un método para producir un anticuerpo contra IL-25, que comprende:

25 (a) proporcionar un repertorio de partida de ácidos nucleicos que codifican un dominio VH que incluye una CDR3 a reemplazar o que carece de una región codificante de CDR3;

(b) combinar dicho repertorio con un ácido nucleico donante que codifica una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente como la indicada en la SEC ID N°: 7 de tal forma que dicho ácido nucleico donante se inserte en la región CDR3 en el repertorio, para proporcionar un repertorio de producto de ácidos nucleicos que codifican un dominio VH;

30 (c) expresar los ácidos nucleicos de dicho repertorio de productos;

(d) seleccionar un miembro de unión a diana específico para una IL-25; y

35 (e) recuperar dicho miembro de unión a diana o el ácido nucleico que lo codifica.

25. El método de la reivindicación 24, donde dicho repertorio de productos se co-expresa con un dominio VL.

RESUMEN

La invención proporciona el anticuerpo 2C3 y miembros de unión a diana basados en 2C3 que se unen a la interleuquina-25. Éstos son útiles en terapia, por ejemplo, en el tratamiento del asma.

Figure 2



Q
O

Q

O

Figure 2

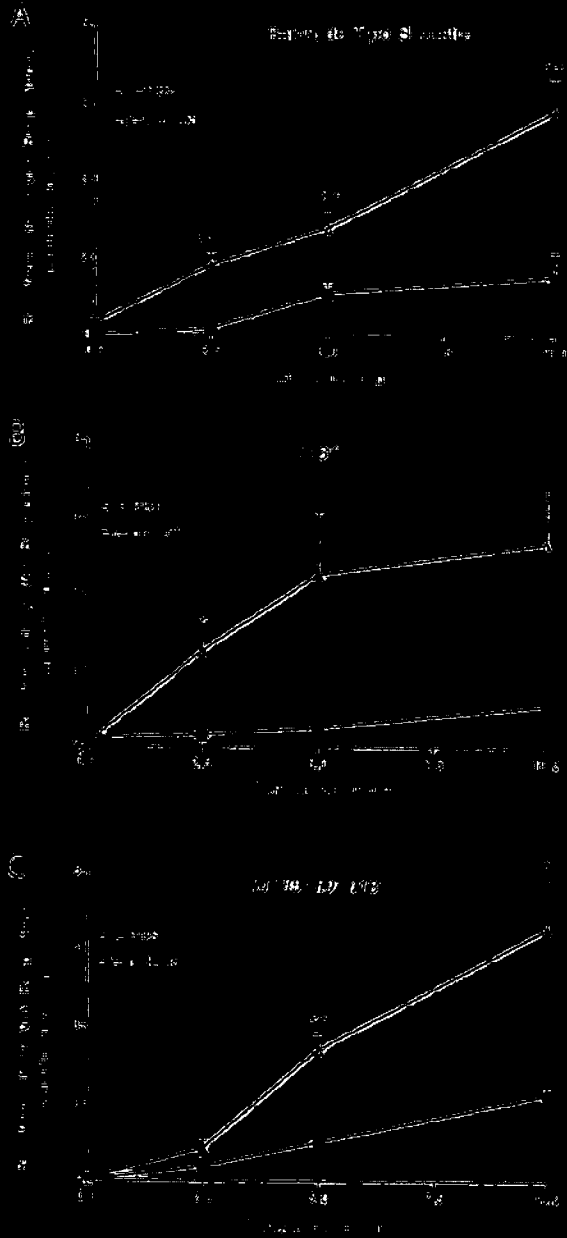


00

4

0

Figure 3



LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Medical Research Council
McKenzie, Andrew NJ
Ballantyne, Sarah

<120> Anticuerpos contra IL-25

10

<130> AHB/CP6539118

<150> GB 0707505.4

<151> 18-04-2007

15

<150> US 60/912.474

<151> 18-04-2007

<160> 16

20

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 363

25

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 1

gagggtccagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggagcttc aatgaagata	60
tcctgcaagg cttctggtta ctcttcact gactacacca tgaactgggt gaagcagagc	120
catggaaaga accttgagtg gattggactt attaatcctt acaatggtgg tactagctac	180
aaccagaact tcaagggcaa ggccacatta actgtagaca agtcatccag cacagcctac	240
atggagctcc tcagtctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagagagggc	300
tatgatggtt acctttactt tgctatggac tactgggggtc aaggaacctc agtcaccgtc	360
tcc	363

30

<210> 2
<211> 121
<212> PRT
<213> Mus musculus

5

<400> 2
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Gly Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
115 120

10 <210> 3
<211> 321
<212> ADN
<213> Mus musculus

15 <400> 3
gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60
atcagttgca gtgcaagtca gggcattagc aattatttaa actggtatca gcagaaagca 120
gatggaactg ttgaactcct gatctattac acatcaagtt tacactcagg agtcccatca 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagat tattctctca ccatcagcaa cctggaacct 240
gaagatatcg ccacttacta ttgtcagcag tatagtaagc ttccgtacac gttcggaggg 300
gggaccaagc tggaaataaa a 321

<210> 4
<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5

<211> 5

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Asp Tyr Thr Met Asn
 1 5

15

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

20

<400> 6

Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 7

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

5

<400> 7

Glu Gly Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 8

10 <211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln
 1 5 10 15

15

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

20 <213> Mus musculus

<400> 9

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser
 1 5

25 <210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

30 <400> 10

Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 11

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Secuencia sintética: Cebador 5 prima de VH

<400> 11

atggratgga gckggrtctt tmtctt

26

10

<210> 12

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Secuencia sintética: Cebador de región constante de cadena pesada

<400> 12

20 cagtggatag acagatgggg g

21

<210> 13

<211> 25

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Cebador 5 prima de Vkappa

30 <400> 13

atggttrtcw casctcagtt ccttg

25

<210> 14

<211> 20

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Cebador de región constante de cadena ligera

5 <400> 14

actggatggg gggaagatgg

20

<210> 15

<211> 420

10 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 15

atggratgga gckggrtctt tmtcttcctc ctgtcgggaa ctgcaggtgt ccactctgag	60
gtccagctgc aacagtctgg acctgagctg gtgaagcctg gagcttcaat gaagatatcc	120
tgcaaggctt ctggttactc cttcactgac tacacatga actgggtgaa gcagagccat	180
ggaaagaacc ttgagtggat tggacttatt aatccttaca atggtggtac tagctacaac	240
cagaacttca agggcaaggc cacattaact gtagacaagt catccagcac agcctacatg	300
gagctcctca gtctgacatc tgaggactct gcagtctatt actgtgcaag agagggctat	360
gatggttacc ttactttgc tatggactac tggggtaag gaacctcagt caccgtctcc	420

15

<210> 16

<211> 381

<212> ADN

<213> Mus musculus

20

<400> 16

atggtrtccw casctcagtt ccttgggtctc ctgttgctct gttttcaagg taccagatgt	60
gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc	120
atcagttgca gtgcaagtca gggcattagc aattatttaa actggtatca gcagaaagca	180
gatggaactg ttgaactcct gatctattac acatcaagtt tacactcagg agtcccatca	240
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagat tattctctca ccatcagcaa cctggaacct	300
gaagatatgg ccacttacta ttgtcagcag tatagtaagc ttccgtacac gttcggaggg	360
gggaccaagc tggaataaa a	381

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION ____ PCT X MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud: **3 DE NOVIEMBRE DE 2009**

(51) Clasificación Internacional :

(71) Solicitante(s) **MEDICAL RESEARCH COUNCIL**

(72) Inventor(es) **Andrew Neil James MACKENZIE y Sarah BALLANTYNE**

(74) Agente: **HUMBERTO RUBIO CAMACHO**

(30) Prioridad

(31) No. Prioridad

(32) Fecha

(33) Pais

BRITANICA

0707505.4

18/04/2007

REINO UNIDO

ESTADOUNIDENSE

60/912,474

18/04/2007

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

(85) Fecha inicio fase nacional:

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: **30/10/2008**

Fecha de presentación de la solicitud: **17/04/2008**

N° publicación: **WO 2008/129263**

No. de solicitud: **PCT/GB2008/001365**

(54) Título: **ANTICUERPOS CONTRA LA IL-25**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMATICO

PATENTE DE INVENCION ☐ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 3 DE NOVIEMBRE DE 2009

(51) Clasificación Internacional :

(71) Solicitante(s) **MEDICAL RESEARCH COUNCIL**

(72) Inventor(es) **Andrew Neil James MACKENZIE y Sarah BALLANTYNE**

(74) Agente: **HUMBERTO RUBIO CAMACHO**

(30) Prioridad	(31)	No. Prioridad	(32)	Fecha	(33)	País
BRITANICA		0707505.4		18/04/2007		REINO UNIDO
ESTADOUNIDENSE		60/912,474		18/04/2007		ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

(85) Fecha inicio fase nacional:

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha de presentación de la solicitud: **17/04/2008**

No. de solicitud: **PCT/GB2008/001365**

(87) Publicación internacional:

Fecha: **30/10/2008**

No. de publicación: **WO 2008/129263**

(54) Titulo: **ANTICUERPOS CONTRA LA IL-25**

Resumen:

Un miembro de unión a diana que se une a IL-25 y que comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente como la indicada en la SEC ID N°: 7.