



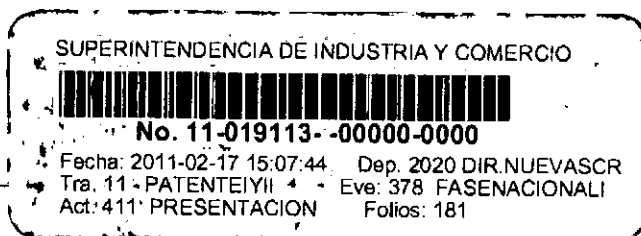
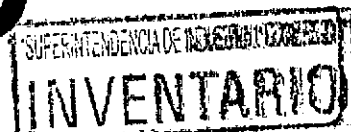
Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

11-19113

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION



21. EXPEDIENTE N° _____

54. TÍTULO ANTICUERPOS ANTI - IL - 13 MODIFICADOS,
COMPOSICIONES, MÉTODOS Y USOS.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 39/395

71. SOLICITANTE CENTOCOR, ORTHO BIOTECH INC.

DOMICILIO Pennsylvania, Estados Unidos de América

74. APODERADO DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C. _____

Enviado
30-03-2011



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-019113- -00000-0000

Fecha: 2011-02-17 15:07:44 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 181

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE REGISTRO DE:

1

☒

Patente de Invención

☐

Patente Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I

☐

Capítulo II

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **Centocor Ortho Biotech Inc.**

Dirección: 800/850 Ridgeview Drive, Horsham,
Pennsylvania 19044, Estados Unidos de América.

Nacionalidad o domicilio: Pennsylvania
Estados Unidos de América

Lugar de Constitución: Estados Unidos de
América

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)

Nombre: **DILIA MARÍA RODRIGUEZ
D'ALEMAN**

Dirección: Carrera 11 No. 86-53, piso 6

Teléfono: 6 181088 Fax: 6350824

E-mail: clarkemodet@clarkemodet.com.co

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 41.654.882

TP 20824 CSJ

4

INVENTOR(ES)
(72)

Nombre: **VER ANEXOS**

Dirección:

Nacionalidad o domicilio:

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2009/053425 Fecha 11 de agosto de 2009

Publicación Internacional No. WO 2010/021874 A2 Fecha 25 de febrero de 2010

Título (54) ANTICUERPOS ANTI-IL-13 MODIFICADOS, COMPOSICIONES, MÉTODOS Y USOS.

7 Clasificación Internacional (51) A61K 39/395

8 Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

(32) Fecha

20 de agosto de 2008

16 de septiembre de 2008

(31) Número de
Solicitud

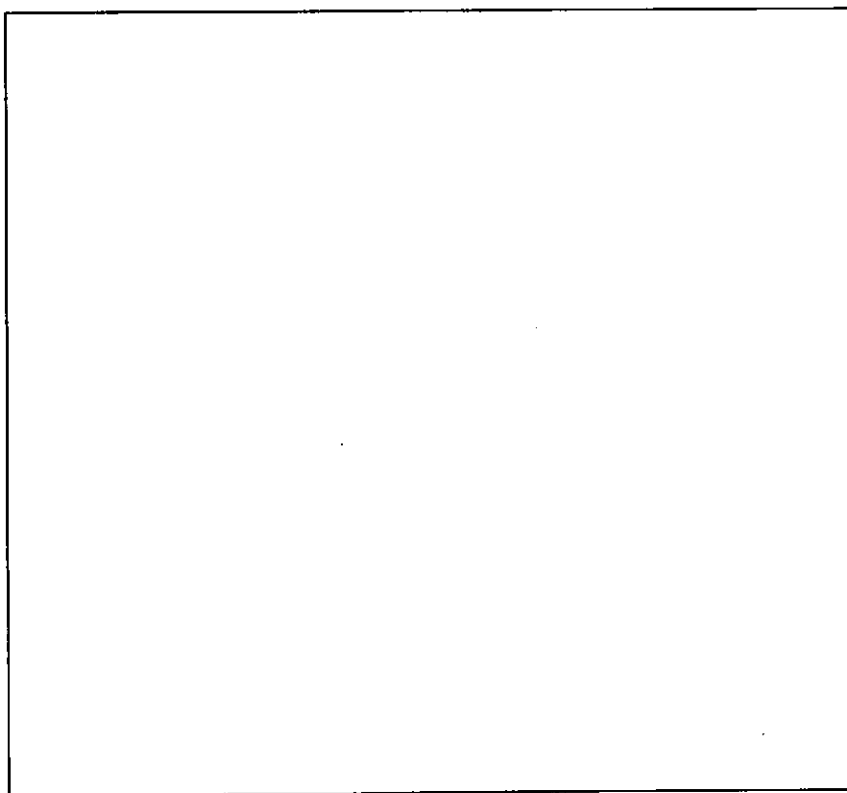
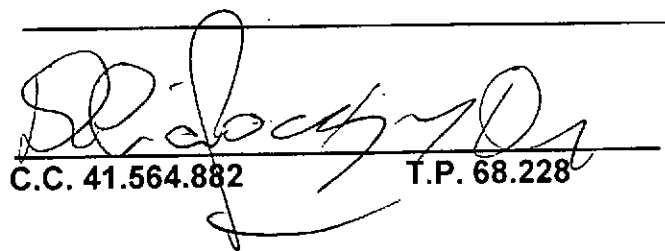
61/090,472

61/097,232

9 Comprobante de pago No. 11-012.407 // 11-002.358 // 11-002.359

Fecha 11 de febrero de 2011// 12 de enero de 2011

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes si fuese el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de examen preliminar (IPER)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso certificado de deposito del material biológico
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ Otros Opinión escrita

11 FIGURA CARACTERISTICA**12 Solicito la concesión de la patente,****NOMBRE :** DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN**FIRMA:**
C.C. 41.564.882 T.P. 68.228

ANEXO
INVENTORES

- 1.) **SWANSON, Ronald, V.** ✓
(3210 Merryfield Row San Diego, California 92121, Estados Unidos de América);
- 2.) **CHI, Ellen** ✓
(3210 Merryfield Row San Diego, California 92121, Estados Unidos de América);
- 3.) **RAGHUNATHAN, Gopalan** ✓
(3210 Merryfield Row San Diego, California 92121, Estados Unidos de América);
- 4.) **ZHAO, Shanrong** ✓
(3210 Merryfield Row San Diego, California 92121, Estados Unidos de América);
- 5.) **FRANSSON, Johan** ✓
(3210 Merryfield Row San Diego, California 92121, Estados Unidos de América);
- 6.) **CORDIER, Wendy** ✓
(3210 Merryfield Row San Diego, California 92121, Estados Unidos de América);
- 7.) **ALMAGRO, Juan, C.** ✓
(145 King of Prussia Road, Radnor, Pennsylvania 19087, Estados Unidos de América);
- 8.) **HYUN, Linus** ✓
(145 King of Prussia Road, Radnor, Pennsylvania 19087, Estados Unidos de América);
- 9.) **GILES-KOMAR, Jill** ✓
(145 King of Prussia Road, Radnor, Pennsylvania 19087, Estados Unidos de América);
- 10.) **O'NEIL, Karyn, T.** ✓
(145 King of Prussia Road, Radnor, Pennsylvania 19087, Estados Unidos de América);
- 11.) **CARTON, Jill, M.** ✓
(145 King of Prussia Road, Radnor, Pennsylvania 19087, Estados Unidos de América);
- 12.) **ZHOU, Hong, Mimi** ✓
(3210 Merryfield Row San Diego, California 92121, Estados Unidos de América);
- 13.) **TEPLYAKOV, Alexey, V.** ✓
(145 King of Prussia Road, Radnor, Pennsylvania 19087, Estados Unidos de América);
- 14.) **FENG, Yiqing** ✓
(145 King of Prussia Road, Radnor, Pennsylvania 19087, Estados Unidos de América).

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0012407

Bogotá D.C., Febrero 11 de 2011 - 09:29:38

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	411707774	09/02/2011	80.855.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	VR UNDITARIO	VR CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-019113- -00000-0000

Fecha: 2011-02-17 15:07:44 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 181

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Febrero 11 de 2011 - 09:45:36

3

P-2531

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 002358

Bogotá D.C., 12 de 2011 - 16:56:24

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	353168620	11/01/2011	77.745.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-019113-00000-0000

Fecha: 2011-02-17 15:07:44 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 181

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: Info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910185 Call Center: (571) 6513240

Enero 12 de 2011 - 16:56:44

4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 002359

Bogotá D.C., 12 de 2011 - 16:56:24

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	353168620	11/01/2011	77.745.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	500.000.00	500.000.00
				<u>\$500.000.00</u>

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-019113- -00000-0000

Fecha: 2011-02-17 15:07:44 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 181

5

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: Info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 12 de 2011 - 16:56:44

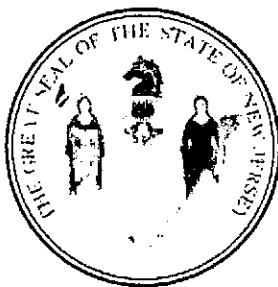
APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
AMANDA LIN HAYNES
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
AMANDA LIN HAYNES, NOTARY

CERTIFIED

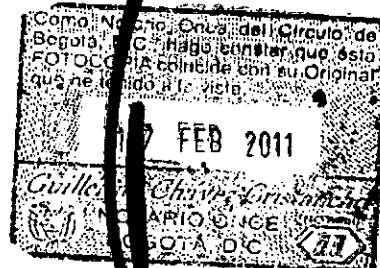
5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 24TH DAY OF JUNE 2009
7. BY: R. David Rousseau, NEW JERSEY TREASURER
8. NO: A367051
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



Certificate Number: 114699206

Verify this certificate at
https://www1.state.nj.us/TYTR_StandingCert/JSP/Verify_Cert.jsp

[Handwritten signature]



COLOMBIA

Carrera 11 N° 86-53 Piso 6 Bogotá Colombia Tel: (57 1) 6181088 Fax: (57 1) 6350824 Email: info@clarkemodet.com.co

PODER

Yo (nosotros), abajo firmante(s) *Mark R. Warfield.*

en mi (nuestro) carácter de representante(s) legales de **Centocor Ortho Biotech Inc.**

una sociedad organizada y existente de acuerdo con las leyes de

Pennsylvania, EE.UU.
y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en 800/850 Ridgeview Drive, Horsham, Pennsylvania 19044, Estados Unidos de América.

por el presente instrumento confiero (conferimos) poder especial a favor de DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, con Cédula de Ciudadanía No. 41.654.882 de Bogotá, y tp. 20824 y CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, con Cédula de Ciudadanía No. 40.017.374 de Tunja, y tp. 36448, con domicilio en Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en nombre del (de la) otorgante le (la) representen ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos:

- 1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de utilidad; diseños industriales, variedades vegetales; marcas, lemas, nombres y enseñanzas comerciales y denominaciones de origen; así como sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how.
- 3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento; así como sus renovaciones o prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia desleal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. También podrá(n) intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutelas y de policía; en acciones o juicios promovidos por el (la) mandante o en contra el (ella).
- 5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.
- 6) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistir, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.
- 7) Ratificar o no la agencia oficiosa.
- 8) Así mismo faculta (facultamos) a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.

Dado y firmado en

a los días de

POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned **MARK R WARFIELD**

legal representative(s) of **Centocor Ortho Biotech Inc.**

an organization existing under the laws of **PENNSYLVANIA, USA**

and in present execution of its business activity, domiciled 800/850 Ridgeview Drive, Horsham, Pennsylvania 19044, United States of America.

do hereby grant **POWER OF ATTORNEY** to DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, identification card No. 41.654.882 of Bogotá, and tp. 20824 and CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, tp. 36448, identification card No. 40.017.374 of Tunja, residing in Bogotá, Colombia, to act in the order of their appointment in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following:

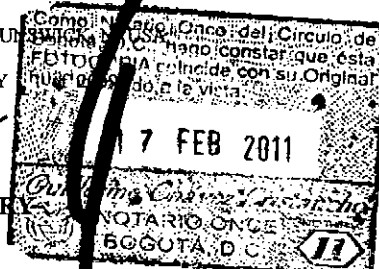
- 1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models; Designs, plant varieties; Marks, Slogans, Trade Names and emblems and appellations of Origin; as well as their renewals, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.
- 3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses; as well as their renewals or assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above-mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtaining or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative Trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him.
- 5) To register domain names before the competent entity.
- 6) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to: conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related object and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.
- 7) To ratify or not the officious agency.
- 8) I (we) hereby appoint the afore mentioned attorneys with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys, substitute this Power of Attorney and to revoke such substitutions.

Granted and signed at NEW BRUNSWICK

on this 27TH day of MAY

Firma / signature

MARK R WARFIELD, ASSISTANT SECRETARY



CERTIFICADO NOTARIAL

(Cuando el solicitante es SOCIEDAD)

(Poderes otorgados en: El Salvador, Estados Unidos, México y Venezuela)

A los _____ días del mes de _____ de _____
el Notario que suscribe DA FE de que:

1. _____
(nombre de la persona que firma el poder)

mayor de edad y domiciliado _____
firmó de su puño
y letra el documento que antecede.

2. Conoce al (a la) otorgante y que este (a) está legalmente capacitado para el otorgamiento.

3. El otorgante ha firmado el referido documento en su carácter de _____
de la persona jurídica Centocor Ortho Biotech Inc.

4. La citada persona jurídica con sede en 800/850 Ridgeview Drive, Horsham, Pennsylvania 19044, Estados Unidos de América, está legalmente constituida, que tiene actualmente existencia legal y que el acto para el cual se ha otorgado este poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.

5. El otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta, que esta es legítima y que está facultado para otorgar este poder.

6. Las anteriores certificaciones de los puntos 3, 4 y 5, me constan porque he tenido a la vista los documentos auténticos.

AMANDA LIN HAYNES
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
Notario Público
Comisión Expires 10/29/2013

NOTA: A continuación de lo anterior, el Cónsul de Colombia debe autenticar la firma del Notario Público.

CERTIFICADO NOTARIAL (Cuando el solicitante es INDIVIDUO)

A los _____ días del mes de _____ de _____
el Notario que suscribe DA FE de que:

1. _____
(nombre de la persona que firma el poder)

mayor de edad y domiciliado en _____
firmó en su presencia
el documento que antecede, conoce al otorgante y que este está legalmente capacitado para el otorgamiento.

Notario Público

NOTA: A continuación de lo anterior, el Cónsul de Colombia debe autenticar la firma del Notario Público.

Para todos los demás países el Señor Cónsul de Colombia o ante quien se otorgue, debe expedir una certificación dejando constancia 1) de la existencia legal de la sociedad, 2) de que esta ejerce actualmente su objeto social, y 3) de que la persona o personas que otorgan el poder están facultadas para hacerlo, dejando constancia así mismo de que tuvo a la vista las pruebas que acrediten tales circunstancias.

**LEGALIZACIÓN POR EL CONSUL DE COLOMBIA
O POR APOSTILLA**

NOTARIAL CERTIFICATE

(When the applicant is a CORPORATION)

(Powers of attorney granted in: El Salvador, Mexico, U.S.A. and Venezuela)

This 21 day of MAY 2009
the undersigned Notary CERTIFIES that:

1. MARK R WARFIELD
(name of the person who signs the power of attorney)

of legal age and domiciled in NEW BRUNSWICK, NJ USA set his hand on the foregoing document.

2. The grantor is to him personally known and that he/she has legal capacity to execute the document.

3. The grantor has executed the foregoing document in his capacity of ASSISTANT SECRETARY
of the juridical person Centocor Ortho Biotech Inc.

4. The mentioned juridical person with place of 800/850 Ridgeview Drive, Horsham, Pennsylvania 19044, United States of America, is duly organized, has actual legal existence and that the purposes for which the power of attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

5. The grantor has in fact the referred quality and that his/her representation is legal and that he/she is empowered to grant this power of attorney.

6. I have based the above certifications 3, 4 and 5, on the authentic documents which for such purpose were exhibited to me.


Notary Public

NOTA: Then the Colombian Consul must legalize the signature of the Notary Public.

NOTARIAL CERTIFICATE (When the applicant is an INDIVIDUALS)

On this _____ day of _____
the undersigned Notary CERTIFIES that:

1. _____
(name of the person who signs the Power of Attorney)

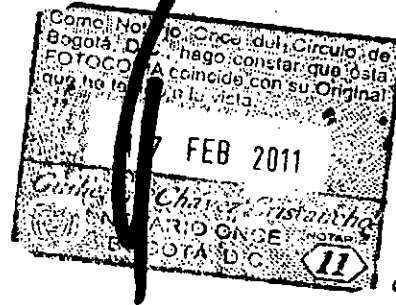
of legal age and domiciled at _____
signed in his presence the foregoing document, the grantor is to him personally known and that he/she has legal capacity to execute the document.

Notary Public

NOTA: Then the Colombian Consul must legalize the signature of the Notary Public.

For all other countries the Colombian Consul or before who it is granted must issue a certification stating 1) the legal existence of the corporation, 2) that the corporate purposes are actually being accomplished, 3) that the person or persons who grant this Power of Attorney are empowered to do it. The Consul will certify also that the documents evidencing those circumstances were exhibited to him.

LEGALIZATION BY THE COLOMBIAN CONSUL OR BY APOSTILLE.



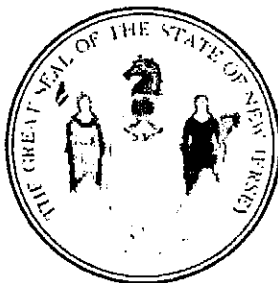
APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
GERALDINE A BAILEY
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
GERALDINE A BAILEY, NOTARY

CERTIFIED

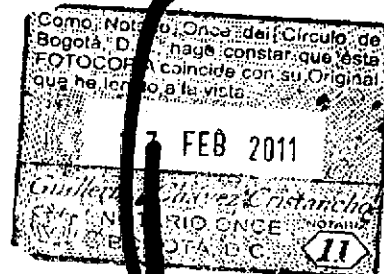
5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 13TH DAY OF JULY 2009
7. BY: R. David Rousseau, NEW JERSEY TREASURER
8. NO: A368604
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



[Handwritten signature]

Certificate Number: 114825049

Verify this certificate at
https://www1.state.nj.us/TYTR_StandingCert/JSP/Verify_Cert.jsp



9

CERTIFICATION

I certify that Mark R. Warfield, Assistant Secretary of Centocor Ortho Biotech Inc., a corporation existing, duly organized and complying with its corporate purposes in conformity with the laws of Pennsylvania, United States of America, whose home office is located in Horsham, Pennsylvania. I further certify that said individual is duly authorized to sign any and all instruments in his capacity as officer of the company and that the purposes for which are within the scope of the objects or activities of said corporation.

Christopher Warfield

Sworn to and subscribed

before me this

18th day of July, 2009

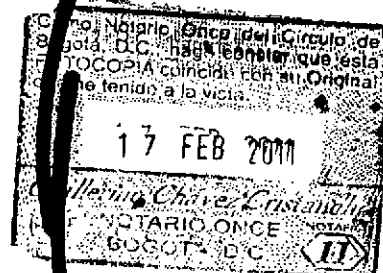
Geraldine A. Bailey

GERALDINE A. BAILEY
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
Commission Expires 1/14/2014

Esta certificación notarial debe ser llenada en su totalidad y legalizarse por

Apostilla

This notarial certification must be filled in completely and be legalized by Apostille



Traducción oficial hecha por Jimena Escobar Uribe, traductora e intérprete oficial según resolución No. 0369 del Ministerio de Justicia, del documento legalizado mediante la APOSTILLA No. A-367051 de 24 de junio de 2009 expedida en Estados Unidos de América (Nueva Jersey) correspondiente a un documento de poder y una certificación notarial en inglés con su correspondiente traducción al español (razón por la cual no se hace su traducción), otorgado a la sociedad **CENTOCOR ORTHO BIOTECH INC.**, domiciliada en Horsham, Pensilvania, Estados Unidos de América.

Jimena Escobar Uribe
JIMENA ESCOBAR URIBE
 Traductor e Intérprete Oficial
 Resolución No. 0369 Min. Justicia 1995

Documento de poder firmado el 27 de mayo de 2009 por Mark R. Warfield, Secretario Asistente.

Sello notarial: Amanda Lin Haynes, Notario Público de Nueva Jersey, comisión termina el 10/28/2013.

 APOSTILLA

(Convención de la Haya de 5 de octubre de 1961)

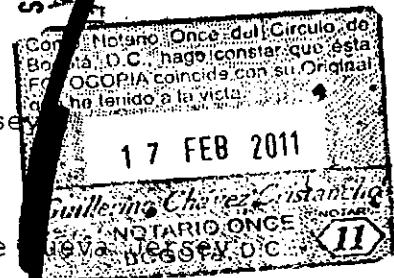
1. País: Estados Unidos de América
2. Este documento público ha sido firmado por AMANDA LIN HAYNES
3. Actuando en su calidad de Notario Público de Nueva Jersey
4. Lleva el sello/estampilla de AMANDA LIN HAYNES

CERTIFICADO

5. En Trenton, Nueva Jersey
6. El 24 de junio de 2009
7. Por R. David Rousseau, Tesorero de Nueva Jersey
8. Certificado No. A367051
9. Sello/Estampilla: El Gran Sello del Estado de Nueva Jersey

**MINISTERIO DE
 RELACIONES EXTERIORES**
 2009 JUL 31 A 7 32
JEFE DE LEGALIZACIONES
 BOGOTA D.C.

**NO SE ASUME
 RESPONSABILIDAD
 DEL TEXTO**
 949989
Jimena Escobar Uribe
 TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
 RESOLUCION 0369 DE 1995



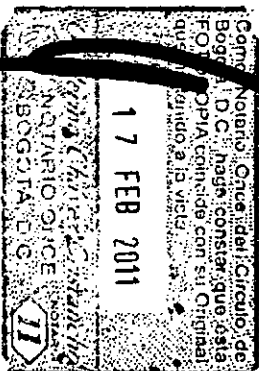
10. Firma: Firma ilegible

Número de certificado: 114699206

Verifique este certificado en línea:

<https://www1.state.nj.us/TYTR StandingCert/JSP/Verify Cert.jsp>


JIMENA ESCOBAR URIBE
Traductor e Intérprete Oficial
Resolución No. 0369 Min. Justicia 1995



Traducción oficial hecha por Jimena Escobar Uribe, traductora e intérprete oficial según resolución No. 0369 del Ministerio de Justicia, del documento legalizado mediante la APOSTILLA No. A-368604 de 13 de julio de 2009 expedida en Estados Unidos de América (Nueva Jersey) correspondiente a una certificación notarial relacionada con la sociedad **CENTOCOR ORTHO BIOTECH INC.**, domiciliada en Horsham, Pensilvania, Estados Unidos de América.

CERTIFICACIÓN

Yo certifico que Mark R. Warfield, Secretario Asistente de Centocor Ortho Biotech Inc., una sociedad existente, debidamente constituida y cumpliendo con sus objetos corporativos de acuerdo con las leyes de Pensilvania, Estados Unidos de América, cuya casa matriz está localizada en Horsham, Pensilvania. Además certifico que dicho individuo está debidamente autorizado para firmar cualquier y todos los instrumentos en su capacidad como funcionario de la sociedad y que los propósitos para los cuales están dentro del espectro de los objetivos o actividades de dicha sociedad.

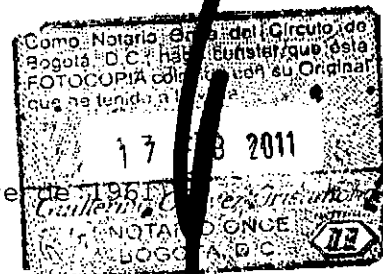
Firmado: Firma ilegible

Sello: Juramentado y suscrito ante mí este día 18 de (ilegible) de 2009.

Firmado: Geraldine A. Bailey, notario público de Nueva Jersey, comisión termina 1/14/2014.

APOSTILLA

(Convención de la Haya de 5 de octubre de 1961)



Jimena Escobar Uribe
JIMENA ESCOBAR URIBE
Traductor e Intérprete Oficial
Resolución No. 0369 Min. Justicia 1995

1. País: Estados Unidos de América
2. Este documento público ha sido firmado por GERLADINE A. BAILEY
3. Actuando en su calidad de Notario Público de Nueva Jersey
4. Lleva el sello/estampilla de GERLADINE A. BAILEY, notario

CERTIFICADO

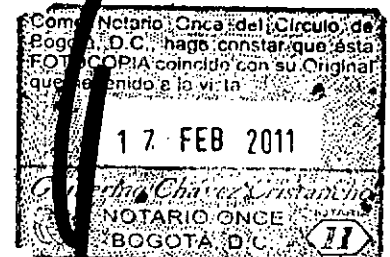
5. En Trenton, Nueva Jersey
6. El 13 de julio de 2009
7. Por R. David Rousseau, Tesorero de Nueva Jersey
8. Certificado No. A368604
9. Sello/Estampilla: El Gran Sello del Estado de Nueva Jersey
10. Firma: Firma ilegible

Número de certificado: 114825049

Verifique este certificado en línea:

<https://www1.state.nj.us/TYTR StandingCert/JSP/Verify Cert.jsp>

Jimena Escobar Uribe
JIMENA ESCOBAR URIBE
Traductor e Intérprete Oficial
Resolución No. 0369 Min. Justicia 1995



RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con anticuerpos modificados inmunoespecíficos para la proteína interleucina-13 humana (IL-13) o fragmento de esta, así como con los métodos de preparar y usarla, incluso las indicaciones

5 terapéuticas.

ANTICUERPOS ANTI-IL-13 MODIFICADOS, COMPOSICIONES, MÉTODOS Y USOS

Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona con anticuerpos modificados inmuno-específicos para la proteína interleucina-13 humana (IL-13) o fragmento de esta, así como con los métodos de preparación y uso, que incluyen las indicaciones terapéuticas.

Antecedentes

10 La IL-13 es una proteína globular que contiene cuatro α -hélices que pertenece a la familia de las citocinas similares a las hormonas de crecimiento que incluyen IL-4, factor de estimulación de la colonia de granulocito macrófago, IL-2, y factor de estimulación de la colonia de macrófago. La IL-13 se une a un receptor heterodímero compuesto por IL-13R α 1, una subunidad de 52-kDa, y p140, una
15 subunidad de 140 kDa, que resulta en la activación de STAT6. También se conoce que existe un segundo receptor IL-13, Ra2. El receptor Ra1 es responsable de iniciar la cascada de señalización con la unión a la IL-13. El receptor Ra2 se une a la IL-13 con mayor afinidad que Ra1 sin embargo su función tiene que ser aun determinada.

20 Los pacientes que experimentan una respuesta asmática tienen un incremento de los linfocitos CD4⁺ Th2 activados que provoca la inflamación de las vías respiratorias. Los linfocitos Th2 activados segregan citocinas (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13) que estimulan la inflamación que provoca daño al tejido asociado con hiper-reactividad de las vías respiratorias. Se demostró que la IL-13 es un factor
25 contribuyente principal del asma en modelos murinos y la variante IL-13 humana de un polimorfismo de un sólo nucleótido, R130Q (Graves, y otros, 2000 J Allergy Clin Immunol 105: 506-13) demostró ser un factor de riesgo significativo para el desarrollo

del asma (Heinzmann y *otros*, 2000 Hum. Mol. Genet. 9:549-559; Am. J. Respir.; Howard y *otros*, 2001 Cell Mol. Biol. 25:377-384; WO0123410). El tratamiento con un Mab neutralizante anti-IL-13 en un modelo murino inhibe una respuesta asmática en animales estimulados. Así, la evidencia indica que neutralizar la IL-13 pudiera ser
5 beneficioso en el tratamiento del asma y la constricción de las vías respiratorias en pacientes.

En consecuencia, existe una necesidad de proporcionar anticuerpos humanos específicos para la IL-13 humana para su uso en terapia para disminuir o eliminar las enfermedades mediadas por la IL-13, así como mejorar los
10 anticuerpos o fragmentos de estos sobre los conocidos.

Breve descripción de la invención

El contenido descrito y reivindicado en la presente descripción se relaciona con los anticuerpos anti-IL-13 y las composiciones útiles para tratar a los sujetos que sufren de patologías y afecciones asociadas con la IL-13 que incluyen,
15 pero no se limitan a, afecciones respiratorias tales como asma y fibrosis pulmonar, afecciones cardiovasculares, cáncer, afecciones dermatológicas, y fibróticas. La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales anti-IL-13 capaces de bloquear la actividad biológica de la IL-13, *in vitro*, *in vivo*, o *in situ* que incluye, pero no se limita a, inhibir variantes naturales o silvestres de la IL-13 humana que
20 se unen al receptor IL-13 alfa 1 humano, inhibir la IL-13 humana o variantes naturales de IL-13 humana que se unen al receptor IL-13 alfa 2 humano, prevenir o suprimir la proliferación de células tumorales humanas dependientes de la IL-13 humana, inhibir la producción de IgE dependiente de la IL-13 humana, reducir la infiltración eosinofílica de los tejidos, y el anticuerpo tiene un sitio de unión
25 específico en la IL-13 humana. Se proporcionan secuencias de aminoácidos de anticuerpos monoclonales anti-IL-13 ejemplares que pueden ser codificadas por ácidos nucleicos para la expresión en una célula huésped.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos con dominios de unión
 contruidos a partir de fragmentos de unión seleccionados y como variantes
 especificadas que comprenden las secuencias de aminoácidos en las sec. con núm.
 de ident.: 27 y 28, se incluyen dentro del alcance de la presente invención. La
 5 invención proporciona composiciones y enseñanzas específicas para la preparación
 de tales composiciones que comprenden residuos involucrados en la unión del
 antígeno en un dominio variable de inmunoglobulina seleccionado de las sec. con
 núm. de ident.: 2 – 29. Estos dominios de unión tienen las características deseadas
 y pueden modular la actividad biológica necesaria para tratar una patología
 10 particular relacionada con la IL-13. En un aspecto la invención es un anticuerpo
 aislado que comprende la región variable de cadena pesada de las sec. con núm.
 de ident.: 28 y una CDR3 de cadena ligera (L-CDR3) de acuerdo con la Fórmula (I):

Q-Q-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-P-Y-T (sec. con núm. de ident.: 29) (I)

15

en donde Xaa₁ puede ser His, Gln, o Pro;

Xaa₂ puede ser Asn, Asp, Ser, Leu, Pro, Ile, Phe, Glu o

Val;

Xaa₃ puede ser Glu, Asp, Gly, Ser, Ile, Tyr, Tryp, Asn, His,

20

Val, Met, Arg, Leu, Phe, Pro o estar ausente; y

Xaa₄ puede ser Tyr, Gly, Ser, Ala, Val, Phe, Thr, Glu, o

estar ausente.

En una modalidad particular el anticuerpo comprende los dominios
 de unión de la sec. con núm. de ident.: 25 y 26.

25

En otro aspecto la invención se relaciona con un anticuerpo que se
 une a un epítipo común en la IL-13 silvestre humana (sec. con núm. de ident.: 1)
 que se define por la unión de un anticuerpo anti-IL-13 M1295 modificado que

comprende las sec. con núm. de ident.: 25 y 26, y un anticuerpo quimérico murino-humano designado C863 (que comprende las sec. con núm. de ident.: 2 y 3). El epítipo reconocido por estos anticuerpos incluye 8 residuos de IL-13, tres de hélice A (Arg10, Ile13, Glu14) y 5 residuos de hélice D (Leu100, Lys103, Phe106, Arg107, Glu108), en donde las distancias interatómicas no exceden 4,0 Å. Basado en el número de contactos, Arg10 y Arg107 parecen ser residuos claves del epítipo.

En una modalidad adicional, se proporcionan epítopos del antígeno como un componente de una vacuna. El epítipo descrito anteriormente, que comprende los residuos 10, 13, 14, 100, 103, y 106-108 de la sec. con núm. de ident.: 1, reconocidos por los anticuerpos de la invención, son útiles para inmunizar activamente un huésped para obtener la producción de anticuerpos contra la IL-13. Los anticuerpos producidos son capaces de tratar o prevenir afecciones patológicas asociadas con la bioactividad de la IL-13.

Otra modalidad se relaciona con el tratamiento o prevención de afecciones patológicas asociadas con la actividad biológica de la IL-13 al administrar una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de un anticuerpo, o combinación de anticuerpos de la presente invención a un sujeto que necesita de tal tratamiento. En un aspecto un anticuerpo anti-IL-13 se administra a un paciente a quien se le ha diagnosticado asma. En otro aspecto un anticuerpo anti-IL-13 se administra a un paciente a quien se le ha diagnosticado dermatitis atópica.

La presente invención proporciona, en un aspecto, moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican una secuencia, dominio, porción, o variante de un anticuerpo anti-IL-13 como se describe en la presente descripción.

Además, se contemplan las secuencias de ácido nucleico que hibridan o complementan las secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo anti-

IL-13. La presente invención proporciona, además, vectores recombinantes que comprenden dichas moléculas de ácido nucleico del anticuerpo anti-IL-13, células huésped que contienen tales ácidos nucleicos y/o vectores recombinantes, así como métodos de preparar y/o usar tales ácidos nucleicos del anticuerpo, vectores y/o células huésped. La invención proporciona, además, que la secuencia codificada, dominio, porción o variante del presente anticuerpo de unión a la IL-13 se pueda administrar a un paciente en una composición que comprende un agente o solución portadora adecuada, como una composición farmacéuticamente aceptable.

10 La invención se relaciona, además, con métodos de generar, purificar, y empacar un anticuerpo descrito en la presente descripción para su uso en el tratamiento o prevención de afecciones patológicas asociadas con la bioactividad de la IL-13 al administrar una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de un anticuerpo. La presente invención proporciona
15 un método de expresar un anticuerpo anti- IL-13 en una célula huésped, que comprende cultivar una célula huésped como se describe en la presente descripción bajo condiciones en donde un anticuerpo anti- IL-13 se expresa en cantidades detectables y recuperables.

En resumen, el contenido descrito y reivindicado en la presente
20 descripción incluye:

Un anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión al antígeno de éste que se une a un epítipo de la IL-13 (sec. con núm. de ident.: 1), en donde dicho epítipo comprende una arginina en la posición 10 y una arginina en la posición 107 de la sec. con núm. de
25 ident.: 1; y puede comprender, además, un residuo seleccionado del grupo que consiste de: una serina en la posición 6, una isoleucina en la posición 13, un ácido glutámico en la posición 14, una leucina en

la posición 100, una lisina en la posición 103, una fenilalanina en la posición 106, y un ácido glutámico en la posición 108 de la sec. con núm. de ident.: 1;

5 Un anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión al antígeno de éste que comprende un parátipo que comprende una región variable de cadena ligera y comprende, además, un residuo de tirosina que a) interactúa con la IL-13 en la arginina en la posición 10; y b) forma un enlace con un ácido glutámico en la posición 14 de la sec. con núm. de ident.: 1. El parátipo puede comprender, además, un
10 residuo de histidina y residuo de asparagina en dicha región variable de cadena ligera, y puede comprender, además, una región variable de cadena pesada que comprende residuos de contacto con el parátipo seleccionados del grupo que consiste de tirosina, triptófano, ácido aspártico, valina y arginina. La región variable de cadena ligera del
15 parátipo puede comprender la sec. con núm. de ident.: 2 y dicha tirosina está en la posición 32 de la sec. con núm. de ident.: 2, y dicha región variable de cadena pesada comprende la sec. con núm. de ident.: 3 y dichos residuos de contacto comprenden una tirosina en la posición 32, un ácido triptófano en la posición 54, y una tirosina en la
20 posición 104;

Un anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión al antígeno de éste que comprende un parátipo que comprende una región variable de cadena ligera y comprende, además, un residuo de ácido aspártico que a) interactúa con la IL-13 en la arginina en la
25 posición 10; y b) forma un enlace con una serina en la posición 6 de la sec. con núm. de ident.: 1, en donde dicho parátipo comprende, además, un residuo de tirosina y un residuo de histidina en dicha

región variable de cadena ligera. El parátipo puede comprender, además, una región variable de cadena pesada que comprende residuos de contacto con el parátipo seleccionados del grupo que consiste de tirosina, triptófano, ácido aspártico, valina, y arginina. La

5 región variable de cadena ligera puede comprender la sec. con núm. de ident.: 25 y dicho ácido aspártico está en la posición 92 de la sec. con núm. de ident.: 25, y la región variable de cadena pesada puede comprender la sec. con núm. de ident.: 26 y dicho residuos de

10 contacto comprenden una tirosina en la posición 32, un ácido triptófano en la posición 54, y una tirosina en la posición 104;

Un anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión al antígeno de éste que compite por la unión a un epítipo de la IL-13 con un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste de C863, HFAL62, y M1295. El anticuerpo monoclonal comprende una

15 CDR3 de cadena ligera (L-CDR3) de sec. con núm. de ident.: 29 y L-CDR3 de la sec. con núm. de ident.: 29 se define además como se muestra en la Fórmula (I): Fórmula (I)--Q-Q-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-P-Y-T (sec. con núm. de ident.: 29) en donde Xaa₁ puede ser His, Gln, o Pro; Xaa₂ puede ser Asn, Asp, Ser, Leu, Pro, Ile, Phe, Glu, o Val; Xaa₃

20 puede ser Glu, Asp, Gly, Ser, Ile, Tyr, Trp, Asn, His, Val, Met, Arg, Leu, Phe, Pro o está ausente; y Xaa₄ puede ser Tyr, Gly, Ser, Ala, Val, Phe, Thr, Glu, o está ausente. El anticuerpo monoclonal puede comprender la región variable de cadena pesada de la sec. con núm. de ident.: 28 y/o la región variable de cadena ligera de la sec. con núm. de ident.: 27;

25 Un anticuerpo monoclonal aislado que comprende la cadena ligera variable de la sec. con núm. de ident.: 9 y variantes de esta, y la cadena pesada variable de la sec. con núm. de ident.: 20, y variantes

de esta. Las variantes de la cadena ligera variable de la sec. con núm. de ident.: 9 comprenden cambios en los residuos seleccionados del grupo que consiste de una histidina en la posición 91, una asparagina en la posición 92, un ácido glutámico en la posición 93, y una tirosina en la posición 94. Los residuos se pueden cambiar o eliminar como se refleja en la tabla de la reivindicación 18 en la solicitud presentada. Las variantes de la cadena pesada variable de la sec. con núm. de ident.: 20 comprenden cambios en los residuos seleccionados del grupo que consiste de una treonina en la posición 31, una metionina en la posición 34, una metionina en la posición 100, y una valina en la posición 106. Los residuos se cambian o eliminan como se refleja en la tabla de la reivindicación 20 en la solicitud presentada;

Un anticuerpo monoclonal aislado, o fragmento de unión al antígeno de éste, que comprende la región variable de cadena ligera de la sec. con núm. de ident.: 25, y la región variable de cadena pesada de la sec. con núm. de ident.: 26. El anticuerpo comprende, además, regiones constantes de inmunoglobulina de cadena ligera y pesada correspondientes y región de articulación de cadena pesada. El anticuerpo, así como cualquier otro anticuerpo descrito en la presente descripción, se puede preparar en una composición farmacéutica. El anticuerpo aislado puede comprender variantes de secuencias de la sec. con núm. de ident.: 25 y la sec. con núm. de ident.: 26, en donde tales variantes retienen la capacidad de unirse a un epítipo de IL-13 (sec. con núm. de ident.: 1), en donde dicho epítipo comprende una arginina en la posición 10 y una arginina en la posición 107 de la sec. con núm. de ident.: 1, y el epítipo puede comprender, además, un residuo seleccionado del grupo que consiste de: una serina en la

posición 6, una isoleucina en la posición 13, un ácido glutámico en la posición 14, una leucina en la posición 100, una lisina en la posición 103, una fenilalanina en la posición 106, y un ácido glutámico en la posición 108 de la sec. con núm. de ident.: 1;

5 Un anticuerpo recombinante humanizado aislado que
comprende una región variable de cadena pesada humanizada y región
variable de cadena ligera humanizada, en donde la región variable de
cadena pesada humanizada comprende tres regiones determinantes
complementarias (CDR) de la sec. con núm. de ident.: 3 de cadena
10 pesada y una región marco humana de una cadena pesada del
anticuerpo aceptor humano, y la región variable de cadena ligera
humanizada comprende tres regiones determinantes complementarias
de sec. con núm. de ident.: 2 de cadena ligera y una región marco
humana de una cadena ligera del anticuerpo aceptor humano; en donde
15 el anticuerpo humanizado reduce la unión de la IL-13 a un receptor IL-13
en las células THP-1 medido por la señalización de STAT6. El
anticuerpo modula, sustancialmente, una actividad del polipéptido IL-13
seleccionado del grupo que consiste de (a) inhibe la unión de la IL-13
humana silvestre recombinante humana al receptor IL-13 alfa 1 humano
20 o un receptor IL-13 animal adecuado medido por la fosforilación de Stat-
6 inducida por la IL-13 silvestre, (b) inhibe la unión de la IL-13 humana
silvestre recombinante humana al receptor IL-13 alfa 2 humano o un
receptor IL-13 animal adecuado, (c) disminuye los números de células
de eosinófilos, linfocitos, macrófagos y neutrófilos en los grupos de
25 ratas tratadas con el anticuerpo en comparación con los sensibilizados
con OVA tratados con solución salina, y (d) disminuye la resistencia de
las vías respiratorias en animales desafiados químicamente en

comparación con un agente control no específico. El anticuerpo puede comprender CDR de la región variable de cadena pesada seleccionadas del grupo que consiste de las sec. con núm. de ident.: 3, 20 y 26 y la región variable de cadena ligera seleccionadas del grupo que consiste de las sec. con núm. de ident.: 2, 9, 14, y 26;

Un fragmento de anticuerpo de unión al antígeno inmuno-específico para la IL-13 humana el cual se une a una variante de IL-13 R110Q con una K_D medida por resonancia del plasmón de superficie (Biacore) de menos de 250 pM ($0,250 \times 10^{-9}$ M) y evita la unión de la IL-13 a IL-13R2alfa1 en células THP-1 medido por la señalización de STAT6 y dicho anticuerpo se puede mostrar para contactar la IL-13 humana en los residuos de hélice A que comprenden Arg10, Ile13, Glu14 y residuos de hélice D que comprenden Lys103, Phe106, Arg107, Glu108, donde las distancias interatómicas no exceden 4,0 Å;

Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo IL-13 de la reivindicación 1 o cualquiera de los anticuerpos descritos y reivindicados en la presente descripción; y vectores, células huésped, que comprenden tales ácidos nucleicos;

Una composición, que incluye composiciones farmacéuticas, comprende un anticuerpo IL-13 de la reivindicación 1 o cualquier otro anticuerpo descrito en la presente descripción.

Un método para diagnosticar o tratar una afección relacionada con la IL-13, que incluye asma, en una célula, órgano o animal, el método que comprende poner en contacto o administrar una composición que comprende una cantidad efectiva ($0,001$ -

25

50 mg/kilogramo) de un anticuerpo descrito en la presente descripción;

Un método para inmunizar un huésped mediante el uso de un epítipo IL-13 que comprende residuos de hélice A (Arg10, Ile13, Glu14) y residuos de hélice D (Lys103, Phe106, Arg107, Glu108) o un péptido mimético de estos; y

Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-22, y 24-30 presentadas y el uso de un anticuerpo anti-IL-13 de cualquiera de las reivindicaciones 1-22, y 24-30 presentadas, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un desorden mediado por la IL-13.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Alineamientos de las regiones V seleccionados de genotecas de marco humano que se usan para la adaptación humana de las CDR C836 murinas injertadas (dentro de cuadros) para la cadena ligera (alineamiento superior) y la cadena pesada (alineamiento inferior).

Figura 2. Datos obtenidos de un ensayo de unión de competencia IL-13R-alfa2 para varios mAbs de alta afinidad generados por medio del uso de variantes humanizadas de C863, en donde la variante L-CDR3 (especificada) se apareó con la variante 2C02 de cadena pesada y se usó IL-13-WTbiotinilada a 500 pg/ml.

Figura 3. Una tabla que refleja los diferentes esquemas numerados para definir la estructura de los anticuerpos preferidos.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

Sec. con núm. de ident.:	Designación(es)	Descripción
1	IL-13, IL-13R130Q, IL-13R110Q	Cadena madura de IL-13 humana (112 aminoácidos) y variante R110Q
2	C836 LCV, Lc16, 2A02	Región variable de cadena ligera Mab C836 murina
3	C836 HCV, Hc7, 1A01	Región variable de cadena pesada Mab C836 murina
4	Lc1, 1A02	VB_A20 de marco humano con CDR-L C836
5	Lc2, 1C03	VB_O12 de marco humano con CDR-L C836
6	Lc3, 1F03	VB_L18 de marco humano con CDR-L C836
7	Lc4, 1G02	VB_A30 de marco humano con CDR-L C836
8	Lc5, 3A01	VB_L8 de marco humano con CDR-L C836
9	Lc6, 3C09	VB_L6 de marco humano con CDR-L C836
10	Lc7, 3E02	VB_O14 de marco humano con CDR-L C836
11	Lc8, 4A01	VB_L12 de marco humano con CDR-L C836
12	Lc9, 4C07	VB_L1-JK4 de marco humano con CDR-L C836
13	Lc10, 4E01	VB_L8-JK4 de marco humano con CDR-L C836
14	Lc11, 4G04	VB_L9-JK4 de marco humano con CDR-L C836
15	Lc12, 5A09	VB_L15-JK4 de marco humano con CDR-L C836
16	Lc13, 5C03	VB_L14-JK4 de marco humano con CDR-L C836
17	Lc14, 7A01	VB_L12-JK4 de marco humano con CDR-L C836
18	Lc15, 6A06	VB_L24-JK4 de marco humano con CDR-L C836
19	Hc1, 2A01	VB_2-70 de marco humano con CDR-H C836
20	Hc2, 2C02	VB_2-26 de marco humano con CDR-H C836
21	Hc3, 2E01	VB_2-05 de marco humano con CDR-H C836
22	Hc4, 4E07	VB_4-30 de marco humano con CDR-H C836
23	Hc5, 3C04	VB_4-28 de marco humano con CDR-H C836
24	Hc6, 3E02	VB_3-33 de marco humano con CDR-H C836
25	M1295	Región variable de cadena ligera de marco humano modificada
26	M1295	Región variable de cadena pesada de marco humano modificada
27	Anti-IL-13 Lc	Variantes de región variable de cadena ligera de marco humano modificadas
28	Anti-IL-13 Hc	Variantes de región variable de cadena ligera de marco humano modificadas
29	Variantes LLc-CDR3	Variantes activas

27

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Abreviaturas

CDR = Región de determinación complementaria; ELISA= Ensayo
 5 inmunoabsorbente unido a enzimas; Fab= fragmento de unión al antígeno; Hc =
 cadena pesada del anticuerpo; HFA = Marco humano adaptado; HV: regiones
 hipervariables; variante IL-13 R130Q de IL-13 (numeración desde la metionina
 núm. 1 del péptido de señal) o IL-13 R110Q de la cadena madura; Lc = cadena
 ligera de anticuerpo; mAb = anticuerpo monoclonal; Ra1 o R alfa 1 = receptor IL-
 10 13 alfa 1 humano; Ra2 o R alfa 2 = receptor IL-13 alfa 2 humano; SDRU uso del
 residuo determinante de especificidad; TBST amortiguador Tris salino con
 Tween.

Definiciones

Los términos "dominio de unión al antígeno," o "porción de unión al
 15 antígeno" de un anticuerpo, como se usa en la presente descripción, se refieren a
 uno o más fragmentos de un anticuerpo que retiene la capacidad para unirse
 específicamente a un antígeno (*por ejemplo*, IL-13). Se demostró que la función de
 unión al antígeno de un anticuerpo se puede realizar por los fragmentos de un
 anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados
 20 dentro del término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen un
 fragmento Fab, un fragmento monovalente que tiene los dominios VL, VH, CL y
 CH1; un fragmento F(ab)2, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos
 Fab enlazados por puentes de bisulfuro a una región de articulación; un fragmento
 Fd que tiene los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que tiene los dominios VL y
 25 VH de un solo brazo de un anticuerpo; un anticuerpo del dominio o fragmento dAb
 (Ward y otros, 1989 Nature 341:544-546), que consiste de un dominio VH; y una
 región de determinación complementaria (CDR) aislada, especialmente y una

28

CDR3 (ver, por ejemplo, en la patente núm. WO03/025019, cuyo contenido se incorpora en la presente descripción como referencia).

Las regiones de unión al antígeno se definen por medio del uso de varios términos. El término "regiones determinantes complementarias (CDR)" se basa en la variabilidad de la secuencia (Wu y Kabat, J. Exp. Med. 132:211-250, 1970). Existen seis CDR, tres en la cadena pesada variable, o VH, y se designan, típicamente, H-CDR1, H-CDR2, y H-CDR3, y tres CDR en la cadena ligera variable, o VL, y se designan, típicamente, L-CDR1, L-CDR2, y L-CDR3 (Kabat y otros, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.º Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991). "Región hipervariable", "HVR", o "HV" se refieren a las regiones de un dominio de anticuerpo variable que son variables en estructura como lo define Chothia y Lesk (Chothia y Lesk, Mol. Biol. 196:901-917, 1987). Existen seis HVR, tres en VH (H1, H2, H3) y tres en VL (L1, L2, L3). Chothia y Lesk se refieren a las HV estructuralmente conservadas como "estructuras canónicas". Otro método de describir las regiones que forman el sitio de unión al antígeno se propuso en Lefranc (Lefranc y otros, Developmental & Comparative Immunology 27:55-77, 2003) basado en la comparación de los dominios V de las inmunoglobulinas y receptores de células T (Lefranc y otros, Developmental & Comparative Immunology 27:55-77, 2003). El sitio de unión al antígeno se puede delinear en base al "Uso del Residuo Determinante de la Especificidad (SDRU)", de conformidad con Almagro (Almagro, Mol. Recognit. 17:132-43, 2004), donde SDRU se refiere a residuos de aminoácidos de una inmunoglobulina que están directamente involucrados en el contacto con el antígeno. Una correspondencia entre las diferentes definiciones de las regiones de unión de anticuerpos ejemplares descritos y reivindicados se presenta en la FIGURA 3. En la presente descripción se usó la numeración de Chothia y las convenciones indel (Al-lazikani

29

y otros, J Mol. Biol. 1997) y CDR ya que las regiones CDR se definen como posiciones específicas dentro de la secuencia lineal de VH o VL que toma en cuenta las contribuciones o contribuciones potenciales de esos residuos a la unión al antígeno.

5 Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH son codificados por genes separados, pueden unirse, por medio del uso de métodos recombinantes, por un enlazador sintético que les permite formarse como una sola cadena de proteína en la cual las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); ver *por*
 10 *ejemplo*, Bird y otros, 1988 Science 242:423-426; y Huston y otros, 1988 Proc. Nat. Acad. Sci. 85:5879-5883). Tales anticuerpos de cadena sencilla son abarcados por el término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen por medio del uso de técnicas convencionales conocidas por aquellos con experiencia en la materia, y los
 15 fragmentos se ensayan con respecto a su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Un "anticuerpo aislado", como se usa en la presente descripción, se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (*por ejemplo*, un anticuerpo aislado
 20 que se une específicamente a la IL-13 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de la IL-13). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a la IL-13 puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como las moléculas de IL-13 de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre
 25 de otro material celular y/o sustancias químicas.

Los términos "anticuerpo monoclonal," "Mab", o "composición del anticuerpo monoclonal" se entienden, generalmente, que se refieren a un

anticuerpo, o composición de anticuerpos, de manera que un anticuerpo es el producto de un hibridoma capaz de secretar solamente un tipo de anticuerpo, o se produce por un transfectoma, o es un anticuerpo preparado y aislado por métodos recombinantes a partir de un hibridoma, un transfectoma, o una
5 genoteca de anticuerpo humano combinatoria, o el anticuerpo se prepara, expresa, crea o aísla por cualquier otro medio que involucra escisión y empalme de todo o una porción de un gen de inmunoglobulina humana, secuencias a otras secuencias de ADN.

El término "anticuerpo humanizado", "anticuerpo modificado",
10 "marco humano adaptado", y "HFA" como se usa en la presente descripción, pretende incluir los anticuerpos que tienen marcos de región variable que se derivan de secuencias de origen humano. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante se deriva típicamente de tales secuencias humanas, *por ejemplo*, secuencias de la línea germinal humana, o de origen
15 natural (*por ejemplo*, alotipos) o versiones mutadas de secuencias de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanizados de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias humanas (*por ejemplo*, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específicas del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*).

20 El término "interleucina-13" o "IL- 13" es, excepto en donde el contexto lo indique de otra forma, la IL- 13 humana como se representa por la cadena madura mostrada en la sec. con núm. de ident.: 1. La presente invención proporciona anticuerpos, particularmente anticuerpos humanos o humanizados, que se unen a los residuos de aminoácidos en la IL- 13 humana y, desde el momento en que estos
25 residuos presentan un epítipo tridimensional con la molécula de IL-13, se puede esperar que los anticuerpos monoclonales de la presente invención reaccionen de manera cruzada con la IL-13 de primate no humana, que incluye IL-13 de monos

31

cinomolgos y rhesus u otros homólogos de la IL-13 de otras especies. Los anticuerpos de acuerdo con las modalidades de la presente invención se unen a una variante de la IL-13, en donde un residuo de arginina en la posición 130 del aminoácido se reemplaza con glutamina.

5 Como se usa en la presente descripción, el término "alta afinidad" para un anticuerpo se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10^{-8} M o menos, con mayor preferencia, 10^{-9} M o menos y, aún con mayor preferencia, 10^{-10} M o menos. El término " K_{dis} " o " K_D " o " K_d ", como se usa en la presente descripción, pretende denominar la tasa de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno
10 particular. La " K_D ", es la relación de la tasa de disociación (k_2), también llamada la "constante de disociación (k_{off})" o " k_d ", de la tasa de la constante de asociación (k_1) o "constante de asociación (k_{on})" o " k_a ". Así, K_D iguala k_2/k_1 o k_{off} / k_{on} o k_d / k_a y se expresa como una concentración molar (M). Se deduce que mientras menor es K_D , más fuerte es el enlace. Así, un K_D de 10^{-6} μ M (o 1 mM) indica un enlace débil
15 comparado con 10^{-9} M (o 1 nM).

 Como se usa en la presente descripción, "unión específica" o "unión inmuno-específica" o "se une inmuno-específicamente" se refieren a una unión del anticuerpo a un antígeno predeterminado. Típicamente, el anticuerpo se une con una constante de disociación (K_D) de 10^{-7} M o menos, y se une al antígeno
20 predeterminado con una K_D que es al menos dos veces menor que su K_D para la unión a un antígeno no específico (*por ejemplo*, BSA, caseína, u otro polipéptido no específico) distinto del antígeno predeterminado. Las frases "un anticuerpo que reconoce la IL-13" y "un anticuerpo específico para la IL-13" se usan
intercambiabilmente en la presente descripción con el término "un anticuerpo que
25 se une inmuno-específicamente a la IL-13."

Anticuerpos – Características

32

El contenido descrito y reivindicado en la presente descripción se relaciona con anticuerpos modificados anti-IL-13 que se unen a la IL-13 y, preferentemente, interfiere con la actividad de la IL-13 o la unión *in vivo*, *in vitro*, y/o *in situ*. Un anticuerpo anti-IL-13 preferido, porción especificada de este, o variante puede, además, modular la función o actividad de la IL-13, tal como, pero sin limitarse a, la señalización del receptor de la IL-13, la sobre o desregulación del receptor de la IL-13, actividad de la IL-13 asociada con la señalización del receptor, síntesis de ARN, ADN o proteína, liberación de proteína, que incluyen IgE e inducción de antígenos de clase II complejos de mayor histocompatibilidad y CD23.

Los anticuerpos modificados pueden comprender cualquier tipo de dominios constantes de cualquier clase de anticuerpo, que incluye IgM, IgG, IgD, IgA y IgE, y cualquier subclase (isotipo), que incluye IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4. Cuando se desea que el anticuerpo modificado exhiba actividad citotóxica, el dominio constante es usualmente un dominio constante de fijación al complemento y la clase es típicamente IgG₁. Cuando no se desea tal actividad citotóxica, el dominio constante puede ser de la clase IgG₂. El anticuerpo modificado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo.

Los ácidos nucleicos que codifican regiones variables de cadena ligera y pesada modificadas, opcionalmente unidas a regiones constantes, se insertan en vectores de expresión. Las cadenas ligeras y pesadas se pueden clonar en los mismos o diferentes vectores de expresión. Los segmentos de ADN que codifican secuencias de aminoácidos de anticuerpos se unen operablemente a las secuencias control en el(los) vector(es) de expresión que aseguran la expresión de los polipéptidos de inmunoglobulina. Tales secuencias control incluyen una secuencia señal, un promotor, un potenciador, y una secuencia de terminación de la transcripción (ver Queen y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados

33

Unidos 86, 10029 (1989); patente núm. WO 90/07861; Co y otros, J. Immunol. 148, 1149 (1992), las cuales se incorporan en la presente descripción como referencia en su totalidad para todos los propósitos). Debido a la redundancia en el código genético, los segmentos de ADN que codifican cadenas de

5 inmunoglobulinas, subdominios o fragmentos de estos pueden variar la composición seleccionada a partir de porciones de secuencias humanas de ácido nucleico de origen natural, secuencias hibridizables para tales secuencias, o secuencias completamente artificiales que codifican las secuencias de aminoácidos del anticuerpo.

10 Los anticuerpos humanos monoclonales de la invención se pueden probar para unirse a la IL-13, por ejemplo, por ELISA estándar.

En un aspecto los anticuerpos de la presente invención comprenden un anticuerpo específico IL-13, o fragmento de unión IL-13 de éste, porción especificada de éste, o variante que modula (preferentemente inhibe) una

15 actividad biológica mediada por la IL-13, *in vitro*, *in vivo*, o *in situ*, y exhibe uno o más de los siguientes criterios:

1. se une a la IL-13 recombinante silvestre humana o purificada (sec. con núm. de ident.: 1), y la variante Q110 de la IL-13 de origen natural, o un fragmento de esta, en un ensayo en fase sólida;
- 20 2. tiene una K_d aparente para el mutante específico o silvestre de la IL-13 humana menor que 0,25 nM (determinado por resonancia de plasmón de superficie
3. inhibe la unión de la IL-13 humana silvestre recombinante humana al receptor IL-13 alfa 1 humano, o a un receptor de la IL-13 animal no humano
- 25 medido por la fosforilación Stat-6 inducida por la IL-13 silvestre, que es un evento de transducción de señales específico IL-13Ra1;

34

4. inhibe la unión de la IL-13 humana silvestre recombinante humana al receptor IL-13 alfa 2 humano o un receptor de la IL-13 animal no humano adecuado;
5. contacta la IL-13 en los residuos en la hélice A (Arg10, Ile13, Glu14) y 5
5 residuos de hélice D (Leu100, Lys103, Phe106, Arg107, Glu108), en donde las distancias interatómicas no exceden 4,0 Å;
6. tiene una solubilidad de al menos 10-100 mg/ml en PBS a pH 7,4, tal como al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 u 80 mg/ml;
7. evita o suprime la proliferación de células THP-1 de tumor humano dependiente
10 de la IL-13 humana silvestre en comparación con el crecimiento en presencia de una concentración de IL-13 sin anticuerpo presente;
8. inhibe la producción de IgE *in vitro* dependiente de la IL-13 humana recombinante silvestre de la IL-13 humana en una preparación de células B humanas fresca en comparación con células B frescas estimuladas con la
15 misma concentración de la IL-13 en ausencia del anticuerpo; y
9. se une a la IL-13 humana nativa silvestre con una potencia similar a aquella para la IL-13 recombinante, como se puede determinar por un bioensayo dependiente de la IL-13 o ensayo de unión en fase sólida.

En otro aspecto de la invención las características estructurales de los
20 dominios de unión se usan para crear anticuerpos humanos anti-IL-13 estructuralmente relacionados que mantienen una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tal como la unión a la IL-13. Más específicamente, una o más regiones CDR de un anticuerpo y las variantes descritas en la presente descripción se puede combinar recombinantemente con regiones marco humanas
25 conocidas y CDR para crear los anticuerpos humanos anti-IL-13 adicionales, recombinantemente modificados de la invención.

Por ejemplo, una aproximación que se tomó para hacer anticuerpos específicos IL-13 que tienen una o más de las características anteriormente descritas fue generar hibridomas murinos de tejido linfoide tomado de ratones inmunizados con la forma madura de la variante R130Q humana de la IL-13 (sec. con núm. de ident.:

- 5 1). Después de la inmunización, un anticuerpo monoclonal R130Q de IL-13 anti-humano murino se obtuvo y se designó "C836". Las CDR C836 de las regiones variables de cadena ligera y pesada (sec. con núm. de ident.: 2 y 3, respectivamente) se injertaron en los marcos de cadena pesada y cadena ligera humanos seleccionados y la afinidad de unión optimizados. Específicamente, la afinidad de
- 10 unión de estos anticuerpos del marco humano adaptado (HFA) para la IL-13 humana y la variante IL-13 R130Q se mejoraron por mutación dirigida por aleatorización y selección de una genoteca de Fab de presentación en fagos, o por mutagénesis dirigida al sitio, para desarrollar un panel de cadenas ligeras y pesadas capaces de unirse con alta afinidad a la IL-13 humana y la variante IL-13 R130Q (que también
- 15 porta la designación "IL-13 R110Q"). El apareado de las cadenas ligeras y pesadas maduras de afinidad descrito en la presente descripción permite la construcción de anticuerpos completos que tienen valores de K_D mejorados los que pueden ser del orden de aproximadamente 50 pM, y una solubilidad mayor que 100 mg/ml en solución salina regulada con fosfato. Los anticuerpos maduros de afinidad bloquean
- 20 la unión de IL-13 a los receptores IL-13 alfa 1 ($R\alpha 1$) y alfa 2 ($R\alpha 2$). Los anticuerpos muestran estas características cuando se expresan en sistema de expresión en mamíferos tales como células 293 de riñón embrionicas humanas (HEK293) o células de ovario de hámster chino (CHO).

- Un mAb, en particular aceptado para la caracterización avanzada,
- 25 comprende una cadena ligera de la maduración mediada por fagos de Lc6 (sec. con núm. de ident.: 9) y una cadena pesada de la mutagénesis dirigida al sitio de dos metioninas en las CDR de Hc2 (sec. con núm. de ident.: 20). Este mAb se

designó M1295 y comprende la sec. con núm. de ident.: 25 y 26 como las regiones variables Lc y Hc, respectivamente, y puede codificarse por las secuencias de ácido nucleico correspondientes y expresarse en una célula huésped u otro sistema que comprenda los componentes necesarios para la transcripción y/o traducción.

La invención proporciona, además, composiciones y métodos específicos para la preparación de las composiciones que comprenden un dominio variable seleccionado de cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 2 a 28 las cuales tienen las características deseadas y la actividad biológica para tratar un trastorno mediado por la IL-13. Como se estableció anteriormente, en una modalidad se usan las tres CDR de cadena pesada y tres CDR de cadena ligera del anticuerpo C836 o fragmento de unión al antígeno, como se muestra en la Tabla 2. Los anticuerpos recombinantes comprenden, preferentemente, las regiones CDR de cadena pesada y ligera de C836, y variantes de esta, como se muestra en la Tabla 2, y aquellos residuos de las regiones específicas de las sec. con núm. de ident.: 27-29. Los anticuerpos pueden comprender, además, los dominios CDR2 de C836 y variantes de esta. Más aún, los anticuerpos de la invención pueden comprender los dominios de CDR1 de C836 y variantes de estos. La invención puede proporcionar, además, anticuerpos anti-IL-13 que comprenden: (1) regiones marco de cadena pesada humanas, y (2) regiones marco de cadena ligera humanas junto con dominios CDR preferidos. Las regiones marco humanas son sustancialmente idénticas a las regiones marco de las sec. con núm. de ident.: 4 a la 28. Sin embargo, otras regiones marco combinadas con regiones CDR preferidas se pueden usar para obtener los anticuerpos que tienen las propiedades deseadas para el destino de interés (por ejemplo, la IL-13).

Adicionalmente, y como ejemplo no limitante, el anticuerpo o porción de unión al antígeno o variante puede comprender una secuencia de aminoácidos de

37

cadena pesada de las sec. con núm. de ident.: 19-24, y/o una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de las sec. con núm. de ident.: 4-18. En una modalidad particular el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede tener una región de unión al antígeno que comprende una porción de una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 28. En otra modalidad particular el anticuerpo o porción de unión al antígeno o variante puede tener una región de unión al antígeno que comprende una porción de una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 27. Tales anticuerpos se pueden preparar al unir químicamente las diferentes porciones (*por ejemplo*, CDR, marco, *etc.*) del anticuerpo por medio del uso de técnicas convencionales, al preparar y expresar una molécula de ácido nucleico que codifica la(s) secuencia(s) de cadena pesada o ligera por medio del uso de técnicas convencionales de la tecnología de ADN recombinante o por medio del uso de cualquier otro método adecuado.

Los dominios de las CDR1, 2, y/o 3 de los anticuerpos modificados pueden consistir de secuencia(s) de aminoácidos particular(es) descritas en la presente descripción. Adicionalmente, las regiones CDR pueden tolerar la variabilidad de la secuencia y mantener sus características biológicas y de unión deseadas. En consecuencia, en otra modalidad, el anticuerpo modificado puede comprender CDR que son, por ejemplo, 90 %, 95 %, 98 % ó 99,5 % idénticas a una o más CDR de C836, como se muestra en la Tabla 2 y variantes como se da en las posiciones especificadas de las sec. con núm. de ident.: 2-29. Las regiones marco de inmunoglobulinas son sustancialmente idénticas o idénticas a las regiones marco de las regiones variables de la línea germinal humana de la que se derivan. Muchos de los aminoácidos en la región marco contribuyen poco o no contribuyen directamente a la especificidad o afinidad de un anticuerpo. Así, muchas sustituciones conservativas de los residuos del marco se pueden tolerar sin cambio

38

apreciable de la especificidad o afinidad de la inmunoglobulina humanizada resultante. Las regiones marco pueden ser 90 %, 95 %, 98 % ó 99,5 % idénticas a uno o más de los marcos descritos en la presente descripción mientras permite que las regiones variables de la inmunoglobulina mantengan la capacidad para

5 contactar los residuos del destino (*por ejemplo*, IL-13). Los segmentos variables de los anticuerpos humanizados producidos como se describió *anteriormente* se unen, típicamente, a al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina humana. El anticuerpo contendrá regiones constantes de cadena ligera y cadena pesada. La región constante de cadena pesada incluye, usualmente, dominios CH1,

10 articulación, CH2, CH3, y, algunas veces, CH4.

La estructura del anticuerpo IL-13 (o fragmentos de éste) se pueden definir también de conformidad con la estructura cristalina tridimensional de los anticuerpos IL-13 modificados que forman complejo con la IL-13 o una variante de la IL-13. La secuencia de aminoácidos de un anticuerpo IL-13 se puede alterar, pero

15 sin embargo mantener una estructura cristalina tridimensional que permite a los anticuerpos IL-13 modificados contactar el epítipo IL-13 y producir un anticuerpo específico IL-13 de neutralización. Preferentemente, las regiones marco del anticuerpo pueden ser 90 %, 95 %, 98 % ó 99,5 % idénticas a uno o más de los marcos descritos en la presente descripción mientras permite que las regiones

20 variables de la inmunoglobulina mantengan la capacidad para contactar residuos específicos de la IL-13 de hélice A (Arg10, Ile13, Glu14) y residuos de hélice D (Leu100, Lys103, Phe106, Arg107, Glu108), donde las distancias interatómicas no exceden 4,0 Å.

Los anticuerpos IL-13 descritos en la presente descripción se pueden

25 definir, además, en términos del parátipo involucrado con la unión a IL-13. Por ejemplo, los anticuerpos que tienen una región de parátipo que incluye los residuos de una región variable de cadena ligera enumerados desde el residuo amino terminal

39

como "1", dados por los residuos de cadena L Tyr32, His91, Asn92 de la sec. con núm. de ident.: 2 y 9 residuos de la cadena H Tyr32, Trp54, Trp55, Asp56, Val58, Arg60, Asp103, Tyr104, Asp105 de la sec. con núm. de ident.: 3, enumerados desde el residuo amino terminal como "1", son modalidades particulares de estos

- 5 anticuerpos modificados. Otra modalidad particular es un anticuerpo que incluye residuos de la cadena L Tyr32, His91, Asp92 (sec. con núm. de ident.: 25) y residuos de cadena H Tyr32, Trp54, Trp55, Asp56, Val58, Arg60, Asp103, Tyr104, Asp105) de la sec. con núm. de ident.: 3.

- Adicionalmente, para la unión a la IL-13, los anticuerpos modificados
- 10 tales como los descritos anteriormente se pueden seleccionar para que mantengan otras propiedades funcionales de los anticuerpos de la invención, tales como la capacidad para inhibir la unión de la IL-13 a IL-13R-alfa1 y prevenir la señalización de la IL-13R-alfa1 a través de STAT6 y de ese modo bloquear o reducir las bioactividades asociadas en células, tejidos, y órganos *in vivo*.

15 **Método de preparar y probar los anticuerpos anti-IL-13**

- Un anticuerpo anti-IL-13 de la presente invención se puede generar, opcionalmente, por una variedad de técnicas, que incluyen la técnica de hibridación celular somática estándar (método del hibridoma) de Kohler y Milstein (1975) Nature 256:495. En el método del hibridoma, un ratón u otro animal huésped, tal como un
- 20 hámster o mono macaco se inmuniza como se describe en la presente descripción para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro* y fusionar con células de mieloma por medio del uso de un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar
- 25 una célula de hibridoma.

El anticuerpo anti-IL-13 se puede generar, además, por inmunización de un animal transgénico (*por ejemplo*, ratón, rata, hámster, primate no humano, y

similares) capaz de producir un repertorio de anticuerpos humanos, como se describe en la presente descripción y/o como se conoce en la materia. Las células que producen un anticuerpo anti-IL-13 humano se pueden aislar de tales animales e inmortalizar por medio del uso de métodos adecuados, tales como los métodos

5 descritos como hibridomas u otros métodos conocidos en la materia.

Alternativamente, el anticuerpo de secuencias codificantes se puede clonar, introducir en un vector adecuado, y usar para transfectar una célula huésped para la expresión y aislamiento del anticuerpo por métodos que se enseñan en la presente descripción y aquellos conocidos en la materia.

10 El uso de ratones transgénicos que portan loci de inmunoglobulina (Ig) humana en su configuración de línea germinal proporcionan el aislamiento de los anticuerpos monoclonales completamente humanos de alta afinidad dirigidos contra una variedad de objetivos que incluyen los propios antígenos humanos para los que el sistema inmune humano normal es tolerante (ver, por ejemplo, Lonberg,

15 N. y otros, patentes de los Estados Unidos núm. US 5.569.825, US 6.300.129; Kucherlapati, y otros, patente de los Estados Unidos núm. US 6.713.610). Los loci de inmunoglobulina endógenos en esos ratones se pueden interrumpir o suprimir para eliminar la capacidad del animal para producir anticuerpos codificados por los genes endógenos. Adicionalmente, las compañías tales como Abgenix, Inc.

20 (Fremont, Calif.) y Medarex (San Jose, Calif.) se pueden encargar de proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado por medio del uso de la tecnología como se describió anteriormente.

Los anticuerpos obtenidos de fuentes no humanas se pueden humanizar. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede comprender porciones

25 derivadas de una inmunoglobulina de origen no humano con la especificidad necesaria, tal como un ratón, y de secuencias de inmunoglobulina de origen humano (por ejemplo, inmunoglobulina quimérica), unida químicamente por

41

técnicas convencionales (*por ejemplo*, sintéticas) o preparada como un polipéptido contiguo por medio del uso de técnicas de ingeniería genética (*por ejemplo*, ADN que codifica las porciones de proteína del anticuerpo quimérico se puede expresar para producir una cadena de polipéptido contiguo). Otro ejemplo

5 de una inmunoglobulina humanizada es una que contiene una o más cadenas de inmunoglobulinas que comprenden una CDR derivada de un anticuerpo de origen no humano y una región marco que se deriva de una cadena ligera y/o pesada de origen humano (*por ejemplo*, anticuerpos con injerto de CDR con o sin cambios del marco). El proceso de adaptación del marco se basó en la

10 similitud de las regiones de marco entre el mAb C836 de ratón y las secuencias en las bases de datos de líneas germinales humanas como se describe esencialmente en la patente núm. WO/08052108A2 "Methods For Use In Human-Adapting Monoclonal Antibodies", en donde la longitud del marco se hace coincidir residuo por residuo a la de la variable parental o la de las regiones

15 V. En total, dieciséis marcos de cadena ligera (LC) y seis de cadena pesada (HC) se adaptaron al marco humano mediante la combinación de las CDR C836 con los marcos humanos seleccionados.

En una modalidad, el anticuerpo humano se selecciona de una genoteca de fagos, en donde el fago comprende genes de inmunoglobulina humana

20 y la genoteca expresa dominios de unión del anticuerpo humano como, por ejemplo, anticuerpos de cadena sencilla (scFv), como Fab, o algún otro constructo que exhibe regiones variables del anticuerpo apareadas o no apareadas fusionadas a una o más de las proteínas de recubrimiento del fago. Esos métodos de exhibición de fagos para aislar anticuerpos humanos se establecieron en la materia, ver, por

25 ejemplo: las patentes de los Estados Unidos núms. 5.223.409; 5.403.484; y 5.571.698 de Ladner y *otros*,; las patente de los Estados Unidos núms. 5.427.908 y 5.580.717 de Dower y *otros*,; las patente de los Estados Unidos núms. 5.969.108 y

u2

6.172.197 de McCafferty y *otros*,; y las patentes de los Estados Unidos núms. 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 de Griffiths y *otros*.

Los ácidos nucleicos aislados de la presente invención se pueden

5 preparar por medio del uso de (a) métodos recombinantes; (b) técnicas sintéticas; (c) técnicas de purificación, o combinaciones de estos, como se conocen bien en la materia. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y se secuencia fácilmente por medio del uso de métodos conocidos en la materia (*por ejemplo*, por medio del uso de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse

10 específicamente a los genes que codifican las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos murinos). Donde se produce un hibridoma, tales células pueden servir como una fuente de ese ADN. Alternativamente, por medio del uso de técnicas de exhibición en donde la secuencia codificante y el producto de la traducción se unen, tal como un fago o genotecas de exhibición ribosomal, la selección del aglutinante y

15 el ácido nucleico se simplifican. Después de la selección del fago, las regiones codificantes del anticuerpo del fago se pueden aislar y usar para generar anticuerpos completos, que incluyen anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión al antígeno deseado, y que se expresan en cualquier huésped deseado, que incluyen células de mamíferos, células de insectos, células vegetales;

20 levadura, y bacteria. Para la fabricación comercial, el anticuerpo que codifica para el ADN será transfectado en una célula huésped adecuada, clones estables aislados, y la línea celular expandida en un banco de células maestro.

Método de usar los anticuerpos anti-IL-13

La presente invención proporciona, además, un método para modular

25 o tratar una enfermedad relacionada con la IL-13, en una célula, tejido, órgano, animal, o paciente, como se conoce en la materia o como se describe en la presente descripción, por medio del uso de un anticuerpo anti-IL-13 de la presente

43

invención. La presente invención proporciona un método para modular o tratar una enfermedad relacionada con la IL-13, en una célula, tejido, órgano, animal, o paciente que incluye, pero no se limita a, una enfermedad fibrótica, neoplásica, metabólica, una enfermedad inmune o inflamatoria relacionada, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad infecciosa, una dermatológica, o una enfermedad neurológica. El contenido descrito en la presente descripción incluye, además, el uso de un anticuerpo anti-IL-13 descrito en la presente descripción en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno mediado por la IL-13, que incluye, pero no se limita a, asma, dermatitis atópica, rinitis alérgica, y trastornos respiratorios relacionados, y otros trastornos mediados por la IL-13 descritos en la presente descripción.

La interleucina 13 (IL-13) se asocia con las respuestas inflamatorias tipo II que se ilustran con la triada atópica del asma, dermatitis atópica y rinitis alérgica. Las evidencias emergentes vinculan la vía de la IL-13 en la patogénesis de la esofagitis eosinófila (EE), una enfermedad gastrointestinal mediada por eosinófilos. Adicionalmente, la IL-13 se asocia con patologías de enfermedades no atópicas relacionadas con la inflamación y remodelación tisular observada en sujetos no atópicos con asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), y en pacientes con enfermedades fibróticas que incluyen la esclerosis sistémica (SSc), y fibrosis pulmonar idiopática (IPF). Las razones para centrarse en la IL-13 es que las respuestas atópicas y no atópicas en subconjuntos de enfermedades específicas son gobernadas por la IL-13, y que el antagonismo de la proteína IL-13 deroga tales respuestas.

Enfermedad respiratoria

La presente invención proporciona, además, un método para modular o tratar una enfermedad bronquial, pulmonar o pleural en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, que incluye, pero no se limita a: asma;

✓✓

neumonía absceso pulmonar; enfermedades pulmonares ocupacionales provocadas por los agentes inspirados o inhalados; y afecciones y fallo respiratorio o causas que conduzcan al fallo respiratorio. La presente invención proporciona, además, un método para modular o tratar enfermedad hiperactiva de las vías respiratorias; bronquiolitis fibrosas obliterantes; enfermedades de hipersensibilidad de los pulmones que incluyen neumonitis por hipersensibilidad (alveolitis alérgica extrínseca), aspergilosis broncopulmonar alérgica, y reacciones a medicamentos; síndrome de estrés respiratorio del adulto (ARDS), síndrome de Goodpasture, trastornos de las vías respiratorias obstructivo crónico (COPD), enfermedad pulmonar intersticial idiopática tal como la fibrosis pulmonar idiopática y sarcoidosis; neumonía intersticial descamativa; neumonía intersticial aguda; enfermedad pulmonar intersticial asociada con la bronquitis respiratoria; bronquiolitis idiopáticas obliterantes con organización de la neumonía; neumonitis intersticial linfocítica; granulomatosis de células de Langerhans; hem siderosis pulmonar idiopática; bronquitis aguda; proteinosis alveolar pulmonar; bronquiectasia; atelectasia; fibrosis quística; tumores del pulmón; y embolismo pulmonar.

Enfermedad neoplásica

La presente invención proporciona, además, un método para modular o tratar una enfermedad maligna o neoplásica en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, que incluye, pero no se limita a: leucemia; leucemia aguda; leucemia linfoblástica aguda (ALL); célula B, célula T o FAB ALL; leucemia mieloide aguda (AML); leucemia mieloide crónica (CML); leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia de células capilares; síndrome mielodisplásico (MDS); un linfoma, especialmente linfoma de no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, un linfoma no maligno, linfoma de Burkitt; mieloma múltiple; tumores sólidos como enfermedad primaria o como enfermedad metastásica; sarcoma de Kaposi; carcinoma

MS

colorrectal; cáncer de próstata; cáncer testicular; carcinoma de células renales; cáncer de pulmón que incluye el mesotelioma; cáncer de mamas que incluye cáncer inflamatorio de mamas; carcinoma nasofaríngeo; histiocitosis maligna, síndrome paraneoplásico/hipercalcemia de malignidad; adenocarcinomas; carcinomas de células escamosas, particularmente de cabeza y cuello; sarcomas; melanoma maligno, particularmente melanoma metastásico; hemangioma; enfermedad metastásica; resorción ósea relacionada con cáncer; dolor óseo relacionada con cáncer; y similares. Adicionalmente, el anticuerpo de la presente invención se puede usar para tratar tumores primarios o secundarios de los órganos endocrinos tales como la pituitaria, tiroides, glándulas suprarrenales, páncreas, con lo que de ese modo, mejora, previene o alivia tales trastornos relacionados como galactorrea, baja estatura, gigantismo y acromegalia, diabetes insípida, diabetes, enfermedad de Addison, síndrome de Cushing, aldosteronismo, insuficiencia adrenal, feocromocitoma, trastornos de base ácida, y porfirias.

15 **Enfermedades inflamatoria e inmunes relacionadas**

La presente invención proporciona, además, un método para modular o tratar una enfermedad inmune relacionada, en una célula, tejido, órgano, animal, o paciente que incluye, pero no se limita a, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, artritis reumatoide sistémica de inicio juvenil, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, úlcera gástrica, artropatías seronegativas, osteoartritis, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, lupus eritematoso sistémico, síndrome antifosfolípido, iridociclitis/uveítis/neuritis óptica, fibrosis pulmonar idiopática, vasculitis sistémica/granulomatosis de Wegener, sarcoidosis, orquitis/procedimientos reversos de vasectomía, enfermedades alérgicas/atópicas, asma, rinitis alérgica, dermatitis alérgica (eczema), esofaguitis, dermatitis de contacto alérgica, conjuntivitis alérgica, neumonitis hipersensible, trasplantes, rechazo al trasplante de órganos, enfermedad de injerto contra el huésped,

46

- síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, síndrome séptico, septicemia por gram positivos, septicemia por gram negativos, septicemia de cultivo negativo, septicemia fúngica, fiebre neutropénica, urosepticemia, meningococcemia, traumatismo/hemorragia, quemaduras, exposición a radiación ionizante,
- 5 pancreatitis aguda, síndrome de dificultad respiratoria aguda, artritis reumatoide, hepatitis inducida por alcohol, patologías inflamatorias crónicas, patología de Crohn, anemia falciforme, diabetes, nefrosis, otras enfermedades atópicas, reacciones hipersensibles, rinitis alérgica, fiebre del heno, rinitis perenne, conjuntivitis, endometriosis, asma, urticaria, anafilaxia sistémica, dermatitis,
- 10 anemia perniciosa, enfermedad hemolítica, trombocitopenia, rechazo de injerto de cualquier órgano o tejido, rechazo a trasplante de riñón, rechazo al trasplante de corazón, rechazo al trasplante de hígado, rechazo al trasplante de páncreas, rechazo al trasplante de pulmón, rechazo al trasplante de médula ósea (BMT), rechazo a aloinjerto de piel, rechazo al trasplante de cartilago, rechazo al injerto
- 15 de hueso, rechazo al trasplante de intestino delgado, rechazo al implante de timo fetal, rechazo al trasplante de paratiroides, rechazo a xenoinjerto de cualquier órgano o tejido, rechazo de aloinjerto, reacciones de hipersensibilidad anti-receptor, enfermedad de Graves, enfermedad de Raynaud, diabetes resistente a insulina de tipo B, asma, miastenia grave, citotoxicidad mediada por anticuerpo,
- 20 reacciones de hipersensibilidad de tipo III, lupus eritematoso sistémico, síndrome POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammopatía monoclonal y síndrome de cambios en la piel), síndrome antifosfolípido, pénfigo, escleroderma, enfermedad mezclada de tejido conjuntivo, enfermedad idiopática de Addison, diabetes melitus, hepatitis crónica activa, cirrosis biliar primaria,
- 25 vitiligo, vasculitis, síndrome de cardiectomía post-IM, hipersensibilidad de tipo IV, dermatitis de contacto, neumonitis por hipersensibilidad, rechazo al aloinjerto, granulomas debido a organismos intracelulares, sensibilidad a fármacos,

57

metabólico/idiopático, enfermedad de Wilson, hemacromatosis, deficiencia en alfa-1-antitripsina, retinopatía diabética, tiroiditis de Hashimoto, osteoporosis, evaluación del eje hipotalámico-pituitaria-adrenal, cirrosis biliar primaria, tiroiditis, encefalomiелitis, caquexia, fibrosis quística, enfermedad del pulmón neonatal

5 crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), linfocitosis hematofagocítica familiar, afecciones dermatológicas, soriasis, alopecia, síndrome nefrótico, nefritis, nefritis glomerular, insuficiencia renal aguda, hemodiálisis, uremia, toxicidad, preeclampsia, e inflamación debido a terapia anti-cd3, terapia de citoquina, quimioterapia, terapia de radiación (*por ejemplo*, que incluye pero no se

10 limita a astenia, anemia, caquexia, y similares), intoxicación de salicilato crónica, y similares.

Adicionalmente, el anticuerpo anti-IL-13, fragmento, o variante de éste se puede usar para tratar enfermedades inflamatorias mediadas por eosinófilos; esofagitis mediada por eosinófilos, inflamación relacionada con los

15 pulmones, tráquea, alveolos o asma; tales como gastroenteritis eosinófila, inflamación gástrica o intestinal; y, en particular, en donde la señalización mediada por STAT6 cause esa inflamación eosinofílica, tal como en inflamación gastrointestinal mediada por STAT-6 y esofagitis eosinófila.

Enfermedad cardiovascular

20 La presente invención proporciona, además, un método para modular o tratar una enfermedad cardiovascular en una célula, tejido, órgano, animal, o paciente, relacionada o derivada de: arritmias y trastornos de conducción; hipertensión arterial; arteriosclerosis; tumores cardíacos; cardiomiopatías; enfermedad de la arteria coronaria; oclusión de la rama aórtica y aortitis;

25 endocarditis; edema pulmonar; pericarditis; y trastornos periféricos, arteriales, venosos y linfáticos; y trastornos vasculares. La presente invención proporciona, además, un método para modular o tratar una enfermedad cardiovascular en una

48

célula, tejido, órgano, animal, o paciente, que incluye, pero no se limita a, síndrome de atontamiento cardíaco, infarto del miocardio, fallo cardíaco congestivo, apoplejía, ataque isquémico, hemorragia, restenosis, enfermedad aterioesclerótica diabética, hipertensión, hipertensión arterial, hipertensión renovascular, síncope, ataques, fallo

5 cardíaco, corazón pulmonar, hipertensión pulmonar primaria, arritmias cardíacas, síndrome post-perfusión, respuesta inflamatoria a la desviación coronaria cardiopulmonar, taquicardia atrial multifocal o caótica, taquicardia regular de QRS estrecho, arritmias específicas, fibrilación ventricular, arritmias del haz de His, bloqueo atrioventricular, bloqueo de rama grupal, trastornos isquémicos del

10 miocardio, angina de pecho, infarto del miocardio, cardiomiopatía, cardiomiopatía congestiva dilatada, cardiomiopatía restrictiva, aneurismas aórticos y periféricos, disección aórtica, inflamación de la aorta, tromboangitis obliterantes, trastornos arteriales periféricos funcionales, enfermedad y fenómeno de Raynaud, acrocianosis, eritromelalgia, trombosis venosa, venas varicosas, fistula

15 arteriovenosa, linfedema, edema, angina inestable, lesión por reperfusión, síndrome post-bomba, lesión por reperfusión-isquemia, y similares.

Enfermedad neurológica

La presente invención proporciona, además, un método para modular o tratar una enfermedad neurológica que incluye las causas o secuelas de

20 alteraciones de uno o más de: fluido cerebroespinal y su circulación; neoplasmas intracraneales y trastornos paraneoplásicos; infecciones del sistema nervioso (bacteriano, fúngico, espiroquetas, parasítico, viral o priones); sarcoidosis; enfermedades cerebrovasculares; trauma cráneo cerebral; esclerosis múltiple y enfermedades desmielinativas aliadas; enfermedades heredadas o desarrolladas

25 del sistema nervioso; trastornos metabólicos del sistema nervioso; trastornos del sistema nervioso debido al alcohol, fármacos, toxinas, y otros agentes químicos; enfermedades de la médula espinal; y enfermedades del nervio y músculo

49

periféricos. La presente invención proporciona, además, un método para modular o tratar una enfermedad neurológica en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, que incluye, pero no se limita a: enfermedades neurodegenerativas; esclerosis múltiple; migrañas; complejo de demencia del SIDA; mielitis transversa aguda;

5 trastornos extrapiramidales y cerebelares tales como lesiones del sistema corticoespinal; trastornos del ganglio basal o trastornos cerebelares; trastornos de movimiento hiperquinético tales como Corea de Huntington y corea senil; trastornos de movimiento inducido por los fármacos, tales como los inducidos por los fármacos que bloquean los receptores de dopamina del SNC; trastornos de movimiento

10 hipoquinético, tales como enfermedad de Parkinson; parálisis supranuclear progresiva; lesiones estructurales del cerebelo; degeneraciones espinocerebelares, tales como ataxia espinal; ataxia de Friedreich; degeneraciones corticales cerebelares; degeneraciones de sistemas múltiples (Mencel, Dejerine-Thomas, Shi-Drager, y Machado-Joseph); trastornos sistémicos (enfermedades Refsum,

15 abetalipoproteemia, ataxia telangiectasia, y trastorno multi-sistema mitocondrial); trastornos núcleo desmielinizante, tales como esclerosis múltiple; mielitis transversa aguda; y trastornos de la unidad motora tales como atrofiás musculares neurogénicas (degeneración de las células del asta anterior, tales como esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal infantil y atrofia muscular espinal juvenil);

20 enfermedad de Alzheimer; trastornos mentales relacionados con el síndrome de Down; enfermedad difusa de los cuerpos de Lewy; demencia senil del tipo de cuerpos de Lewy; síndrome de Wernicke-Korsakoff; trastornos mentales asociados con alcoholismo crónico; enfermedades priónicas tales como la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; panencefalitis esclerosante subaguda; enfermedad de

25 Hallerorden-Spatz; demencia pugilística, y similares. Tal método puede comprender, opcionalmente, administrar una cantidad efectiva de una composición o composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-IL-13 o variante o

50

porción específica a una célula, tejido, órgano, animal o paciente que necesita de tal modulación, tratamiento o terapia.

Otros usos terapéuticos de los anticuerpos anti-IL-13

Adicionalmente a las afecciones y enfermedades anteriormente

- 5 descritas, la presente invención proporciona, además, un método para modular o tratar afecciones fibróticas de varias etiologías tales como fibrosis del hígado (que incluye pero no se limita a cirrosis inducida por alcohol, cirrosis inducida por virus, hepatitis inducida autoinmune); fibrosis pulmonar (que incluye, pero no se limita a, escleroderma, fibrosis pulmonar idiopática); fibrosis del riñón (que incluye, pero no se
- 10 limita a, escleroderma, nefritis diabética, nefritis glomerular, nefritis por lupus); fibrosis dérmica (que incluye, pero no se limita a, escleroderma, cicatrices queloides e hipertróficas, quemaduras); mielofibrosis; neurofibromatosis; fibroma; fibrosis intestinal; y adhesiones fibróticas resultantes de los procedimientos quirúrgicos que incluyen órgano o trasplante.
- 15 La presente invención proporciona, además, un método para modular o tratar una enfermedad infecciosa en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, que incluye, pero no se limita a: infección bacteriana aguda o crónica, procesos parasíticos o infecciosos agudos y crónicos, que incluyen infecciones bacterianas, virales y fúngicas, infección por HIV/neuropatía por HIV, meningitis,
- 20 hepatitis (A, B o C, o similares), artritis séptica, peritonitis, neumonía, epiglotitis, E. coli, síndrome urémico hemolítico, malaria, fiebre por dengue hemorrágico, leishmaniasis, lepra, síndrome de ataques tóxicos, miositis estreptocócica, gangrena gaseosa, tuberculosis por mycobacterium, mycobacterium avium intracelular, neumonía por pneumocystis carinii, enfermedad inflamatoria pélvica,
- 25 orquitis/epididimitis, legionela, enfermedad de Lyme, influenza a, virus Epstein-Barr, síndrome hemafagocítico asociado vital, encefalitis vital/meningitis aséptica, y similares.

La presente invención proporciona, además, un método para modular o tratar enfermedades de los ojos debidas a inflamación, infección, o condiciones fibróticas o estenóticas tales como, pero sin limitarse a: conjuntivitis, úlcera de la córnea, queratocono, queratitis intersticial, queratitis ulcerativa periférica, conjuntivitis flictenular, queratitis punteada superficial, blefaritis, uveitis, y degeneración macular relacionada con la edad.

Administración, composiciones y kits que comprenden los anticuerpos anti-IL-13

Mientras que un anticuerpo monoclonal aislado de la presente invención se une a un epítipo en la IL-13 y muestra actividades de inhibición de la IL-13 *in vitro* y/o *in vivo*, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos, capaces de inhibir la unión de la IL-13 a los receptores IL-13R1alfa e IL-13R2alfa, son adecuados como agentes terapéuticos y profilácticos adecuados para tratar o prevenir las afecciones asociadas a la IL-13 en humanos y animales.

Generalmente, el uso comprenderá administrar una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de uno o más anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión al antígeno de la presente invención a un sujeto susceptible o a uno que exhibe una afección en la cual se conoce que la actividad de la IL-13 tiene secuelas patológicas tales como crecimiento de tumores y metastasis o síntomas asmáticos tales como la reducción en el volumen espiratorio forzado (FEV). Cualquier forma activa del anticuerpo se puede administrar, incluso los fragmentos Fab y F(ab')₂.

Preferentemente, los anticuerpos que se usan son compatibles con las especies receptoras de manera que la respuesta inmune a los MAb no resulte en una vida media circulante inaceptablemente corta o induzca una respuesta inmune a los MAb en el sujeto. Preferentemente, los MAb que se

52

administran exhiben algunas funciones secundarias tales como la unión a receptores Fc del sujeto y la activación de los mecanismos de citotoxicidad mediados por la célula dependiente del anticuerpo (ADCC).

El tratamiento de los individuos puede comprender la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de los anticuerpos de la presente invención. Los anticuerpos se pueden proporcionar en un kit como se describe a continuación. Los anticuerpos se pueden usar o administrar solos o en mezcla con otro agente terapéutico, analgésico o de diagnóstico. Al proporcionar a un paciente un anticuerpo, o fragmento de éste, capaz de unirse a la IL-13, o un anticuerpo capaz de proteger contra la IL-13 en un paciente receptor, la dosis del agente administrado variará en dependencia de factores tales como la edad, peso, tamaño, sexo, condición médica general, historia médica anterior, etc. del paciente.

Los vehículos adecuados y su formulación y envasado se describen, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (21.º ed., Troy, D. ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD (2005) Capítulos 40 y 41). Métodos farmacéuticos adicionales se pueden emplear para controlar la duración de la acción. Las preparaciones de liberación controlada se pueden lograr a través del uso de polímeros para acomplejar o absorber los compuestos. Otro método posible para controlar la duración de la acción mediante preparaciones de liberación controlada es incorporar los compuestos de la presente invención en partículas de un material polimérico tales como poliésteres, poliaminoácidos, hidrogeles, ácido (poli) láctico o copolímeros de etileno vinilacetato. Alternativamente, en lugar de incorporar estos agentes en las partículas poliméricas, es posible atrapar estos materiales en microcápsulas preparadas, por ejemplo, polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de gelatina o hidroximetilcelulosa y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, o en sistemas coloidales de suministro de

53

fármacos, por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas, y nanocápsulas o en macroemulsiones.

En general, si se administra una dosis sistémica del anticuerpo, es deseable proporcionar al receptor una dosis del anticuerpo que se encuentre en el intervalo de desde aproximadamente 1 ng/kg-100 ng/kg, 100 ng/kg-500 ng/kg, 500 ng/kg-1 ug/kg, 1 ug/kg-100 ug/kg, 100 ug/kg-500 ug/kg, 500 ug/kg-1 mg/kg, 1 mg/kg-50 mg/kg, 50 mg/kg-100 mg/kg, 100 mg/kg-500 mg/kg (peso corporal del receptor), aunque se puede administrar una dosis menor o mayor. Se puede esperar que dosis tan bajas como aproximadamente 1,0 mg/kg muestren alguna eficacia. Preferentemente, aproximadamente 5 mg/kg es una dosis aceptable, aunque niveles de dosificación de hasta aproximadamente 50 mg/kg se prefieren especialmente para uso terapéutico. Alternativamente, se puede administrar una cantidad específica del anticuerpo la cual no se basa en el peso del paciente tal como una cantidad en el intervalo de 1 ug – 100 ug, 1 mg – 100 mg, o 1 gm – 100 gm. Por ejemplo, la administración a un sitio específico puede ser a una cavida o compartimiento del cuerpo tal como mediante un medio intrarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavidad, intraceliaco, intracelebelar, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocardiaco, intraosteal, intrapélvico, intrapericardiaco, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácico, intrauterino, intravesical, intralesional, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal o transdérmico.

Se puede preparar una composición de anticuerpo anti-IL-13 para su uso para administración parenteral (subcutánea, intramuscular o intravenosa) o cualquier otra administración, particularmente en forma de soluciones o suspensiones líquidas; para su uso en administración vaginal o rectal

54

particularmente en formas semisólidas tal como, pero sin limitarse a, cremas y supositorios; para administración oral o sublingual tal como, pero sin limitarse a, en forma de tabletas o cápsulas; o por vía intranasal tal como, pero sin limitarse a, la forma de polvo, gotas nasales o aerosoles o ciertos agentes; o por vía transdérmica tal como pero no se limita a un gel, pomada, loción, suspensión o sistema de distribución de parche con potenciadores químicos para modificar la estructura de la piel o para aumentar la concentración del fármaco en el parche transdérmico, o con agentes que permiten la aplicación de formulaciones que contienen proteínas y péptidos sobre la piel (patente núm. WO 98/53847), o aplicaciones de campos eléctricos para crear vías transitorias de transporte tal como electroporación, o para aumentar la motilidad de los fármacos cargados a través de la piel tal como iontoforesis, o la aplicación de ultrasonido tal como sonoforesis (patente de los Estados Unidos núms. 4.309.989 y 4.767.402) (las patentes y publicaciones anteriores se incorporan totalmente en la presente descripción como referencia).

En una aproximación similar, otro uso terapéutico del anticuerpo monoclonal de la presente invención es la inmunización activa de un paciente por medio del uso de un anticuerpo anti-idiotípico que se potencia contra uno de los presentes anticuerpos monoclonales. La inmunización con un anti-idiotipo que simula la estructura del epítipo pudiera provocar una respuesta anti-IL-13 activa.

De igual manera, la inmunización activa se puede inducir al administrar uno o más epítopos inmunogénicos y/o antigénicos como un componente de una vacuna. La vacunación se puede realizar por vía oral o parenteral en cantidades suficientes para permitir que el receptor genere anticuerpos protectores contra la región biológicamente funcional profilácticamente o terapéuticamente. El huésped se puede inmunizar activamente con el péptido antigénico/inmunogénico en forma pura, un fragmento del péptido, o una forma modificada del péptido. Uno o más aminoácidos, que no corresponden con la

SS

secuencia de la proteína original, se pueden añadir a los terminales amino o carboxilo del péptido original, o la forma truncada del péptido. Tales aminoácidos extras son útiles para acoplar el péptido a otro péptido, a una proteína portadora grande, o a otro soporte. Los aminoácidos que son útiles para estos propósitos
5 incluyen: tirosina, lisina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína y derivados de estos. Se pueden usar técnicas de modificación de proteínas alternativas *por ejemplo*, acetilación NH₂ o amidación COOH-terminal, para proporcionar medios adicionales para acoplar o fusionar el péptido a otra proteína o molécula péptido o a un soporte. Una modalidad de un epítipo inmunogénico es una que abarca los
10 residuos de la IL-13 de hélice A (Arg10, Ile13, Glu14) y los residuos de hélice D (Leu100, Lys103, Phe106, Arg107, Glu108). En una modalidad particular de un péptido o proteína que comprende antígeno epítipo, el péptido exhibe un mimitopo que simula la asociación espacial de Arg10 y Arg107 de la IL-13 o variantes como las mostradas por cristalografía de rayos X.

15 Un anticuerpo de la invención, capaz de proteger contra la bioactividad de la IL-13, se proporciona a los sujetos en una cantidad suficiente para afectar una reducción, resolución, o alivio del síntoma o patología relacionada con la IL-13. Se dice que una cantidad es suficiente o una "cantidad terapéuticamente efectiva" para "afectar" la reducción de los síntomas si la dosis, la ruta de administración, y el
20 programa de dosificación del agente son suficientes para influenciar tal respuesta. Las respuestas a la administración del anticuerpo se pueden medir por análisis de los tejidos, órganos, o células afectados del sujeto, como por técnicas de imágenes o por análisis de muestras de tejidos *ex vivo*. Un agente es fisiológicamente importante si su presencia resulta en un cambio detectable en la fisiología de un paciente receptor.

25 Los anticuerpos de la presente invención se pueden formular de acuerdo con los métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, donde estos materiales o sus derivados funcionales se

56

- combinan en mezcla con un vehículo portador farmacéuticamente aceptable. El tratamiento se puede realizar en un programa de una sola dosis o, preferentemente, un programa de dosis múltiples en el que un curso primario de tratamiento puede ser con 1-10 dosis separadas, seguido por otras dosis dadas a intervalos de tiempo
- 5 posteriores requeridos para mantener y o reforzar la respuesta, por ejemplo, en 1-4 meses para una segunda dosis y, si es necesario, una(s) dosis(es) posterior(es) después de varios meses. Los ejemplos de programas de tratamiento adecuados incluyen: (i) 0, 1 mes y 6 meses, (ii) 0, 7 días y 1 mes, (iii) 0 y 1 mes, (iv) 0 y 6 meses, u otros programas suficientes para obtener las respuestas deseadas.
- 10 esperadas para reducir los síntomas de la enfermedad, o reducir la gravedad de la enfermedad.

La presente invención proporciona, además, kits que son útiles para llevar a acabo la presente invención. Los presentes kits comprenden un primer contenedor que contiene o se empaca en asociación con los anticuerpos

15 descritos anteriormente. El kit puede comprender, además, otro contenedor que contiene se empaca en asociación con soluciones necesarias para llevar a cabo la invención. Los contenedores se pueden hacer de vidrio, plástico o lámina de metal y pueden ser un frasco, botella, estuche, tubo, bolsa, etc. El kit puede contener también información escrita, tal como los procedimientos para llevar a

20 cabo la presente invención o información analítica, tal como la cantidad de reactivo contenido en el primer medio contenedor. El contenedor puede estar en otro aparato contenedor, *por ejemplo*, una caja o una bolsa, junto con la información escrita.

Aun otro aspecto de la presente invención es un kit para detectarla

25 IL-13 en una muestra biológica. El kit incluye un contenedor que contiene uno o más anticuerpos que se unen a un epítopo de IL-13 e instrucciones para usar el anticuerpo para los propósitos de unirse a la IL-13 para formar un complejo

57

inmunológico y detectar la formación del complejo inmunológico de tal manera que la presencia o ausencia del complejo inmunológico correlaciona con la presencia o ausencia de la IL-13 en la muestra. Los ejemplos de contenedores incluyen placas multipocillos que permiten la detección simultánea de la IL-13 en 5 muestras múltiples.

El contenido de todas las bibliografías citadas (que incluyen referencias de la literatura, patentes concedidas, solicitudes de patente publicadas, y solicitudes de patente copendientes) citadas en toda esta solicitud se incorporan expresamente en la presente como referencia.

10 Otras características de la invención resultarán aparentes en el curso de las siguientes descripciones de las modalidades ilustrativas que se dan para ilustrar la invención y no pretenden limitar la misma.

EJEMPLO 1. PRODUCCIÓN DEL ANTICUERPO ANTI-IL-13

El hibridoma murino, C836, se hizo contra una variante natural de IL-13, R130Q humana, que es la variante R110Q de sec. con núm. de ident.: 1. Dos ratones Balb/c de 12-14 semanas de edad (Charles River Laboratories) se usaron con los números 72 y 75 designados. El ratón núm. 72 recibió un total de tres inyecciones de 50 mg cada dos semanas de IL-13 R130Q humano administrado con adyuvante Gerbu (Accurate) por la vía intraperitoneal (IP) e intradérmica (ID). El 20 ratón núm. 75 se inmunizó por vía subcutánea (SQ) en la base de la cola (BOT) con 50 mg de R130Q combinado con $0,33 \times 10^5$ unidades de cada interferón murino a y b (Biosource). En los días 2 y 3, los ratones se inyectaron por la vía SQ BOT con el interferón a y b (dosis similares al día 1). Dos inyecciones de refuerzo de 50 mg R130Q combinado con 100 mg de Mab anti-agonista CD40 murino (R&D) 25 administrado SQ BOT se realizaron en los días 58 y 85. Los títulos de anticuerpos se detectaron de la sangre colectada por la punción retroorbital. Se realizó un

ensayo EIA de fase sólida A R130Q para evaluar los títulos de los sueros para IgG anti-R130Q.

Para la fusión MattA designada, el ratón núm. 72 se reforzó por la vía IV con 50 mg de R130Q diluido con 100 ml en amortiguador fosfato salino (PBS). Para la fusión denominada MattB, el ratón núm. 75 recibió un refuerzo final de 15 mg de R130Q combinado con 50 mg del agonista de CD40 anti-murino por la vía SQ BOT. Tres días después de las inyecciones de refuerzo finales, los ratones se sacrificaron, se eliminaron los órganos linfáticos asépticamente, y los linfocitos inmunes se recolectaron por la trituración del bazo y/o nódulos linfoides a través de un tamiz de malla fina con una mano de mortero pequeña y se lavaron con DMEM caliente.

Un EIA de fase sólida se usó para detectar el suero murino para anticuerpos específicos de la variante de IL-13 (R130Q) humanos de origen natural usando placas de 96-pocillos (Costar, 9018) recubiertas con la Fc de la IgG de carnero anti-murina. El suero de ratón se diluyó en series dobles con PBS a partir de la dilución 1:50 y se incubó en 50 µl/pocillo durante 1 hora a 37 °C. Las placas se lavaron y se incubaron después con 300 ng/ml, 50 µl/pocillo de R130Q biotinilada durante una hora a 37 °C. Las placas se lavaron, sondearon con estreptavidina conjugada con peroxidasa, y desarrollaron con H₂O₂ y OPD. La absorbancia se midió a 490 nm mediante un espectrofotómetro de placa automatizado.

La pareja de fusión para el ratón Balb/c que no secreta mieloma, FO se adquirió de ATCC (CRL- 1646). La fusión MattA se llevó a cabo a una proporción de 1:2 de células de mieloma murino de FO con células viables de bazo. Para la fusión MattB, los linfocitos del bazo y los nódulos linfáticos popliteal/inguinal (LN) se mezclaron para realizar la fusión. La fusión se llevó a cabo a una proporción de 1:1 de células de mieloma murino (FO) con linfocitos

59

viables. Las células fusionadas se resuspendieron en medio HAT (100 μ M hipoxantina, 0,4 μ M aminopterina, y 16 μ M timidina), se plaquearon a 200 ml/pocillo en 25 x 96-placas por pocillo, y se incubaron durante 7-10 días.

- Los hibridomas provenientes de la fusión de los linfocitos murinos con células de mieloma murino se evaluaron mediante EIA por su capacidad para unir R130Q madura (variante de IL-13 R110Q de sec. con núm. de ident.: 1). Las células de los pocillos positivos se transfirieron a placas de 24 pocillos para aumentar los números celulares y se subclonaron después por dilución limitativa para garantizar la homogeneidad de las líneas celulares. El Kit-IsoStrip de Isotipaje por Anticuerpo Monoclonal de ratón, Formato de Varilla/Dipstick (Roche) se usó según las instrucciones del fabricante para determinar el isotipo.

- Doce MAb's RI30Q reactivos se determinaron de la fusión de MattA y tres de la fusión de MattB fusion mediante EIA. Los trece anticuerpos se identificaron como isotipo IgG1 κ murina, una como IgG2a κ , y una como IgG1 λ . Se asignaron a las líneas celulares homogéneas de hibridoma denominaciones de código C y números respectivos de CNTO para los MAb's asignados (Tabla 1).

Tabla 1. MAb's murinos para IL-13 anti-humana (R130Q)

Nombre del hibridoma	Código-célula núm.	CNTO núm.	Isótopo murino
MattA-103.10.1	850	1103	IgG1/ κ
MattA-122.23.3	830	2223	IgG1/ κ
MattA-129.10.2	831	2910	IgG1/ κ
MattA-132.6.2	870	62	IgG2a/ κ
MattA-137.4.2	832	3742	IgG1/ κ
MattA-141.40.3	833	403	IgG1/ κ
MattA-145.1.2	834	1451	IgG1/ κ
MattA-16.1.2	827	1612	IgG1/ κ
MattA-167.6.2	835	1676	IgG1/ κ
MattA-173.3.3	836	1733	IgG1/ κ
MattA-29.12.3	828	2912	IgG1/ κ
MattA-60.42.2	829	6042	IgG1/ λ
MattB-1.2.2	915	2122	IgG1/ κ
MattB-3.4.2	916	2342	IgG1/ κ
MattB-2.2.1	919	2221	IgG1/ κ

60

Las ADNc de cadenas ligeras y pesadas para el hibridoma murino se clonaron mediante PCR a temperatura ambiente y se secuenciaron. Las ADNc se insertaron en vectores de expresión eucariótica Lonza pEE12.4 y pEE6.4 para la cadena ligera y la cadena pesada, respectivamente, bajo el control del promotor CMV y que contiene el marcador génico selectivo GS. Los mAb C836 de las secuencias clonadas se transfectaron transitoriamente en las células HEK293 y se ensayaron contra el anticuerpo secretado a partir del hibridoma. Las CDR de las regiones V se muestran a continuación (Tabla 2) y en el listado de secuencia para las regiones-V de cadena ligera y cadena pesada (sec. con núm. de ident.: 2 y 3, respectivamente).

Tabla 2. CDR de hibridoma de ratón C836 dirigida a la IL-13 humana

CDR	Secuencia de aminoácidos	Residuos y sec. con núm. de ident.: correspondientes
L CDR1	RASKSISKYLA	24-34 de la sec. con núm. de ident.: 2
L CDR2	SGSTLQS	50-56 de la sec. con núm. de ident.: 2
L CDR3	QQHNEYPYT	89-97 de la sec. con núm. de ident.: 2
H CDR1	GFSLSTYGMGVG	26-37 de la sec. con núm. de ident.: 3
H CDR2	HIWWDDVKRYNPALKS	52-67 de la sec. con núm. de ident.: 3
H CDR3	MGSDYDVWFDY	100-110 de la sec. con núm. de ident.: 3

La actividad del mAb purificado que se expresa a partir de las secuencias clonadas se verificó sea la misma actividad que se observa en los medios que se adaptan del hibridoma C836. La actividad se midió mediante un ensayo para evaluar la inhibición de la unión de 150 ng/ml de IL-13 biotinilado a IL-13R-alfa2.

EJEMPLO 2: CREACIÓN DE LA GENOTECA HUMANA DE MARCO

ADAPTADO (HFA)

El proceso de humanización del mAb C836 involucró dos procesos en general: 1) la adaptación del marco; y 2) la madurez de afinidad mayoritariamente desde el interior de los marcos seleccionados. Además, ciertos residuos se modificaron para promover la estabilidad de la proteína.

61

El proceso de adaptación del marco se basó en la similitud de las regiones de marco entre el mAb C836 de ratón y las secuencias en las bases de datos de la línea germinal humana como se describe esencialmente en la patente núm. WO/08052108A2 "Methods For Use In Human-Adapting Monoclonal

5 Antibodies", en donde la longitud del marco se iguala residuo por residuo a la de la variable parental o la de las regiones V. En total, dieciséis marcos de cadena ligera (LC) y seis de cadena pesada (HC) se adaptaron al marco humano mediante la combinación de los CDR C836 con los marcos humanos seleccionados que se muestran en la Tabla 3 (LC) y en la Tabla 4 (HC). Las CDR se resaltaron por
10 subrayado en ambas tablas.

Los marcos de cadena ligera(sec. con núm. de ident.: 5), L6 (sec. con núm. de ident.: 9), L12 (sec. con núm. de ident.: 11), y L18 (sec. con núm. de ident.: 6), tienen la mayor similitud con la región V murina (sec. con núm. de ident.: 2) (Fig. 1 alineación superior). Para las cadenas pesadas de las CDR, los
15 marcos humanos 2-26 (sec. con núm. de ident.: 20), y 2-05 (sec. con núm. de ident.: 21), tienen la mayor similitud con la región V murina (sec. con núm. de ident.: 3) (Fig. 1 alineación superior).

Tabla 3. Secuencias CDR de marco de cadena ligera &

Núm.	Marco	F1 <u>CDR1</u> F2 <u>CDR2</u> F3 <u>CDR3</u> F4	Sec. con núm. de ident.:
L1	VB_A20	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC <u>RASKSISKYLA</u> WYQQKPGKVPKLLIY <u>SGSTLQS</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYC <u>QQHNEYPYT</u> FGGGTKVEIK	4
L2	VB_O12	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC <u>RASKSISKYLA</u> WYQQKPGKAPKLLIY <u>SGSTLQS</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC <u>QQHNEYPYT</u> FGQGTKLEIK	5

62

Núm.	Marco	F1 <u>CDR1</u> F2 <u>CDR2</u> F3 <u>CDR3</u> F4	Sec. con núm. de ident.:
L3	VB_L18	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITC <u>RASKSISKYLA</u> WYQQKPGKAPKLLIY <u>SGSTLQS</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC <u>QQHNEYPYT</u> FGGGTKVEIK	6
L4	VB_A30	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC <u>RASKSISKYLA</u> WYQQKPGKAPKRLIY <u>SGSTLQS</u> GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC <u>QQHNEYPYT</u> FGGGTKVEIK	7
L5	VB_L8	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITC <u>RASKSISKYLA</u> WYQQKPGKAPKLLIY <u>SGSTLQS</u> GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC <u>QQHNEYPYT</u> FGQGTKVEIK	8
L6	VB_L6	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RASKSISKYLA</u> WYQQKPGQAPRLIY <u>SGSTLQS</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYC <u>QQHNEYPYT</u> FGQGTKLEIK	9
L7	VB_O14	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITC <u>RASKSISKYLA</u> WYRQKPGKVPKLLIY <u>SGSTLQS</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYG <u>QQHNEYPYT</u> FGQGTKLEIK	10
L8	VB_L12	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITC <u>RASKSISKYLA</u> WYQQKPGKAPKLLIY <u>SGSTLQS</u> GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYC <u>QQHNEYPYT</u> FGQGTRLEIK	11
L9	VB_L1-JK4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC <u>RASKSISKYLA</u> WFQQKPGKAPKSLIY <u>SGSTLQS</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC <u>QQHNEYPYT</u> FGGGTKVEIK	12
L10	VB_L8-JK4	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITC <u>RASKSISKYLA</u> WYQQKPGKAPKLLIY <u>SGSTLQS</u> GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC <u>QQHNEYPYT</u> FGGGTKVEIK	13

63

Núm.	Marco	F1 <u>CDR1</u> F2 <u>CDR2</u> F3 <u>CDR3</u> F4	Sec. con núm. de ident.:
L11	VB_L9-JK4	AIRMTQSPSSFSASTGDRVITC <u>RASKISKYLA</u> WYQQKPGKAPKLLIY <u>SGSTLQS</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISCLQSEDFATYYC <u>QQHNEYPYT</u> FGGGTKVEIK	14
L12	VB_L15-JK4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC <u>RASKISKYLA</u> WYQQKPEKAPKSLIY <u>SGSTLQS</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC <u>QQHNEYPYT</u> FGGGTKVEIK	15
L13	VB_L14-JK4	NIQMTQSPSAMSASVGDRVITC <u>RASKISKYLA</u> WFQQKPGKVPKHLIY <u>SGSTLQS</u> GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC <u>QQHNEYPYT</u> FGGGTKVEIK	16
L14	VB_L12-JK4	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITC <u>RASKISKYLA</u> WYQQKPGKAPKLLIY <u>SGSTLQS</u> GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYC <u>QQHNEYPYT</u> FGGGTKVEIK	17
L15	VB_L24-JK4	VIWMTQSPSLLSASTGDRVITC <u>RASKISKYLA</u> WYQQKPGKAPELLIY <u>SGSTLQS</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISCLQSEDFATYYC <u>QQHNEYPYT</u> FGGGTKVEIK	18
L16	Región-LCV C386, progenitor murino	DVQITQSPSYLAASPGETITLNC <u>RASKISKYLA</u> WYQEKPGKTNKLLIY <u>SGSTLQS</u> GIPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAMYFC <u>QQHNEYPYT</u> FGGGTKLEIK	2

64

Cuadro 4. Secuencias CDR de marco de cadena pesada &

Núm.	Marco	F1 CDR1 F2 CDR2 F3 CDR3 F4	Sec. con núm. de ident.:
H1	VB_2-70	QVTLKESGPALVKPTQTLTLCTFS GFSLSTYGMGVG WIRQPPGKALEWLA HIWWDDVKRYNPALKS RLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYYCAR MGSDYDVWFDY WGQGLVTVSS	19
H2	VB_2-26	QVTLKESGPVLVKPTETLTLCTVS GFSLSTYGMGVG WIRQPPGKALEWLA HIWWDDVKRYNPALKS RLTISKDTSKSQVLTMTNMDPVDATYYCAR MGSDYDVWFDY WGQGLVTVSS	20
H3	VB_2-05	QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFS GFSLSTYGMGVG WIRQPPGKALEWLA HIWWDDVKRYNPALKS RLTITKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYYCA MGSDYDVWFDY WGQGLVTVSS	21
H4	VB_4-30.	QVQLQESGPGLVKPSQTLTLCTVS GFSLSTYGMGVG WIRQPPGKGLEWIG HIWWDDVKRYNPALKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR MGSDYDVWFDY WGQGLVTVSS	22
H5	VB_4-28	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVS GFSLSTYGMGVG WIRQPPGKGLEWIG HIWWDDVKRYNPALKS RVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCAR MGSDYDVWFDY WGQGLVTVSS	23
H6	VB_3-33	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFSLSTYGMGVG WVRQAPGKGLEWVA HIWWDDVKRYNPALKS RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR MGSDYDVWFDY WGQGLVTVSS	24
H7	Región-HCV C386, progenitor murino	QVTLKESGPGILQPSQTLTLCTCSFS GFSLSTYGMGVG WIRQPSGKGLEWLA HIWWDDVKRYNPALKS RLTISKDTSGSQVFLKIASVDTSDTATYYCAR MGSDYDVWFDY GQGLVTVSA	3

65

Las regiones V del marco adaptado de la cadena pesada se fusionaron a la kappa-C (cadena ligera) y CH1-CH3 (cadena pesada) de la IgG1 humana mediante el uso de los métodos conocidos por aquellos con experiencia en la materia. Un constructo quimera de IgG1 ratón-humano se hizo también (Mab 5 167), en donde la región murina se fusionó a una de IgG1 humana en el dominio CH1 y la VL murina a un dominio kappa-C humano, que portan el total de 16 cadenas ligeras y 7 cadenas pesadas, respectivamente.

La síntesis de las cadenas ligeras adaptadas al marco humano se realizó por síntesis química total de fragmentos de polinucleótidos que se 10 ensamblaron dentro de las secuencia codificantes de longitud completa de acuerdo a los métodos enseñados por Evans, y otros, ver, *por ejemplo*, las patentes de los Estados Unidos núm. 6.521.427 y 6.670.127. Los genes sintetizados se insertaron dentro del vector promotor de CMV, pUNDER, y se confirmó la secuencia. Estos vectores se usaron después en el lote de transfecciones transitorias o de escala 15 variable como se describe a continuación.

Transfección y expresión a pequeña escala. La expresión de las variantes de HFA se realizó en un formato de matriz de apareamiento de cada cadena pesada de HFA (Hc) con cada cadena ligera de HFA (Lc) en una escala pequeña con el uso de las células HEK293, lo que resulta en 90 mAb HFA (15 Lc X 20 6 Hc) disponibles para ensayo. Las quimeras parentales de humano-ratón de Lc y Hc se aparearon y se expresaron en la misma forma que los controles. En pocas palabras, las células HEK293-E (Invitrogen, Carlsbad, CA) se sembraron en una placa de 48 pocillos con 0,5 ml de medio de cultivo a $1,5 \times 10^6$ células viables por pocillo, cada par de ADN (Lc + Hc) se acompañó con Lipofectamina 2000 25 (Invitrogen), y el complejo ADN-Lípido se adicionó a los pocillos por duplicado para transfectar las células. El medio, 293 SFM II (Invitrogen) con 4 mM de L-glutamina (Invitrogen), se reemplazó después de 24 horas. Los sobrenadantes que contienen

66

el anticuerpo secretado se cosecharon después de las 96 horas y se filtraron para el ensayo.

Transfección de las células HEK293-E o CHO-S a Escala Piloto.

Las células HEK293-E se sembraron en un recipiente de dos capas Cellstack
5 (Corning) con 200 ml de medio de crecimiento a $8,0 \times 10^4$ células por recipiente. El complejo ADN-Lipofectamina se hizo como se describe en el método de transfección a pequeña escala.

Para los cultivos de CHO-S, en el día de la transfección las células, se
diluyeron a $7,5 \times 10^5$ células por ml en 500 ml de medio por frasco de agitación de 2 l.
10 El ADN se diluye en medio Opti-Pro (Invitrogen, catalogo núm. 12309) y se mezcla con el reactivo de transfección FreeStyle Max (Invitrogen, catálogo núm. 16447). El complejo ADN Max (10 ml) se adicionó al frasco de células, se incubó a 37 °C, y sobrenadantes se cosecharon después de 4 días.

Producción de biorreactor a gran escala (4-5 l). El día anterior a la
15 transfección, las células se sembraron a $2,0 \times 10^5$ células por ml en un biorreactor de Cultivo Celular BioBundle (Applikon, Foster City, CA) mantenidas a 37 °C con el oxígeno del espacio vacío (O_2) supervisadas y controladas al 50 % y se controló el pH con bicarbonato de sodio a pH 7,2. En el momento de la transfección el pH se disminuyó a 6,8. Para el complejo ADN-lípido, 1,25 mg del ADN total por litro de
20 transfección se diluyó en 50 ml de Opti-Pro. Del mismo modo, 1,25 ml del reactivo de transfección FreeStyle Max se diluyó por litro de transfección en 50 ml de Opti-Pro. El ADN diluido se mezcló con el reactivo diluido FreeStyle Max y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. El complejo ADN total-FreeStyle Max (a 100 ml de volumen total) se adicionó al biorreactor. En el momento de la
25 transfección, las células estaban normalmente a $7,0 \times 10^5$ células por ml. El sobrenadante se cosechó después de 4 días.

67

Las purificaciones a escala piloto (0,3-3,0 mg) se realizaron en el sistema de cromatografía de AKTA Xpress y las purificaciones a gran escala (3 mg o más) se realizaron mediante los sistemas de cromatografía de AKTA FPLC. Los procedimientos de purificación para las preparaciones piloto y a gran escala fueron idénticos. Los sobrenadantes celulares de HEK293-E o CHO-S transfectadas transitoriamente se clarificaron por centrifugación (30 min, 6000 rpm) y se filtraron (0,2 µm membrana PES, Corning). La cantidad relativa de IgG se determinó con el instrumento Octet (ForteBio). Las muestras transfectadas a gran escala (de 5 a 20 litros) se concentraron 5 veces con un concentrador Centramate LV (Pall). Las muestras concentradas se lavaron con PBS, y se filtraron de nuevo por 0,2 µm. Los sobrenadantes diluidos se cargaron en una columna de proteína A HiTrap MabSelect Sure (GE Healthcare) equilibrada (PBS, pH 7) a una concentración relativa de aproximadamente 10 mg de proteína por ml de resina. Después de cargar, se lavó la columna y la proteína se eluyó con 10 volúmenes de columna de 0,1 M de acetato de Na, pH 3. Las fracciones de proteínas eluidas se neutralizaron por elución en amortiguador Tris. Las fracciones pico se agruparon, se filtraron (0,2 µm) y se dializaron contra PBS, pH 7 durante la noche a 4 °C. Las proteínas dializadas se filtraron (0,2 µm) y la concentración de proteína se determinó por absorbancia a 280 nm y 310 nm en un espectrofotómetro BioTek SynergyHT™. En caso necesario, las proteínas purificadas se concentraron con un concentrador de centrifuga 10 K MWCO centrifuga (Millipore). La calidad de las proteínas purificadas se evaluó por SDS-PAGE y HPLC de exclusión por tamaño (HPLC Dionex System). Los niveles de endotoxina se midieron por el ensayo LAL (Cabo Cod Asociados, Cape Cod, Massachusetts) cuando se requirió. Las proteínas purificadas se almacenaron a 4 °C antes de ser sometidas a pruebas de especificidad y de la actividad.

EJEMPLO 3: ENSAYOS PARA LA EVALUACIÓN DE LOS ANTICUERPOS

ANTI-IL-13

68

La variante de IL-13 de origen natural con una mutación de aminoácido denominada IL-13 R110Q o IL-13 R130Q (sec. con núm. de ident.: 1) se usó para detectar el candidato. Las proteínas de la variante de IL-13 y la silvestre se adquirieron de Peprotech, Rocky Hill, Nueva Jersey.

5 Biotinilación del antígeno. La proteína IL-13 se biotinilizó en una proporción molar de 4:1 por medio del uso de Biotina-LC-NHS unida a EZ, Pierce (núm. 21336). Para llevar a cabo esto, el reactivo de biotina se disolvió en un volumen adecuado de agua Millipore para alcanzar una solución madre de 10 mM. Un volumen adecuado de la solución madre de biotina, se adiciona a la variante

10 de IL-13 R130Q, Peprotech, Rocky Hill, NJ)200-13A) en PBS (0,1 M de NaHCO₃, pH 8,5) durante 2 horas a temperatura ambiente para alcanzar una proporción molar de 4:1. La reacción de biotinilación se detuvo con 1 ml de etanolamina 1 M durante 2 horas a temperatura ambiente, y el exceso de biotina sin reaccionar se eliminó por diálisis con PBS durante la noche a 4 °C. Las alícuotas se congelan en

15 seco y se almacenan a -80 °C. Las IL-13 biotiniladas silvestre y las variante se re-cuantificaron por OD₂₆₀. Las formas de IL-13 biotiniladas (designadas con "b-") se ensayaron por (a) la activación de STAT6 en las células THP-1 para la unión de IL-13 α 1, y (b) la unión de IL-13 R α 2 en el R α 2 (R&D Systems, Minneapolis, MN) por ELISA como se describe a continuación.

20 Referencia de los anticuerpos

Varios anticuerpos se usaron como anticuerpos de referencia y se incluyen: 1) mAb 167, quimera murino/humana C836, que comprende las regiones-V de sec. con núm. de ident.: 2 y 3 V-regiones; 2) mAb 62 o Fab 62 (HFA62 o HFAL62); 3) LC6HC2 de C836 marco humano, que comprende las

25 regiones V de sec. con núm. de ident.: 9 y 20; y 4) mAb 442, control humano isotipo. Múltiples ensayos de actividad biológica se usaron para detectar y definir las características de los mAb anti-IL-13 y se describen a continuación.

69

ELISA de unión directa a la IL-13

Las placas negras de 96 pocillos Maxisorp se incubaron durante la noche a 4 °C con 100 µl del anticuerpo de captura a Fc anti-humano en carnero a 8 µg/ml en amortiguador de recubrimiento de carbonato-bicarbonato, se lavaron con Tween-20 al 0,05 % en PBS, y se bloquearon con BSA al 1 % en PBS. Las muestras de prueba del anticuerpo (100 µl) se diluyeron a 7 ng/ml en amortiguador de ensayo (PBS con BSA al 1 % y Tween-20 al 0,05 %) por pocillo y se incubaron a temperatura ambiente con agitación durante 2 horas. Después de lavar (5 veces), 100 µl de antígeno IL-13 RI30Q biotinilado diluido a 9 ng/ml en amortiguador de ensayo se adicionaron a temperatura ambiente con agitación durante 1 hora y se repite el lavado. El segundo anticuerpo que se adicionó (100 µl) se conjugó con fosfatasa alcalina- estreptavidina se diluyó a 1 µg/ml en amortiguador TBS-T incubado a temperatura ambiente con agitación durante 30 minutos. Después de lavar (5 veces), 100 µl de sustrato quimioluminiscente BM, equilibrado a temperatura ambiente, y diluido en una relación de 10 µl sustrato AP: 100 µl de potenciador: 890 µl de amortiguador de ensayo, se adicionó y se incubó con agitación durante 10 minutos. La fluorescencia se leyó con un Lector de Envision con el programa personalizado "BM Chemiluminescen". El dato se normalizó para el límite de detección y el mAb control positivo, para obtener el porcentaje de unión al antígeno.

Ensayo de inhibición de la unión a Ralfa2

El ensayo de inhibición de la unión a Ralfa2 involucra absorber el IL-13R-alfa 2 soluble adquirido a una placa, y medir la capacidad de un anticuerpo de prueba para evitar la unión de la IL-13-R130Q biotinilada. Para el ensayo, la IL-13Rα2 (R&D Systems) se absorbió a las placas Nunc Maxisorb con 100 µl X 300 ng/ml diluido en DPBS (30 ng) y se incubó durante la noche a 4 °C. Después de lavar (5 veces, TBST + Tween-20 al 0,05 %), 100 µl de volumen total de muestra o estándar

70

se adicionó a cada pocillo como sigue: 50 µl de anticuerpos a 200 ng/ml seguido de 50 µl de b- R130Q a 8 ng/ml en amortiguador de ensayo (PBS + BSA al 0,5 %) durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Después de lavar se adicionaron 100 µl de fosfatasa alcalina-estreptavidina conjugada con el anticuerpo

5 secundario a 1 µg/ml en TBST y se incubó 0,5 horas con agitación. Después de lavar, 100 µl del sustrato AttoPhos BM, se equilibraron a temperatura ambiente y se diluyeron en una relación de una parte del sustrato A, a cuatro partes del sustrato B y se incubaron a temperatura ambiente con agitación durante 30 minutos. Se dejó desarrollar el color durante unos 45 minutos adicionales y la fluorescencia se midió

10 con un Lector Envision. El dato bruto se analizó por sustracción de los valores buenos de fondo y se calculó el porcentaje de inhibición mediante el ajuste de la IL-13-R130Q-biotinilada (pocillos marcados con bR130Q) sin anticuerpos para 0 % de inhibición. El porcentaje de inhibición se calcula como: $(1 - ((\text{Valor con la muestra de anticuerpo}) / (\text{IL-13-R130Q-biotinilada sola}))) \times 100 \%$.

15 Cuantificación de IgG mediante AlfaScreen de Perkin Elmer®

El AlfaScreen de Perkin Elmer (3-AS-0004 v1) es un ensayo de 384 pocillos que se basa en perlas homogéneas que se usan en la cuantificación de mAbs y Fab modificados. Una muestra de proteína se adicionó a una proteína A que se recubre con la perla aceptora, un anticuerpo anti- cadena ligera Kappa, y

20 estreptavidina que se recubre con perlas donantes. Cuando los cuatro componentes forman un complejo, la perla aceptora y la perla donante están próximas lo suficiente para que la perla donante transfiera un ion de oxígeno simple a la perla aceptora, lo que produce una señal en la perla aceptora. La señal se mide en un lector de placas Envision de Perkin-Elmer. La muestra se

25 cuantificó usando una curva estándar de un anticuerpo conocido de la placa. Los materiales que se usaron: OptiPlaca de 384 pozos, blanco opaco, (Perkin Elmer), Proteína A recubierta con perla aceptora (Perkin Elmer), estreptavidina

71

recubierta con perla donante (Perkin Elmer), biotina de cadena ligera Kappa de carnero anti-humano (Pierce), y amortiguador Tris Salino con Tween-20 (Teknova) o albúmina de suero bovino, Probumin de Grado Diagnóstico K (Millipore). El valor de fondo se sustrajo y la concentración se determinó por el

5 ajuste de todas las diluciones a la curva estándar de cada placa.

Señalización de IL-13R1alfa mediante un ensayo de fosfo-STAT6

La medición por citometría de flujo de la IL-13 inducida por la fosforilación de STAT 6 en las células THP-1 es un ensayo sensible para evaluar la actividad de neutralización de la IL-13 por un anticuerpo que se basa en la

10 detección de IL- 13 inducida por la fosforilación de STAT 6 (P-Stat 6) mediante citometría de flujo (FC). Este ensayo permite la medición rápida y cuantitativa de la respuesta de las células THP-1 para rhIL-13 con una sensibilidad (EC50, 332 pg/ml), la cual es superior a la de una célula B humana primaria basado en el ensayo de p-Stat 6 (EC50, 5000 pg/ml).

15 Las células THP-1 se obtuvieron de ATCC (TIB-202™), se pasaron una vez cada 4-6 días, y se mantuvieron en medio RPMI-1640 completo. Otros reactivos incluyen: el mAb anti-P-Stat 6 de ratón-Alexa Fluor 488 (BD Transduction Laboratories™, San Diego, CA), Citofix / Citoperm TM (BD Pharmingen, San Diego, CA), IL-13 humana recombinante (R&D System, Minneapolis, MN). Para el ensayo

20 las células se cosecharon y se resuspendieron de 5×10^5 a 1×10^6 células por ml en medio completo fresco. Los reactivos de prueba se diluyeron serialmente en RPMI-1640 con 10 % FBS: anticuerpos en 8 diluciones dobles o triples comenzando con 2 mg/ml o como se indique y el medio sólo y 25 µl de cada una de las diluciones del anticuerpo se transfirieron a una placa de 96-pocillos y seguido de 25 µl/pocillo por

25 20 ng/ml (0,5 ng) de rIL-13 y se dejaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. La actividad de la IL-13 o las variantes se puede probar, igualmente, con el uso de diluciones seriadas dobles o triples de la IL-13 a partir de 2 ng/ml o como se indique.

72

Para el ensayo típico, las células THP-1 se adicionan a los pocillos que contienen el anticuerpo y/o IL-13 y se incubaron durante 15 min a 37 °C. Después, las células se sedimentan por centrifugación (450 x g) durante 3 minutos y el sobrenadante se descarta. Las células resuspendidas se fijaron por la adición del amortiguador Citofix/Citoperm durante 10 minutos a 37 °C seguido del lavado y la permeabilización con metanol frío al 90 % durante 30 minutos en hielo (o las células se pueden almacenar a -20 °C máximo hasta un mes) y se sedimentaron de nuevo. Las células se tiñeron por resuspensión en el amortiguador de tinción (1x PBS, 1 % FBS, 0,09 % NaN₃) que contiene 20 µl de anti-P-Stat 6-Alexa Furo y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Las células se lavaron después y se resuspendieron en amortiguador de tinción para el análisis por citometría de flujo (FC) por medio del uso de un FACSCalibur o CellQuestPro (BD, San Diego, CA) para la adquisición y análisis de los datos. Las células THP-1 positivas a P-Stat 6 = (el número de células THP-1 positivas a P-Stat 6/el número total de células THP-1) x 100.

Ensayo con Biacore

Las mediciones de afinidad con resonancia de plasmón de superficie (SPR) se realizaron por medio del uso de un biosensor óptico Biacore 3000 (Biacore). Una superficie biosensor se preparó por el acoplamiento de anticuerpos específicos de fragmentos Fc de IgG anti-humana (Jackson) a la superficie de dextrano carboximetilado de un chip CM-5 (Biacore) con el uso de las instrucciones del fabricante para la química de acoplamiento de aminas. Aproximadamente 20.000 RU (unidades de respuesta) de anticuerpos anti-Fc de IgG humana se inmovilizaron en cada una de las cuatro celdas de flujo. Los experimentos cinéticos se realizaron a 25 °C en amortiguador de corrida PBS (que contiene 0,005 % surfactante P20 y EDTA a 3 mM). Este amortiguador se filtró y desgasificó durante al menos 30 minutos antes del uso. Las diluciones

73

seriadas de IL-13 de 33 nM a 0,046 nM se prepararon en amortiguador de corrida. Aproximadamente 250 RU del mAb de prueba se capturó en las celdas de flujo 2, 3 y 4 del chip sensor. La celda de flujo 1 se usó como una superficie de referencia.

- 5 La captura del mAb se siguió por una inyección de tres minutos (fase de asociación) de IL-13 a 50 μ l/min, seguido por 10 minutos de flujo de amortiguador (fase de disociación). La superficie del chip se regeneró por dos pulsos de 12 segundos de inyección de 100 mM de H_3PO_4 (Sigma, catálogo núm. 7961) a 50 μ l/min. Los datos obtenidos se procesaron mediante en el software
- 10 BIAevaluation, versión 3.2 (Biacore). En primer lugar, la sustracción de la doble referencia de los datos se realizó por la sustracción de las curvas que se generan por la inyección del amortiguador de las curvas que se sustraen de la referencia para las inyecciones de analitos. Después, el análisis cinético de los datos se realizó usando 1:1 modelo de unión con un ajuste global. El resultado para cada
- 15 mAb se reportó en el formato de K_a (constante de asociación), K_d (constante de disociación) y K_D (constante de afinidad).

Determinación de la solubilidad del anticuerpo en PBS mediante la ultrafiltración por centrifuga

- Para determinar la solubilidad de los diferentes anticuerpos a
- 20 temperatura ambiente, los experimentos se realizaron por medio de columnas de ultrafiltración por centrifugación. En pocas palabras, las preparaciones de anticuerpos en amortiguador fosfato salino (PBS) se adicionaron a las columnas de ultrafiltración por centrifugación Vivaspin-15 (15 ml) (30000 MWCO, Sartorius, Goettingen, Alemania) a temperatura ambiente. Las columnas se rotaron a 3000 x g
- 25 durante intervalos de 20 minutos en una centrífuga Eppendorf 5804R usando un rotor con recipiente pendular. Una vez que los volúmenes se redujeron a aproximadamente 2 ml, el sobrenadante se transfirió a una columna Vivaspin-4

(4 ml) (30000 MWCO) y se centrifugó a 4000 x g durante intervalos de 20 minutos. Después que el volumen de muestra se redujo a 500 µl, la muestra se transfirió a una columna Vivaspin-500 y se centrifugó a 15.000 x g en una centrífuga Eppendorf 5415R durante 15 minutos. Esto se repitió hasta que se observó la precipitación. En

5 este punto la centrifugación se detuvo y la muestra se mantuvo a temperatura ambiente durante la noche para alcanzar el equilibrio. A la mañana siguiente, la muestra se centrifugó para extraer la precipitación y la concentración de proteínas se determinó a A280 usando un Nanodrop (Thermo Fisher-, Wilmington, DE) con una dilución adecuada. Si la concentración es mayor que 100 mg/ml, el proceso se

10 detiene. Si no ocurrió la precipitación, la concentración de proteínas se midió después de cada centrifugación. Si la concentración de proteína es mayor de 100 mg/ml, la centrifugación se detiene. Además, los anticuerpos descritos en este documento se detectaron después para identificar las características que harían de un anticuerpo particular, un candidato ideal para un desarrollo adicional. Los

15 métodos que se usan para la detección estos anticuerpos se describen en la solicitud de patente de los estados Unidos núm. 61/022.385.

EJEMPLO 4: VARIANTES HFA DEL ANTICUERPO ANTI-IL-13.

Los 90 mAb que se producen a partir de la transfección de la matriz de cada variante de cadena ligera de HFA apareada con cada variante de cadena

20 pesada de HFA (Ejemplo 2, Tablas 3 y 4, respectivamente) se detectaron inicialmente por la medición directa de la unión con IL-13-R130Q-biotinilada en la solución y la capacidad de inhibir a IL-13 R130Q de la unión con la IL-13 Rα2 usando 1,1 nM de Mab y 2 nM de b-IL-13 R130Q.

La actividad de unión o inhibición de las muestras de Mab

25 recombinante se compararon con la de los mAb quiméricos, Lc 16Hc7 (mAb 167) que comprende las sec. con núm. de ident.: 2 y sec. con núm. de ident.: 3. Los datos de estas detecciones por medio del uso de los sobrenadantes de cultivo de

XS

tejido sin purificar de la transfección a pequeña escala, determinaron qué variantes se escalarían para la expresión, purificación y evaluación adicional (Tabla 5). Los mAb de HFA seleccionados se expresaron en células HEK293 a gran escala y se purificaron. Estos se evaluaron por Biacore para determinar su afinidad de unión para la variante R130Q de IL-13.

Tabla 5. Datos de la unión para probar los anticuerpos IL-13

mAbs HFA	Porcentaje de unión IL-13 R130Q (30 ng/ml)	Porcentaje de inhibición IL-13 R130Q (333 ng/ml) a Ra2
Lc15Hc2	94,8	61
Lc11Hc2	92,2	51
Lc14Hc2	91,8	54
Lc6Hc2	86,1	59
Lc5Hc2	85,9	57
Lc3Hc2	85,3	50
Lc4Hc2	84,7	55
Lc2Hc2	84,0	52
Lc8Hc2	81,1	55
Lc10Hc2	78,9	57
Lc15Hc1	76,2	44
Lc12Hc1	36,4	26
Lc3Hc6	26,6	14
Lc7Hc6	-0,3	4
Lc7Hc1	-1,4	6
Lc16Hc7	100	74

Tabla 6. Datos del Biacore en muestra HFA seleccionadas.

mAbs HFA	K _D por Biacore (pM)
Lc14Hc2	256 ± 19
Lc8Hc2	272 ± 22
Lc6Hc2	269 ± 24
Lc3Hc2	246 ± 24
Lc2Hc2	365 ± 15
Lc16Hc7 (quimera ratón-humano)	54 ± 11
mAb de ratón C836(IgG parental)	52 ± 10

En base a estos datos, las variantes de HFA Lc6Hc2 y Lc14Hc2 se eligieron para la maduración por afinidad.

76

EJEMPLO 5: MADURACIÓN POR AFINIDAD Y PRODUCCIÓN DE LAS VARIANTES DE UN ANTICUERPO ANTI-IL-13.

Los estudios de los complejos de anticuerpos-anticuerpos de estructura tridimensional conocidos revelaron los residuos que contactan con el
5 antígeno dentro de las CDR, denominados residuos que determinan la especificidad (SDR) (Padlan, y otros, 1995, FASEB J 9: 133-9; Almagro 2004, J.Mol Recognit. 17: 132-143). Para mejorar la afinidad de la variante de HFA principal, una genoteca aleatoria en cuatro SDR de gran uso para el reconocimiento del antígeno proteico se usó con los residuos H91, N92, E93, y
10 Y94 de L-CDR3.

Dos genotecas de fagos de las variantes de L-CDR3 se hicieron por medio del uso de CDR injertado con LC6-VB_Lc6 como andamiaje para la construcción de la genoteca (sec. con núm. de ident.: 9) denominado fagómido IL-13-62, y un segundo por medio del uso de Lc14 VB_L12 (sec. con núm. de ident.: 17)
15 designado fagómido IL-13-142. Ambas genotecas se combinaron con Hc2 (sec. con núm. de ident.: 20) y se clonaron como fragmentos Fab. Los cuatro residuos (H91, N92, E93, y Y94) de L-CDR3 en la sec. con núm. de ident.: 9 (Lc6) y sec. con núm. de ident.: 17 (Lc14) se aleatorizaron con la introducción de la diversidad completa por medio de los codones "NNK" para proporcionar una diversidad teórica de $1,9 \times 10^5$
20 variantes. Un fagómido con las regiones V del Mab murino parental, C836, se construyó también y designó IL-13-167.

Las genotecas Fab se construyeron en un sistema de exposición en el fago pIX como se describe en la patente de Estados Unidos núm. 6.472.147 (Scripps) y la solicitud co-pendiente de los solicitantes publicada con el núm.
25 WO2009/085462. El fagómido IL-13 -62 se expresó como una unidad dicistrónica que contiene las regiones variables de la IL-13Lc6 y IL-13Hc2. La construcción de la genoteca se hizo por medio del uso de métodos similares a los descritos

27

anteriormente (Almagro y otros, 2006 J Mol. Recognit 19: 413-422). Las genotecas se ensamblaron a partir de tres fragmentos de PCR anidada compuestos por una región N-terminal (fragmento 1) y una región C-terminal (fragmento 3) para capturar a los fragmentos individuales N-terminal y C-terminal de la molécula

5 parental. Una vez generados, los fragmentos externos se mezclaron con el fragmento interno que orienta a las respectivas SDR, (fragmento 2). El fragmento 2 se hizo a partir de oligos degenerados y se usó para cruzar los fragmentos 1 y 3 para generar la secuencia de longitud completa de la genoteca. Las secuencias de longitud completa se clonaron en el vector de fago con la respectiva cadena ligera.

10 Las genotecas se seleccionaron contra la IL-13 R130Q-biotinilada. En pocas palabras, antes de la selección, las perlas paramagnéticas (Invitrogen, Carlsbad, CA) que se recubrieron con estreptavidina se bloquearon en el Chemiblocker (Chemicon, Temecula, CA). Del mismo modo, la genoteca de fago L-CDR3 se bloqueó previamente con el Chemiblocker, diluido 1:1 en 0,05 %

15 amortiguador Tris salino (TBS) con Tween-20 (T) durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de una etapa de adsorción previa, en la que la genoteca de L-CDR3 se incubó con las perlas magnéticas bloqueadas para eliminar las uniones no específicas. La variante de IL-13 Biotinilada R130Q (Peprotech, Rocky Hill, Nueva Jersey), se adicionó ala genoteca de fagos en diferentes concentraciones (entre

20 10 nM y 0,01 nM) para las tres rondas sucesivas de selección. El fago unido al antígeno se capturó usando las perlas magnéticas y se rescató mediante la adición de 1 ml de células TG-1 de *Escherichia coli* en crecimiento exponencial OD (600 nm) = 0,5, y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. El fago se produjo después y se preparó para la siguiente ronda de selección. El Fab-pIX se produjo a partir de

25 lisados de células bacterianas crudos de las colonias TG-1.

Un ELISA de punto único de alto rendimiento (10 nM) se usó para clasificar las variantes a partir del esfuerzo de selección del fago. Se demostró la

78

unión a las curvas de IL-13 R130Q-biotinilada de los FAb específicos de variantes SDRU que se exponen en la proteína pIX del fago. Los clones con una mayor señal que la IL-13-167 (uniones de mayor afinidad que el Fab quimérico murino-humano) se eligieron para la conversión de Fab a Mab. Los datos clasificados para la

5 genoteca de IL-13 -62 basados en las sec. con núm. de ident.: 9 y 20 se presentan en la Tabla 7A, en donde al menos 40 clones tuvieron mayor afinidad para la IL-13 que la secuencia Fab parental murina (fago-Lc16H7). La Tabla 7B muestra el dato comparable para la genoteca de IL-13-142 basada en las sec. con núm. de ident.: 17 y 20, en donde 53 clones tuvieron mayor afinidad que las secuencias parentales

10 murinas (Lc16H7). Algunos clones contenían mutaciones en el marco (como se nota).

Tabla 7A. Datos de la genoteca de IL-13-62 clasificada.

Clon Fab	H91	N92	E93	Y94	Señal (% de Lc16Hc7)	Mutación adicional
	Q	D	G	del	184	Ninguno
1H05	Q	D	Y	G	172	Ninguno
1C06	H	S	W	G	172	Ninguno
3A10	H	V	W	G	160	Ninguno
1C09	H	N	E	A	152	Q38R
1H02	H	L	L	G	148	Ninguno
1F05	H	V	G	G	144	Ninguno
1D01	H	S	Y	G	144	Ninguno
1G05	Q	D	I	G	144	Ninguno
2B07	H	D	W	G	144	Ninguno
4D01	P	L	D	V	140	Ninguno
1H06	H	D	W	A	139	Ninguno
3D11	H	L	N	G	136	Ninguno
1A05	H	D	y	A	136	Ninguno
1C07	H	E	S	G	136	Ninguno
2A07	H	D	P	G	136	Ninguno
2A11	H	S	H	G	132	Ninguno
2C06	H	D	del	Y	128	L54Q (CDR2)
3C01	H	N	F	G	124	Ninguno
1A06	H	E	W	G	122	Ninguno
3E03	H	S	I	G	122	Ninguno
3G01	Q	D	L	G	122	Ninguno

701

Clon Fab	H91	N92	E93	Y94	Señal (% de Lc16Hc7)	Mutación adicional
3H12	H	D	S	G	120	mut externo VL
1A07	H	D	N	S	120	Ninguno
1A02	H	S	W	A	120	Ninguno
1D02	H	D	W	S	117	S76G
4B10	H	F	W	G	117	Ninguno
4F07	P	I	D	A	116	Ninguno
1D08	H	D	W	E	116	Ninguno
2G06	H	L	D	S	112	S56G (en CDR2)
1H12	H	D	L	G	111	Ninguno
3F08	H	L	M	G	111	Ninguno
3G05	P	L	D	S	108	Ninguno
1B05	H	D	R	D	108	Ninguno
1F04	H	S	S	G	108	Ninguno
1F11	H	S	V	G	108	Ninguno
2D09	H	N	V	G	108	Ninguno
2E07	P	L	E	A	104	Ninguno
1F12	H	N	H	G	100	Ninguno
2D04	Q	D	S	del	100	Ninguno

Tabla 7B. Datos de la genoteca de IL-13-142 clasificada.

Fago núm.	Secuencia de aminoácidos				% de Lc16Hc7
	H91	N92	E93	Y94	100
68	H	D	F	del	397,9
54	H	D	W	g	360,7
75	L	S	y	E	355,3
55	H	L	T	N	354,9
82	H	D	V	S	341,5
86	H	D	T	G	334,2
05	H	V	S	G	320,1
10	H	L	W	G	318,0
22	H	D	P	G	313,4
70	H	S	W	G	307,6
74	Q	D	M	G	300,7
35	H	D	R	G	296,2
31	H	F	R	R	288,3
46	H	V	T	L	281,2
21	W	S	D	G	276,5
94	H	D	L	G	272,5
85	H	M	W	G	259,3

80

Fago núm.	Secuencia de aminoácidos				% de Lc16Hc7
	H91	N92	E93	Y94	100
76	H	L	D	L	256,5
57	H	D	W	E	244,8
61	H	L	F	T	244,7
44	H	D	I	G	239,7
27	H	N	D	S	237,7
56	H	W	D	A	234,4
47	L	T	Y	E	232,9
06	P	L	T	H	232,0
81	H	D	V	G	231,1
18	W	D	G	G	230,7
11	Q	D	V	G	229,4
32	H	L	G	T	228,5
93	H	E	S	G	223,2
01	H	W	W	G	221,6
71	P	L	D	S	208,5
16	H	V	G	G	206,3
43	H	L	G	Q	204,6
36	H	E	L	G	196,3
13	H	E	W	G	195,9
77	H	D	F	A	195,3
88	H	F	W	G	193,2
51	H	S	A	G	192,0
84	H	L	I	E	185,8
62	Q	D	S	del	184,9
29	H	W	M	A	182,4
48	H	D	W	G	180,5
40	H	S	R	G	178,7
39	H	L	G	V	177,9
09	H	L	D	V	171,3
80	Q	D	del	Y	163,4
15	P	L	D	A	154,4
78	H	L	M	A	154,1
65	H	D	F	V	147,2
83	H	D	M	G	145,2
30	H	L	W	G	139,9
04	Q	D	L	G	127,2
67	P	I	D	G	126,7
87	H	S	L	G	124,9
33	H	D	W	G	124,4

81

Fago núm.	Secuencia de aminoácidos				% de Lc16Hc7
	H91	N92	E93	Y94	100
72	H	N	E	G	113,8

Conversión de Fab a Mab.

Las Fab seleccionadas de la genoteca de IL-13-62 (Tabla 7A) se convirtieron en los mAb de longitud total por digestión de restricción e inserción en el vector pUNDER para la detección. Estas variantes basadas en Lc6 se aparearon con Hc2 (sec. con núm. de ident.: 20) que contienen la cadena pesada de IgG1 humana y se filtraron por la transfección a pequeña escala en las células HEK293 por medio del uso de los sobrenadantes crudos y la IL-13 (Tabla 8).

10 **Tabla 8. Detección de los Mab que comprenden las variantes Lc6 y Hc2**

Designación Lc	Q38	S56	H91	N92	E93	Y94	% Inhibición de la unión a Ra2	Desviación estándar
2B03	-	-	-	D	Del	-	90,6	1,15
3G05	-	-	-	D	W	G	89,5	0,253
3E06	-	-	Q	D	S	DEL	89	2,15
2C09	-	-	-	E	W	G	87,6	0,383
5F04	-	-	-	D	Del	-	87,1	0,785
2C05	-	-	Q	D	L	G	83,8	0,794
2E12	-	-	-	D	W	S	83	2,67
1A05	-	-	Q	D	G	DEL	82,7	0,156
1H02	-	-	Q	D	I	G	81,7	1,06
2G01	-	-	-	F	W	G	81,2	0,0718
2H01	-	-	-	D	W	E	80	1,02
2A12	-	-	-	D	P	G	78,5	1,19
5A02	-	-	Q	D	Y	G	78,4	0,955
1B01	-	-	-	S	W	G	77,6	1,72
3A09	-	-	-	D	L	G	76,5	2,18
2A03	-	-	-	E	S	G	75,8	0,621
3B06	-	-	-	L	M	G	74,3	1
2A02	C836 LcV, (sec. con núm. de ident.: 2)						73	2,09
5D03	-	-	-	S	Y	G	72,8	4,84
2A01	-	-	-	S	H	G	72,1	0,541
3E03	-	-	-	-	H	G	70,9	4,28
3E05	-	-	P	L	D	T	70,8	3,8
1C02	-	-	-	V	W	g	68,4	3,35

82

Designación Lc	Q38	S56	H91	N92	E93	Y94	% Inhibición de la unión a Ra2	Desviación estándar
3G01	-	-	P	L	D	V	68,4	4,6
2C01	-	-	-	S	I	G	67,7	4,54
3A04	-	-	P	L	D	s	67	1,94
3G02	-	-	-	L	N	G	66,9	3,11
5G02	-	G	-	L	D	S	66,2	1,8
5H04	-	-	-	D	Y	A	66,1	2,36
5B03	R	-	-	-	-	A	63	4,37
2H09	-	-	P	I	D	A	62,5	4,99
2H08	-	-	-	L	D	S	62,3	3,97
3C06	-	-	-	S	V	G	62,1	1,09
2C04	-	-	-	-	F	G	61,9	3,46
1E03	-	-	-	L	L	G	61,5	2,06
3D01	-	-	-	V	G	G	58,5	3,14
1F03	-	-	-	D	R	D	57,6	5,5
2E04	-	-	P	L	-	A	56,6	5,08
3A05	-	-	-	D	N	S	55,5	3,9
1G02	-	-	-	S	W	A	55,2	1,49
2E01	-	-	-	-	-	A	53,9	4
2E06	-	-	-	S	S	G	50,2	2,79
3C09	HFA Lc6 (sec. con núm. de ident.: 9)						34,6	2,43

- La unión absoluta de IL12Ra2 que resulta de la genoteca de IL-13-62 (Tabla 7A) y la genoteca de IL-13-142 (Tabla 7B) no se puede comparar directamente en términos de magnitud de la señal ya que los ensayos se
- 5 realizaron usando condiciones ligeramente diferentes. Las variantes de la genoteca de 142 no se probaron en el formato Mab.

Mutagénesis dirigida al sitio que dirige los residuos específicos en las CDR

- Aunque la exposición del fago pIX y la selección se escogió como el modo para la maduración por afinidad de la cadena ligera C836 de marco
- 10 adaptado, la mutagénesis dirigida al sitio (SDM) se usó también en Lc6 y Hc2. Mediante el SDM, ciertos residuos de las SDR se aleatorizaron a todos los aminoácidos posibles excepto la metionina y la cisteína. Por el contrario, cualquiera de las metioninas o cisteínas en las SDR se eliminó para evitar la presencia de residuos susceptibles a la oxidación. Por lo tanto, en Hc2 (sec. con

83

núm. de ident.: 20) M34 y M100 se alteraron por SDM y estas variantes de posición única se detectaron por aumentos en la actividad de unión junto con las secuencias que comprenden mutaciones adicionales.

En pocas palabras, aproximadamente 200 variantes de la cadena ligera y 400 variantes de cadena pesada de Lc6-Hc2 se generaron por mutagénesis de alto rendimiento dirigida al sitio. Para el ensayo, cada variante de la cadena ligera se apareó con la secuencia Hc2 y se ensayó con respecto a la actividad (datos no presentados). Del mismo modo, cada variante de la cadena pesada se apareó con la Lc6 para la detección de la unión directa a IL-13 y los ensayos de unión competitiva de Ra2 con la IL-13. Con este enfoque se identificaron varios anticuerpos mejorados que tienen la variante de cadena ligera como la variante de cadena pesada. Muchas variantes demostraron una mejoría en el anticuerpo murino original y otras se mejoraron en comparación con las regiones V de HFA L6 (sec. con núm. de ident.: 9) y H2 (sec. con núm. de ident.: 20). Algunas de las mutaciones de la cadena ligera mejoradas se encontraban en la misma posición que las mutaciones positivas identificadas a partir del método de genoteca para la variante de fago. Además, las variantes de cadenas pesadas con la actividad mejorada seleccionadas se combinaron con el fago derivado de las cadenas ligeras para formar los anticuerpos monoclonales completos y se probaron nuevamente. Varias de estas combinaciones producen la mejora adicional de la afinidad de unión para la IL-13 R130Q. Esta afinidad de unión fue mayor que la medida para el mAb murino original (C836) y varias veces más alta en comparación con las regiones-V de HFA, Lc6 y Hc2. Estos mAb se purificaron y sometieron a mediciones de afinidad por medio de la resonancia de plasmón (Biacore) y más de 50 MABs que se probaron (más de 100 probados) tuvieron mayor afinidad para la IL-13 que el Mab murino original (C836), que fue de aproximadamente 50 pM.

Basado en los datos de detección de la matriz Lc más Hc, las variantes Hc que se seleccionaron (obtenidas a través de SDM) se aparearon con una variante L6, N92-, E93D de sec. con núm. de ident.: 9 (representado como sec. con núm. de ident.: 25) y se escaló la producción para la purificación y su posterior análisis. Estos mAb se probaron rigurosamente para la unión directa a la IL-13 R130Q por el análisis de Biacore, para la actividad de neutralización por la capacidad de inhibir la unión de IL-13 a su Rα1 en el ensayo fosfo-STAT6, y por una versión basada en Luminex de la capacidad de inhibir la IL-13 R130Q de la unión a su Rα2. La inhibición de la unión de IL-13 Ra2 usó 500 pg/ml de b-wt IL-13b y los valores de IC₅₀ se calcularon en base a las curvas que se muestran en la Figura2. Los valores de IC₅₀ para el ensayo de P-STAT6 y los valores IC₅₀ para el ensayo Luminex de inhibición de Ra2 se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9. Propiedades de los candidatos de los mAb que comprenden Lc-2B03 (sec. con núm. de ident.: 25) Y M34 Y M100 Hc2 sustituida (sec. con núm. de ident.: 20).

Sec. con núm. de ident.: 20 (HC) Variaciones	K _D (pM) HEK IL-13 R130Q	K _D (pM) CHO IL-13 silvestre	K _D (pM) CHO IL-13 R130Q	Solubilidad PBS mg/ml	Solubilidad suero mg/ml	P-STAT6 EC ₅₀ ng/ml	Inhib. Ra2 IC ₅₀ ng/ml
M34S, M100L	1,4		18,4	<114,8			
M34E, M100L	7,6					0,16	3,4
M34V, M100L	16,4	10,6	19	114	57	1,8	2,13
M34V, M100L, V106I	25,2						
M34S, M100L, V106I	20,5						
M34E, M100L, V106I	11,4					1,79	2,54
M34S, M100L, V106I	20,9			159		1,1	2,25
M34Q, M100L	24,3		25,1			0,87	1,71
T31S, M34S, M100L, V106I	15,2		21,1			0,65	1,68
T31S, M34S, M100L	12,3		10,1			0,59	1,72
T31S, M34V, M100L	3,7		5,8			0,59	1,75

De esta manera, las sustituciones en Lc6 (sec. con núm. de ident.: 9) que se encuentran en los candidatos de los mAb de la Tabla 7A con

85

mutaciones del marco, incluyen las variantes que se describen a continuación para la sec. con núm. de ident.: 27.

Variantes de secuencia de cadena ligera - Lc6 (sec. con núm. de ident.: 27; CDR subrayadas)	Descripción de las variantes
EIVLTQSPAT <u>LSLSPGERAT LSCRASKSIS</u> <u>KYLA</u> WYQX ₃₈ KP <u>GQAPRL</u> LIYS <u>GST</u> X ₅₄ <u>QSGIPA</u> 60 <u>RFSGSGSGTD FTLTISSLEP</u> <u>EDFAVYYCQQ</u> <u>X₉₁ X₉₂ X₉₃ X₉₄</u> PYTFGQ GTKLEIK 107	En donde: el residuo 38 puede ser Met, Ser, Leu, Glu, Gln, o Val; 54 puede ser Leu o Gln; 91 puede ser His, Gln, o Pro; 92 puede ser Asn, Asp, Ser, Leu, Pro, Ile, Phe, Glu, o Val; 93 puede ser Glu, Asp, Gly, Ser, Ile, Tyr, Trp, Asn, His, Val, Met, Arg, Leu, Phe, Pro o está ausente; y 94 puede ser Tyr, Gly, Ser, Ala, Val, Phe, Thr, Glu, o está ausente.

La mutagénesis dirigida al sitio se usó para crear variantes

- 5
- adicionales con cambios en Hc2 (sec. con núm. de ident.: 20) CDR 1 (26GFSLSITYGMGVG₃₇) y CDR3 (100MGSDYDVWFDY₁₁₀). Las variantes del dominio variable de la cadena pesada que produce la unión a IL-13 de alta afinidad puede incluir aquellos de (sec. con núm. de ident.: 28).

Variantes de secuencia de cadena pesada Hc2 (sec. con núm. de ident.: 28; CDR subrayadas)	Descripción de las variantes
QVTLKESGPV LVKPTETLTL TCTVSGFSLS X ₃₁ <u>YG</u> X ₃₄ <u>GVGWIR QPPGKALEWL AHVWDDV</u> KR 60 <u>YNPALKSRLT ISKDTSKSQV VLTMTNMDPV</u> <u>DTATYYCAR</u> X ₁₀₀ <u>GSDYD</u> X ₁₀₆ <u>WFDY</u> WGQGT ₁₂₁ VS S 121	En donde el residuo 31 puede ser T o S; 34 puede ser Met, Ser, Leu, Glu, Gln, o Val; 100 puede ser Met o Leu; y 106 puede ser Val o Ile.

- 10
- De esta manera, una región variable de la cadena pesada de sec. con núm. de ident.: 28, y las variantes descritas anteriormente, se podrían usar para manipular un anticuerpo en combinación con un segundo dominio de unión al antígeno que comprende las variantes en la L-CDR3 como se muestra en la Fórmula I:

15

Q-Q-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-P-Y-T (sec. con núm. de ident.: 29)

en donde Xaa₁ puede ser His, Gln, o Pro;

80

Xaa₂ puede ser Asn, Asp, Ser, Leu, Pro, Ile, Phe, Glu, o Val;

Xaa₃ puede ser Glu, Asp, Gly, Ser, Ile, Tyr, Tryp, Asn, His, Val, Met, Arg, Leu, Phe, Pro o estar ausente; y

Xaa₄ puede ser Tyr, Gly, Ser, Ala, Val, Phe, Thr, Glu, o estar

5 ausente.

Las regiones determinantes de complementaridad (CDR) del anticuerpo monoclonal de ratón, C836 se adaptaron en 15 marcos de cadena ligera y 6 de cadena pesada de anticuerpo humano que proporcionan anticuerpos que unen con alta afinidad la IL- 13 R130Q humana y la IL-13 humana de tipo-salvaje. Las cadenas ligeras de HFA 2, 3, 6, 8, 14 (sec. con núms. de ident.: 5, 6, 9, y 17) y la cadena pesada 2 (sec. con núm. de ident.: 20) produjeron los mAb con bioactividad muy deseable y alta afinidad. Se esperan que los anticuerpos resultantes adaptados con marco humano tengan menor inmunogenicidad si se administran a los pacientes humanos y, por lo tanto, proporcionan una mayor vida media plasmática que sus contrapartes quimérica o completamente murina.

La afinidad (K_D) del mAb C836 de ratón, de longitud completa, silvestre, se determinó que era aproximadamente 50 pM y similar a la quimera de la región C humana-región V de ratón(Lc16Hc7) como se midió por el Biacore. La adaptación de las CDR a partir del mAb C836 en marcos de anticuerpos humanos disminuyó la K_D de unión al antígeno de aproximadamente 5 veces, a aproximadamente 250 pM (Tabla 6) la cual es típica para una quimera sencilla con CDR-injertado. El ensayo de matriz de alto rendimiento de una genoteca Fab y la síntesis *de nuevo* de nuevas cadenas de anticuerpos y la construcción del vector para la transfección transitoria activó el ensayo de numerosos Fab, así como mAb de longitud completa, que comprende las combinaciones de región V ligera y pesada, para la unión relativa.

47

En una segunda etapa, las afinidades de la unión de los mAb seleccionados adaptados con marco humano se maduraron por enfoque colorido para los residuos seleccionados llamados SDR que usan las genotecas-Fab de fagos como la mutagénesis dirigida al sitio. A partir de esos esfuerzos, los mAb que tienen

5 una secuencia de cadena ligera sencilla apareada con 11 variantes de secuencia Hc2 (sec. con núm. de ident.: 20) se expresaron en células CHO y HEK293 y mostraron afinidad de unión por el análisis del Biacore para IL-13 R130Q y IL-13 silvestre de menos que 50 pM (Tabla 9). Estos anticuerpos: 1) neutralizaron la función de IL-13 por la inhibición de IL-13 R130Q y la IL-13 silvestre de la unión a los receptores de IL-

10 13 R α 1, inhibieron la fosforilación del factor de transcripción STAT-6, conocida por ser activada por la señalización a través del complejo receptor de IL-13 R α 1/IL-4, y 3) inhibieron la unión de la IL-13 R130Q y la IL 13 silvestre al receptor R α 2 de IL-13.

La caracterización biofísica indicó que varias especies muestran solubilidad mayor que 100 mg/ml en PBS y mayor que 50 mg/ml en el suero

15 humano. De esta manera, estos mAb modificados, activos, tienen propiedades que son consistentes con las propiedades deseables típicamente observadas en una molécula terapéutica para el uso en el tratamiento de las enfermedades mediadas por IL-13.

Además de la preparación de mAb por la combinación de la cadena

20 ligera designada 2B03 (sec. con núm. de ident.: 25) con las variantes CDR Hc2 tales como sec. con núm. de ident.: 26, otras variantes se pueden preparar de la cadena ligera de la sec. con núm. de ident.: 9 y 17 junto con las variantes de la cadena pesada de la sec. con núm. de ident.: 20 como se muestra en la Tabla 9. De esta manera, gran número de variantes de los mAb de alta afinidad,

25 inmunoespecíficos a IL-13 son posibles en base a estos descubrimientos y las enseñanzas de este documento. Por ejemplo, estos incluyen las variantes establecidas en la sec. con núms. de ident.: 25 y 26.

88

La combinación de Hc y Lc representada por el mAb M1295 que comprende las regiones variables de las sec. con núm. de ident.: 25 y 26 es de particular interés por tener un marco de cadena pesada que es susceptible de desarrollo terapéutico. La eliminación de la metionina en los CDR 1 y CDR3 de la

5 cadena pesada (residuos 34 y 100) reduce las posibilidades de oxidación y hace a estas secuencias ideales para el desarrollo terapéutico. Se espera que los anticuerpos que tienen el contenido de metionina reducido exhiban una estabilidad mejorada a la oxidación.

EJEMPLO 6: ANÁLISIS DE EPÍTOPO Y PARÁTOPO DE DOMINIOS DE UNIÓN

10

ANTI IL-13

Se realizó el mapeo del epítipo mediante la cristalografía de rayos X y se compararon los resultados de los Fab relacionados con C836 (que comprende la sec. con núm. de ident.: 2 y 3), la variante HFAL62 adaptada con el marco humano injertado al CDR (que comprende la sec. con núm. de ident.: 9 y 20), y la variante

15 M1295 de afinidad madurada a la región V (que comprende la sec. con núm. de ident.: 25 y 26) unida a la IL-13 (sec. con núm. de ident.: 1).

Una versión quimérica marcada con His del Fab C836 se expresó en las células CHO y se purificó mediante cromatografía de exclusión por tamaño y afinidad. Los fragmentos Fab de HFAL62 y M1295 se prepararon por

20 clivaje de papaina de los mAb correspondientes y se purificaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño y afinidad. La IL-13 humana recombinante se adquirió de R&D Systems (cat. núm. 213-IL/CF). Los complejos de IL-13-Fab se prepararon por la mezcla de Fab con exceso de IL-13 en una proporción molar de 1:1,2. La mezcla se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente,

25 se concentró, y separó de la especie no compleja mediante la cromatografía de exclusión por tamaño.

89

La cristalización se llevó a cabo mediante el método de difusión del vapor de la gota colgante a 20 °C. Los cristales de C836: IL-13 se obtuvieron a partir de 20 % de PEG 3350, 0,2 M de tartrato de sodio, 0,1 M de HEPES, pH 7,5. Los cristales de HFAL62: IL-13 se obtuvieron a partir de 14 % de PEG 3350, 0,2 M de tartrato amónico, 0,1 M de MES, pH 6,5. Los cristales de M1295: IL-13 se obtuvieron a partir de 25 % de PEG 8K, acetato de sodio 0,1 M, pH 4,5. Para la colección de datos de los rayos X, un cristal de cada complejo se empapó durante unos segundos en el licor madre correspondiente suplementado con 20 % de glicerol. Los datos de difracción se recogieron y procesaron mediante un generador de rayos X Rigaku MicroMax™-007HF equipado con un detector CCD Saturno 944, y un sistema de refrigeración criogénica X-Stream™ 2000 (Rigaku, The Woodlands, TX).

Las estructuras cristalinas de los tres complejos, C836:IL-13, HFAL62:IL-13 y M1295:IL-13, se determinaron en resolución de 2,0 Å, 1,9 Å, y 2,8 Å, respectivamente, y se perfeccionaron con el Factor R cristalográfico de 22,4 %, 18,6 % y 19,7 %, respectivamente. En las tres estructuras, la interface antígeno-anticuerpo se define claramente en la densidad electrónica.

Cada uno de los tres Fab (C836, HFAL62 y M1295) se unen a la IL-13 en la superficie de las hélices A y D cerca del N-y C-terminal de la cadena de polipéptido de IL-13. La interface antígeno-anticuerpo cubre aproximadamente 600 Å² en cada una de las moléculas interactuantes. Los residuos en contacto se definen mediante una distancia interatómica de 4 Å de corte. Mediante esta definición, el epítopo reconocido por estos anticuerpos incluye 8 residuos de la IL-13, tres de la hélice A (Arg10, Ile13, Glu14) y 5 residuos de la hélice D (Leu100, Lys103, Phe106, Arg107, Glu108). Basado en el número de contactos, Arg10 y Arg107 parecen ser residuos claves del epítopo.

90

El parátipo en C836 incluye 12 residuos que interactúan con la IL-13 (basado en 4 Å de corte para la distancia interatómica) que reside en cada uno de las seis CDR excepto L-CDR2. El parátipo incluye 3 residuos de la cadena L (Tyr32, His91, Asn92 de la sec. con núm. de ident.: 2) y 9 residuos de la cadena H (Tyr32, Trp54, Trp55, Asp56, Val58, Arg60, Asp103, Tyr104, Asp105 de la sec. con núm. de ident.: 3). Basado en el número de contactos, las CDR de reconocimiento principal son H2 y H3. El residuo de anclaje en la cadena ligera es Tyr32, que se coloca contra Arg10 y forma un puente de hidrógeno con la Glu14 de la IL-13. El único contacto con la L-CDR3 es el enlace de hidrógeno entre Arg10 (IL-13) y el grupo carbonilo de la de la cadena principal de His91. Las cadenas laterales de los residuos en la L-CDR3 no parecen interactuar directamente con la IL-13.

Los residuos epítipo y parátipo de HFAL62 son idénticos a aquellos para C836.

El M1295 comprende residuos alterados en L-CDR3 (sec. con núm. de ident.: 25) en comparación con el HFAL62, en donde los residuos Asn92-Glu93 se sustituyeron por Asp92, es decir, un residuo se eliminó y uno se mutó. La comparación de las estructuras de cristal de M1295 y HFAL62 en el complejo con la IL-13 indica que ocurrieron cambios conformacionales no significativos en las otras CDR. La eliminación de L-CDR3 resultó en un lazo más corto para que el residuo Asp92 introducido ocupe el espacio anteriormente sujeto por el par Asn-Glu, mientras que los residuos His91 y Tyr94 que flanquean están aproximadamente en las mismas posiciones. Estos cambios permitieron los contactos adicionales con IL-13. La LC Asp92 de la sec. con núm. de ident.: 25 forma un puente salino con un residuo epítipo clave Arg10 (sec. con núm. de ident.: 1). Este puente salino no existe en HFAL62 porque los puntos potenciales de la pareja (Glu93) están fuera del Arg10. Otro nuevo contacto es el puente de

a1

hidrógeno entre LC Asp92 y Ser6 en el extremo N-terminal de la IL-13. Esta interacción extiende el epítipo desde la Ser6 que no estaba en contacto con cualquiera de HFAL62 o C836. En total, el epítipo de la IL-13 limitado por M1295 incluye 9 residuos de la IL-13 (Ser6, Arg10, Ile13, Glu14, Leu100, Lys103, Phe106, Arg107, Glu108). El parátipo de M1295 incluye 3 residuos de la cadena L (Tyr32, His91, Asp92) y 9 residuos de la cadena H (Tyr32, Trp54, Trp55, Asp56, Val58, Arg60, Asp103, Tyr104, Asp105).

EJEMPLO 7: DETECCIÓN DE LA ALANINA

Además de la cristalografía, descrita en la presente descripción hay un estudio de mutagénesis por detección de la alanina de las regiones variables de C836 de la cadena pesada y ligera, para determinar los residuos del(de los) dominio(s) variable(s) que son importantes en la unión de IL-13.

Los residuos de los dominios variables de anticuerpo en contacto con los antígenos examinados en 59 complejos y descritos como los residuos determinantes de la especificidad (SDR) se seleccionaron para la mutagénesis. Los residuos fueron 27-36, 46-56 y 89-97 de la cadena ligera de C836 (sec. con núm. de ident.: 2) y los residuos 27-39, 49-60 y 100-111 de la cadena pesada (sec. con núm. de ident.: 3). Las variantes se probaron en el ensayo en fase sólida IL-13R-alfa 2 como se describe en el Ejemplo 2 en seis concentraciones mediante diluciones seriadas de 3 veces a partir de 1 µg/ml. Las actividades se normalizaron con el mAb de silvestre.

Basado en cómo la unión de IL-13R-alfa2 cambió a una concentración nanomolar baja de anticuerpos en relación con el anticuerpo silvestre, o si la unión no se afectó o realmente mejoró por la sustitución de alanina, los residuos se clasificaron (en orden de importancia) como "crítico", "importante" o "irrelevante" para la unión a la IL-13.

a2

Crítico en la unión: Ligera: Y32, Q89, Q90, y H91. Pesada: G33, H52, V58, R60, M100, G101, S102, D103, Y104, D105, y W107.

Importante para la unión: Ligera: K31, Y49, N92, E93, y Y96. Pesada: F27, L29, Y32, M34, G35, L50, I53, W54, D56, y V106.

5 Irrelevante para la unión: Ligera: K27, S28, I29, S30, L33, S50, G51, S52, T53, L54, Q55, S56, Y94, y P95. Pesada: S28, S30, T31, W49, D57, y K59.

En general, la cadena pesada tiene más residuos implicados en la unión (*es decir*, clasificados como críticos o importantes para la unión) en relación con
 10 los residuos de la cadena ligera. Eso apoya la observación de que varios marcos diferentes de la cadena ligera podrían producir anticuerpos IL-13 que unen con eficacia a la IL-13. Por ejemplo, la combinación de L3 (sec. con núm. de ident.: 6), L6 (sec. con núm. de ident.: 9), y L14 (sec. con núm. de ident.: 17) combinadas con H2 (sec. con núm. de ident.: 20) tienen valores similares de K_d de aproximadamente
 15 250 pM. Por el contrario, sólo tres mutaciones en la región marco de la cadena pesada (sec. con núm. de ident.: 3) en 32 y 31 causó una disminución de 2 veces en la K_d ; de 250 pM a 500 pM, respectivamente.

Se encontró que 20 residuos de los 51 residuos mutados para la alanina forman un núcleo de residuos involucrados en la unión, y otros 15
 20 residuos próximos a los residuos críticos son importantes para la unión.

En conjunto con la evidencia a partir de los estudios de cristalografía (Ejemplo 6), los residuos determinaron estar involucrados en ayudar a definir más la unión de los residuos del parátipo de los anticuerpos de la invención, así como el potencial para la modificación de los marcos que
 25 podrían resultar en variantes activas.

EJEMPLO 8: BIOACTIVIDAD DE UN ANTICUERPO HUMANIZADO ANTI-IL-13

a3

El M1295 se convirtió en un anticuerpo IgG1 totalmente humano y se evaluó la actividad biológica en un modelo de rata de inflamación alérgica de la vía respiratoria. Las ratas Brown Norway sensibilizadas y posteriormente desafiadas con proteína ovoalbúmina (ova) produjeron una respuesta alérgica en las vías aéreas

5 caracterizada por un reclutamiento aumentado de eosinófilos al pulmón, y un aumento de la hiperreactividad bronquial (AHR) según lo determinado por los cambios en la resistencia pulmonar en respuesta al desafío con la metacolina (MCh), un agonista no selectivo del receptor muscarínico. Las ratas tratadas con M1295 IgG1 durante la fase de desafío de la respuesta alérgica, después de la sensibilización

10 sistémica a la ovoalbúmina, demostraron una disminución dosis-dependiente en las células totales en el fluido del lavado broncoalveolar (BAL). 48 ratas se sensibilizaron a OVA en los días 0, 14 y 21, con una serie de inyecciones de OVA y alumbre para establecer una respuesta inflamatoria prolongada. En concreto, las ratas se sensibilizaron por inyección subcutánea de 0,5 ml de una solución de OVA

15 (100 mg/ml) mezclada con hidróxido de aluminio (4,28 mg/ml) en solución estéril (0,9 % de NaCl), con la excepción del Grupo 1, el control no sensibilizado, el que simula al tratado con 0,5 ml de 0,9 % de NaCl estéril mediante el mismo protocolo. Todos los animales con la excepción del Grupo 1 de control se desafiaron después, con OVA (1 mg/kg) en los días experimentales 23, 25 y 28 por instilación intratraqueal

20 (IT) para provocar una respuesta alérgica específica a ova en las vías respiratorias.

Para el estudio, 48 ratas se dividieron en 6 grupos de 8 individuos. El grupo 1 se simuló-sensibilizó y desafió con PBS y trató con el vehículo. El grupo 2 se sensibilizó con ova y trató sólo con el vehículo. El grupo 3 se sensibilizó con ova y trató con budesonida el día antes y el día del desafío con

25 OVA (1 mg/kg/dosis, IT). Los grupos 4-6 se trataron con dosis ascendentes de M1295 (1 mg/kg, 3 mg/kg y 10 mg/kg) por inyección intravenosa después de la fase de sensibilización, durante la fase del desafío, a partir del día 21 de estudio

qu

(por la tarde después de la última inyección de OVA-alumbre), y en el día 27 del estudio.

El día 29, los animales se sometieron a pruebas de la función pulmonar en respuesta al desafío con metacolina. Después de las mediciones de la línea base de la resistencia y el funcionamiento, dosis crecientes de metacolina (SMI, 6, 12, 25, 50 y 100 mg / ml en nebulizador) se entregaron a través de aerosoles y se midieron la resistencia y el funcionamiento de los pulmones. La resistencia de las vías respiratorias se calculó para cada concentración de metacolina y la media + SEM se representó para todos los grupos de tratamiento.

Los animales se sacrificaron y el fluido BAL se recuperó para la determinación de las células infiltrantes, en especial el reclutamiento de los eosinófilos en el BAL. Además de los objetivos principales de AHR y el reclutamiento de eosinófilos en el BAL, las muestras de tejido pulmonar se recogieron para los análisis histológicos de rutina que incluyen la tinción H & E y la evaluación de la producción de la mucosidad.

Los cambios en la resistencia de la vía respiratoria inducida por MCh se evaluaron mediante el ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples Bonferroni posteriores a la prueba. Los cambios en el número de células del BAL, los niveles de anticuerpo, los niveles de citocinas y las puntuaciones de la patología se realizaron mediante el ANOVA con una prueba de comparación múltiple apropiada. Un valor de $p < 0,05$ se considera significativo.

Hubo una marcada disminución dosis-dependiente del número de células de eosinófilos, linfocitos, macrófagos y neutrófilos en los grupos de ratas tratadas con M1295 IgG1 en comparación con los animales sensibilizados con ova tratados con solución salina. Los porcentajes relativos de eosinófilos se redujeron notablemente, con números aproximadamente de 50 % menores en los animales tratados con todas las dosis de M1295 IgG1 en comparación con los animales

as

sensibilizados con ova tratados con solución salina. Aunque la disminución en el reclutamiento de las células en el pulmón y la disminución en el porcentaje relativo de eosinófilos no alcanzó significación estadística, las tendencias generales indican que la actividad biológica de M1295 IgG1 en la rata.

- 5 Con respecto a la hiperreactividad de la vía respiratoria, los animales tratados con 10 mg/kg de M1295 IgG1 mostraron una disminución estadística significativa ($p < 0,01$) en el máximo de resistencia de la vía respiratoria a continuación de repetidos desafíos con MCh 24 horas a continuación del último desafío del pulmón con OVA y la resistencia de la línea base de la vía respiratoria (p 10 $< 0,05$) justo antes de ascender el desafío con MCh, en relación con los animales sensibilizados con ova tratados con solución salina.

El estudio confirma que la M1295 IgG1 es biológicamente activa, según se determinó por un efecto dosis-dependiente en los parámetros asociados con la respuesta alérgica y la inflamación.

15 **EJEMPLO 9: USO DE UN ANTICUERPO HUMANIZADO ANTI-IL-13 PARA TRATAR ENFERMEDADES HUMANAS**

- Estudios preclínicos demostraron los efectos funcionales de la neutralización mediada por M1295 de IL-13 humana en células humanas basado en ensayos *in vitro* por medio del uso de puntos finales mecánicamente 20 relevantes asociados con la patogénesis del asma, dermatitis atópica, y enfermedades mediadas por eosinófilos. Los resultados confirman los efectos funcionales de la M1295 y los fragmentos de anticuerpo que comprenden las regiones de unión relacionados según lo determinado por la inhibición de la fosforilación STAT6 mediada por IL-13, la inhibición de la inducción de las 25 quimiocinas CCL2 y CCL26 de las células de asentamiento mediada por IL-13, y la inhibición de la modulación de CD23 mediada por IL-13.

Estos datos, además de un amplio conjunto de datos publicados que evalúan el papel de la ruta de IL-13 en las enfermedades atópica y no atópicas, demuestran que la IL-13 es un modulador inmune importante y tiene un papel fundamental en el asma, la dermatitis atópica y la enfermedad mediada por eosinófilos. Los datos preclínicos apoyan la hipótesis de que el antagonismo de la IL-13 podrá resultar en una reducción de los eventos de la señalización corriente abajo asociados con las respuestas inflamatorias de tipo II, que proporcionan la evidencia de que la intervención de la terapia con anti-IL-13 podría ser beneficiosa en los pacientes con manifestaciones clínicas asociadas con estas enfermedades.

El estudio del M1295 y los fragmentos de anticuerpo que comprende las regiones de unión relacionadas podrá explorar un amplio intervalo de dosis (0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1,0 mg/kg, 3,0 mg/kg y 10,0 mg/kg), que incluye las dosis que podrían potencialmente ser eficaces en los pacientes con asma. El intervalo de la dosis que se debe evaluar en este estudio de Fase 1 se basa en la neutralización *in vitro* de la bioactividad de la IL-13 humana, la toxicidad y los datos farmacocinéticos en las ratas y los macacos y la experiencia clínica con IMA-638, un mAb anti-IL-13 que se une con alta afinidad a la IL-13 humana.

NOVEDAD DE LA INVENCION

Reivindicaciones

1. Un anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión al
antígeno de este que se une a un epítipo de IL-13 (sec. con núm. de ident.: 1),
5 caracterizado porque el epítipo comprende una arginina en la posición 10 y una
arginina en la posición 107 de la sec. con núm. de ident.: 1.
2. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, caracterizado
además porque el epítipo comprende, además, un residuo seleccionado del grupo
que consiste de: una serina en la posición 6, una isoleucina en la posición 13, un
10 ácido glutámico en la posición 14, una leucina en la posición 100, una lisina en la
posición 103, una fenilalanina en la posición 106, y un ácido glutámico en la
posición 108 de la sec. con núm. de ident.: 1.
3. Un anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión al
antígeno de este, caracterizado porque comprende un parátipo que comprende
15 una región variable de cadena ligera y comprende, además, un residuo de
tirosina que a) interactúa con la IL-13 en la arginina en la posición 10; y b) forma
un enlace con un ácido glutámico en la posición 14 de la sec. con núm. de ident.:
1.
4. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 3, caracterizado
20 además porque el parátipo comprende, además, un residuo de histidina y residuo
de asparagina en dicha región variable de cadena ligera.
5. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 3, caracterizado
además porque el parátipo comprende, además, una región variable de cadena
pesada que comprende residuos de contacto con el parátipo seleccionado del grupo
25 que consiste de tirosina, triptófano, ácido aspártico, valina, y arginina.
6. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 5, caracterizado
además porque la región variable de cadena ligera comprende la sec. con núm. de

ident.: 2 y la tirosina está en la posición 32 de la sec. con núm. de ident.: 2, y la región variable de cadena pesada comprende la sec. con núm. de ident.:3 y los residuos de contacto comprenden una tirosina en la posición 32, un ácido triptófano en la posición 54, y una tirosina en la posición 104.

- 5 7. Un anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión al antígeno de este, caracterizado porque comprende un parátipo que comprende una región variable de cadena ligera y comprende, además, un residuo de tirosina que a) interactúa con la IL-13 en la arginina en la posición 10; y b) forma un enlace con una serina en la posición 6 de la sec. con núm. de ident.: 1.

- 10 8. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 7, caracterizado además porque el parátipo comprende, además, un residuo de tirosina y un residuo de histidina en la región variable de cadena ligera.

9. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 7, caracterizado además porque el parátipo comprende, además, una región variable de cadena pesada que comprende residuos de contacto con el parátipo seleccionado del grupo que consiste de tirosina, triptófano, ácido aspártico, valina y arginina.
- 15

10. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 9, caracterizado además porque la región variable de cadena ligera comprende la sec. con núm. de ident.: 25 y el ácido aspártico está en la posición 92 de la sec. con núm. de ident.: 25, y la región variable de cadena pesada comprende la sec. con núm. de ident.: 26 y los residuos de contacto comprenden una tirosina en la posición 32, un ácido triptófano en la posición 54, y una tirosina en la posición 104.
- 20

11. Un anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión al antígeno de este, que compete por la unión a un epítipo de IL-13 con un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste de C863, HFAL62, y M1295.
- 25

99

12. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 11, caracterizado además porque el anticuerpo que compite por la unión a un epítipo de IL-13 comprende una CDR3 de cadena ligera (L-CDR3) de la sec. con núm. de ident.: 29.

5 13. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 12, caracterizado además porque el L-CDR3 de la sec. con núm. de ident.: 29 se define además como se muestra en la Fórmula (I):

Fórmula (I)--Q-Q-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-P-Y-T (sec. con núm. de ident.: 29)

10

en donde Xaa₁ puede ser His, Gln, o Pro;

Xaa₂ puede ser Asn, Asp, Ser, Leu, Pro, Ile, Phe, Glu, o Val;

Xaa₃ puede ser Glu, Asp, Gly, Ser, Ile, Tyr, Tryp, Asn, His, Val, Met, Arg, Leu, Phe, Pro o estar ausente; y

15 Xaa₄ puede ser Tyr, Gly, Ser, Ala, Val, Phe, Thr, Glu, o estar ausente.

14. El anticuerpo de la reivindicación 11, caracterizado además porque el anticuerpo que compite por la unión a un epítipo de IL-13 comprende la región variable de cadena pesada de la sec. con núm. de ident.: 28.

20 15. El anticuerpo de la reivindicación 11, caracterizado además porque el anticuerpo que compite por la unión a un epítipo de IL-13 comprende, además, la región variable de cadena ligera de la sec. con núm. de ident.: 27.

16. Un anticuerpo monoclonal aislado que comprende la cadena ligera variable de la sec. con núm. de ident.: 9 y variantes de esta, y la cadena pesada variable de la sec. con núm. de ident.: 20, y variantes de esta.

25 17. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 16, caracterizado además porque las variantes de la cadena ligera variable de la sec. con núm. de ident.: 9 comprende cambios en los residuos seleccionados del grupo que consiste de

100

una histidina en la posición 91, una asparagina en la posición 92, un ácido glutámico en la posición 93, y una tirosina en la posición 94.

18. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 17, caracterizado además porque los residuos seleccionados del grupo que consiste de una histidina en la posición 91, una asparagina en la posición 92, un ácido glutámico en la posición 93, y una tirosina en la posición 94 se cambian para los diferentes aminoácidos o eliminados como sigue:

Histidina Pos. 91	Asparagina Pos. 92	Ácido glutámico Pos. 93	Tirosina Pos. 94
Q	D	G	eliminado
Q	D	Y	G
H	S	W	G
H	V	W	G
H	N	E	A
H	L	L	G
H	V	G	G
H	S	Y	G
Q	D	I	G
H	D	W	G
P	L	D	V
H	D	W	A
H	L	N	g
H	D	y	A
H	E	S	G
H	D	P	G
H	S	H	G
H	D	eliminado	Y
H	N	F	G
H	E	W	G
H	S	I	G
Q	D	L	G
H	D	S	G
H	D	N	S
H	S	W	A
H	D	W	S
H	F	W	G
P	I	D	A
H	D	W	E

Histidina Pos. 91	Asparagina Pos. 92	Ácido glutámico Pos. 93	Tirosina Pos. 94
H	L	D	S
H	D	L	G
H	L	M	G
P	L	D	S
H	D	R	D
H	S	S	G
H	S	V	G
H	N	V	G
P	L	E	A
H	N	H	G
Q	D	S	eliminado
H	D	F	eliminado
H	D	W	G
L	S	y	E
H	L	T	N
H	D	V	S
H	D	T	G
H	V	S	G
H	L	W	G
H	D	P	G
H	S	W	G
Q	D	M	G
H	D	R	G
H	F	R	R
H	V	T	L
W	S	D	G
H	D	L	G
H	M	W	G
H	L	D	L
H	D	W	E
H	L	F	T
H	D	I	G
H	N	D	S
H	W	D	A
L	T	y	E
P	L	T	H
H	D	V	G
W	D	G	G
Q	D	V	G

102

Histidina Pos. 91	Asparagina Pos. 92	Ácido glutámico Pos. 93	Tirosina Pos. 94
H	L	G	T
H	E	S	G
H	W	W	G
P	L	D	S
H	V	G	G
H	L	G	Q
H	E	L	G
H	E	W	G
H	D	F	A
H	F	W	G
H	S	A	G
H	L	I	E
Q	D	S	eliminado
H	W	M	A
H	D	W	G
H	S	R	G
H	L	G	V
H	L	D	V
Q	D	eliminado	Y
P	L	D	A
H	L	M	A
H	D	F	V
H	D	M	G
H	L	W	G
Q	D	L	G
P	I	D	G
H	S	L	G
H	D	W	G
H	N	E	G

19. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 16, caracterizado además porque las variantes de la cadena pesada variable de la sec. con núm. de ident.: 20 comprende cambios en los residuos seleccionados del grupo que consiste de una treonina en la posición 31, una metionina en la posición 34, una metionina en la posición 100, y una valina en la posición 106.

103'

20. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 19, caracterizado además porque los residuos seleccionados del grupo que consiste de una treonina en la posición 31, una metionina en la posición 34, una metionina en la posición 100, y una valina en la posición 106 se cambian para los
- 5 diferentes aminoácidos o se eliminan como sigue:

Treonina Pos. 31	Metionina Pos. 34	Metionina Pos. 100	Valina Pos. 106
T	S	L	V
T	E	L	V
T	V	L	V
T	V	L	I
T	S	L	I
T	E	L	I
T	Q	L	V
S	S	L	I
S	S	L	V
S	V	L	V

21. Un anticuerpo monoclonal aislado, o fragmento de unión al antígeno de éste, caracterizado porque comprende la región variable de cadena ligera de la sec. con núm. de ident.: 25, y la región variable de cadena pesada de
- 10 la sec. con núm. de ident.: 26.

22. El anticuerpo aislado de la reivindicación 21, caracterizado además porque las regiones de cadena ligera variable y cadena pesada se fusionan a las regiones constantes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera correspondientes y una región de articulación de cadena pesada.

- 15 23. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende el anticuerpo de la reivindicación 21.

104

24. El anticuerpo aislado de la reivindicación 22, que comprende, además, las variantes de la sec. con núm. de ident.: 25 y la sec. con núm. de ident.: 26, caracterizado además porque tales variantes retienen la capacidad de unirse a un epítopo de IL-13 (sec. con núm. de ident.: 1), caracterizado además porque el epítopo comprende una arginina en la posición 10 y una arginina en la posición 107 de la sec. con núm. de ident.: 1.

25. El anticuerpo aislado de la reivindicación 24, caracterizado además porque el epítopo comprende, además, un residuo seleccionado del grupo que consiste de: una serina en la posición 6, una isoleucina en la posición 13, un ácido glutámico en la posición 14, una leucina en la posición 100, una lisina en la posición 103, una fenilalanina en la posición 106, y un ácido glutámico en la posición 108 de la sec. con núm. de ident.: 1.

26. Un anticuerpo recombinante humanizado aislado que comprende una región variable de cadena pesada humanizada y una región variable de cadena ligera humanizada caracterizado porque la región variable de cadena pesada humanizada comprende tres regiones determinantes complementarias (CDR) de la sec. con núm. de ident.: 3 de cadena pesada y una región marco humana de una cadena pesada del anticuerpo aceptor humano, y la región variable de cadena ligera humanizada comprende tres regiones determinantes complementarias de sec. con núm. de ident.: 2 de cadena ligera y una región marco humana de una cadena ligera del anticuerpo aceptor humano, caracterizado porque el anticuerpo humanizado reduce la unión de IL-13 a un receptor IL-13 en las células THP-1 medido por la señalización de STAT6.

27. El anticuerpo de la reivindicación 26, caracterizado además porque el anticuerpo modula, sustancialmente, al menos una actividad del polipéptido IL-13 seleccionada del grupo que consiste de (a) inhibe la unión de la IL-13 humana silvestre recombinante humana al receptor IL-13 alfa 1 humano o un receptor IL-13

103

animal adecuado medido por la fosforilación de Stat-6 inducida por la IL-13 silvestre, (b) inhibe la unión de la IL-13 humana silvestre recombinante humana al receptor IL-13 alfa 2 humano o un receptor IL-13 animal adecuado, (c) disminuye los números de células de eosinófilos, linfocitos, macrófago y neutrófilo en los grupos de ratas

- 5 tratadas con el anticuerpo en comparación con los animales sensibilizados con OVA tratados con solución salina y (d) disminuye la resistencia de las vías respiratorias en animales desafiados químicamente en comparación con un agente control no específico.

28. El anticuerpo de la reivindicación 26, caracterizado además
10 porque comprende CDR de la región variable de cadena pesada seleccionadas del grupo que consiste de sec. con núm. de ident.: 3, 20 y 26.

29. El anticuerpo de la reivindicación 26, caracterizado además porque comprende CDR de la región variable de cadena ligera seleccionadas del grupo que consiste de sec. con núm. de ident.: 2, 9, 14 y 26.

15 30. Un fragmento de anticuerpo de unión al antígeno inmunoespecífico para la IL-13 humana el cual se une a una variante de IL-13 R110Q con una K_D medida por resonancia del plasmón de superficie (Biacore) de menos de 250 pM ($0,250 \times 10^{-9}$ M) y evita la unión de la IL-13 a IL-13R2alfa1 en células THP-1 medido por señalización de STAT6 y el anticuerpo se puede
20 mostrar para contactar la IL-13 humana en los residuos de hélice A que comprenden Arg10, Ile13, Glu14 y residuos de hélice D que comprenden Lys103, Phe106, Arg107, Glu108, caracterizado porque las distancias interatómicas no exceden 4,0 Å.

31. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo IL-13 de
25 la reivindicación 1.

32. Un vector de ácido nucleico que comprende un ácido nucleico aislado de conformidad con la reivindicación 31.

106

33. Una célula huésped procariótica o eucariótica que comprende un ácido nucleico aislado de conformidad con la reivindicación 31.

34. Una composición que comprende un anticuerpo IL-13 de la reivindicación 1 y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

5 35. Un método para diagnosticar o tratar una afección relacionada con lIL-13 en una célula, órgano o animal, el método comprende poner en contacto o administrar una composición que comprende una cantidad efectiva de un anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1.

10 36. El método de la reivindicación 35, caracterizado además porque la afección relacionada con la IL-13 es asma.

37. Un método de conformidad con la reivindicación 35, caracterizado además porque la cantidad efectiva es 0,001-50 mg/kilogramo de las células, tejido, órgano o animal.

15 38. Un método de conformidad con la reivindicación 35, caracterizado además porque el contacto o la administración es por al menos un modo seleccionado de parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intrarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavidad, intracelial, intracelebelar, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrica, intrahepática, intramiocárdica, intraosteal, intrapélvica,
20 intrapericardiaca, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravesical, intralesional, bolos, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, o transdérmica.

25 39. Un método de conformidad con la reivindicación 35, que comprende, además, administrar antes, concurrentemente o después de (a) poner en contacto o administrar al menos una composición que comprende una cantidad efectiva de al menos un compuesto o polipéptido seleccionado de una etiqueta o

107

reportero detectable, un fármaco anti-infeccioso, un fármaco del sistema cardiovascular (CV), un fármaco del sistema nervioso central (CNS), un fármaco del sistema nervioso autónomo (ANS), un fármaco del tracto respiratorio, un fármaco del tracto gastrointestinal (GI), una hormona o fármaco estimulante de hormonas, un
 5 fármaco para el balance fluido o de electrolitos, un fármaco hematológico, un antineoplásico, un fármaco inmunomodulador, un producto nutricional, una citocina, o un antagonista de citocina.

40. Un dispositivo médico, caracterizado porque el dispositivo es adecuado para promover el contacto del anticuerpo IL-13 de la reivindicación 1 con
 10 una célula, tejido, u órgano de un paciente necesitado de éste.

41. Un artículo de fabricación para uso farmacéutico o de diagnóstico humano, caracterizado porque comprende material de empaque y un contenedor que comprende una solución o una forma liofilizada de al menos un anticuerpo IL-13 de conformidad con la reivindicación 1.

15 42. El artículo de fabricación de la reivindicación 41, caracterizado además porque el contenedor es un componente de un dispositivo o sistema de suministro parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intrarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavidad, intracelial, intracelebelar, intracerebroventricular, intracólico, intracervical,
 20 intragástrica, intrahepática, intramiocárdica, intraosteal, intrapélvica, intrapericardiaca, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravesical, intralesional, bolos, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, o transdérmica.

25 43. Un método para producir al menos un anticuerpo IL-13 de mamífero aislado de conformidad con la reivindicación 1, el método comprende

proporcionar una célula huésped o animal transgénico o planta transgénica o célula vegetal capaz de expresar el anticuerpo en cantidades recuperables.

44. Un anticuerpo IL-13 que se produce por un método de conformidad con la reivindicación 43.

5 45. U método de inmunizar un huésped por medio del uso de un epítipo IL-13, el método comprende residuos de hélice A (Arg10, Ile13, Glu14) y residuos de hélice D (Lys103, Phe106, Arg107, Glu108) o un péptido mimético de estos.

10 46. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-22 y 24-30.

47. El uso de un anticuerpo anti-IL-13 de cualquiera de las reivindicaciones 1-22 y 24-30 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno mediado por la IL-13.

Fig. 1

	1		60
Sec. con núm. de ident.: 2 C863 LC	(1)	DVQITQSPSYLAASPGETITLNC	CRASKSISKYLAWYQEKPGKTNKLLIYSGSTLQSGIPS
Sec. con núm. de ident.: 9 VB L6	(1)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	CRASKSISKYLAWYQKPGQAPRLIYSGSTLQSGIPA
Sec. con núm. de ident.: 6 VB L18	(1)	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC	CRASKSISKYLAWYQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPS
Sec. con núm. de ident.: 5 VB O12	(1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	CRASKSISKYLAWYQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPS
Sec. con núm. de ident.: 11 VB L12	(1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC	CRASKSISKYLAWYQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPS

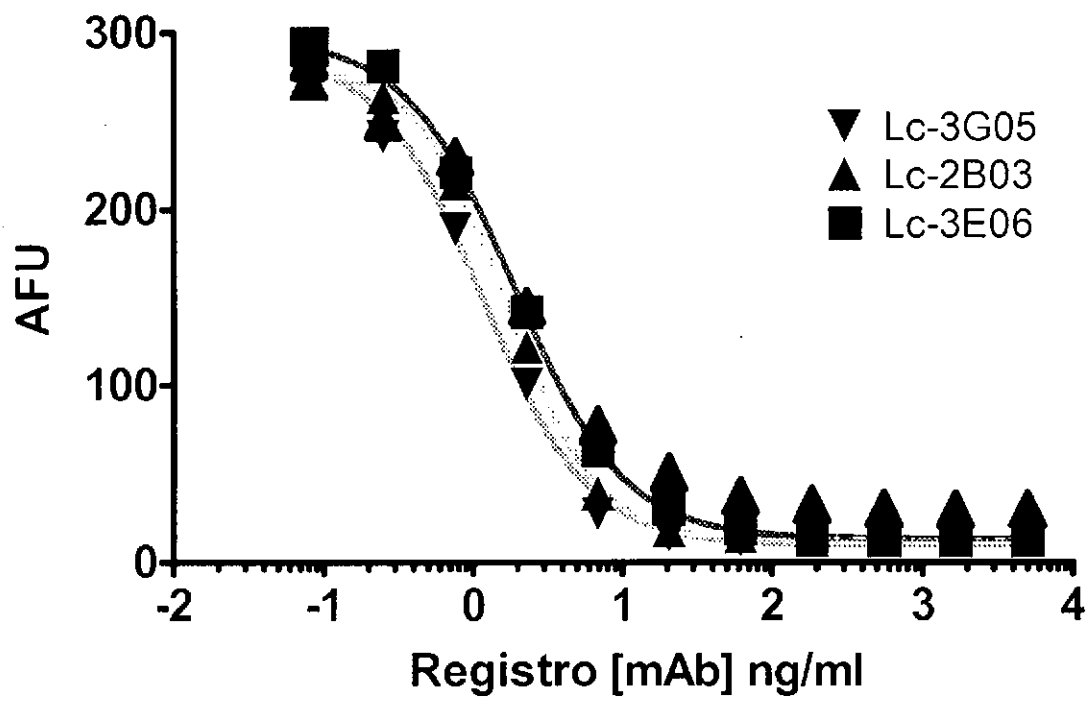
	61		107
Sec. con núm. de ident.: 2 C863 LC	(61)	RFSGSGSGTDFTLT	ISSLEPEDFAMYFCQQHNEYPYTEGGGTKLEIK
Sec. con núm. de ident.: 9 VB L6	(61)	RFSGSGSGTDFTLT	ISSLEPEDFAVYYCQQHNEYPYTEGGGTKLEIK
Sec. con núm. de ident.: 6 VB L18	(61)	RFSGSGSGTDFTLT	ISSLPEDFATYYCQQHNEYPYTEGGGTKVEIK
Sec. con núm. de ident.: 5 VB O12	(61)	RFSGSGSGTDFTLT	ISSLPEDFATYYCQQHNEYPYTEGGGTKLEIK
Sec. con núm. de ident.: 11 VB L12	(61)	RFSGSGSGTEFTLT	ISSLPDDFATYYCQQHNEYPYTEGGGTRLEIK

	1		60
Sec. con núm. de ident.: 3 C863 HC	(1)	QVTLKESGPGILQPSQTL	SLTCSFSGFSLSTYGMGVGNIRQPSGKGLEWLAHIWDDVKR
Sec. con núm. de ident.: 20 VB 2-26	(1)	QVTLKESGPVLVKPTETL	TLTCTVSGFSLSTYGMGVGNIRQPPGKALEWLAHIWDDVKR
Sec. con núm. de ident.: 21 VB 2-05	(1)	QITLKESGPTLVKPTQTL	TLTCTFSGFSLSTYGMGVGNIRQPPGKALEWLAHIWDDVKR

	61		121
Sec. con núm. de ident.: 3 C863 HC	(61)	YNPALKSRLTISKDTSGS	QVFLKIASVDTS
Sec. con núm. de ident.: 20 VB 2-26	(61)	YNPALKSRLTISKDTSKS	QVFLTMTNMDPVD
Sec. con núm. de ident.: 21 VB 2-05	(61)	YNPALKSRLTITKDTSKN	QVFLTMTNMDPVD

110

Fig. 2



111

Figura 3. Sistemas de numeración de Kabat y Chothia y definiciones de HVL y CDR para los anticuerpos representativos.

Secuencias de cadena ligera

VL M1295 Sec. con núm. de ident.: 25	VL-HFAL62 Sec. con núm. de ident.: 9	VL-c836 Sec. con núm. de ident.: 2	Numeración de la secuencias	Kabat	Chothia	CDR (sombreada)	HVL (sombreada)
E	E	D	1	1	1		
I	I	V	2	2	2		
V	V	Q	3	3	3		
L	L	I	4	4	4		
T	T	T	5	5	5		
Q	Q	Q	6	6	6		
S	S	S	7	7	7		
P	P	P	8	8	8		
A	A	S	9	9	9		
T	T	Y	10	10	10		
L	L	L	11	11	11		
S	S	A	12	12	12		
L	L	A	13	13	13		
S	S	S	14	14	14		
P	P	P	15	15	15		
G	G	G	16	16	16		
E	E	E	17	17	17		
R	R	T	18	18	18		
A	A	I	19	19	19		
T	T	T	20	20	20		
L	L	L	21	21	21		
S	S	N	22	22	22		
C	C	C	23	23	23		
R	R	R	24	24	24		

113

VL M1295 Sec. con núm. de ident.: 25	VL-HFAL62 Sec. con núm. de ident.: 9	VL-c836 Sec. con núm. de ident.: 2	Numeración de la secuencias	Kabat	Chothia	CDR (sombreada)	HVL (sombreada)
A	A	A	25	25	25		
S	S	S	26	26	26		
K	K	K	27	27	27		
S	S	S	28	28	28		
I	I	I	29	29	29		
S	S	S	30	30	30		
K	K	K	31	31	31		
Y	Y	Y	32	32	32		
L	L	L	33	33	33		
A	A	A	34	34	34		
W	W	W	35	35	35		
Y	Y	Y	36	36	36		
Q	Q	Q	37	37	37		
Q	Q	E	38	38	38		
K	K	K	39	39	39		
P	P	P	40	40	40		
G	G	G	41	41	41		
Q	Q	K	42	42	42		
A	A	T	43	43	43		
P	P	N	44	44	44		
R	R	K	45	45	45		
L	L	L	46	46	46		
L	L	L	47	47	47		
I	I	I	48	48	48		
Y	Y	Y	49	49	49		
S	S	S	50	50	50		
G	G	G	51	51	51		

114

VL-M1295 Sec. con núm. de ident.: 25	VL-HFAL62 Sec. con núm. de ident.: 9	VL-c836 Sec. con núm. de ident.: 2	Numeración de la secuencias	Kabat	Chothia	CDR (sombreada)	HVL (sombreada)
S	S	S	52	52	52		
T	T	T	53	53	53		
L	L	L	54	54	54		
Q	Q	Q	55	55	55		
S	S	S	56	56	56		
G	G	G	57	57	57		
I	I	I	58	58	58		
P	P	P	59	59	59		
A	A	S	60	60	60		
R	R	R	61	61	61		
F	F	F	62	62	62		
S	S	S	63	63	63		
G	G	G	64	64	64		
S	S	S	65	65	65		
G	G	G	66	66	66		
S	S	S	67	67	67		
G	G	G	68	68	68		
T	T	T	69	69	69		
D	D	D	70	70	70		
F	F	F	71	71	71		
T	T	T	72	72	72		
L	L	L	73	73	73		
T	T	T	74	74	74		
I	I	I	75	75	75		
S	S	S	76	76	76		
S	S	S	77	77	77		
L	L	L	78	78	78		

VL M1295 Sec. con núm. de ident.: 25	VL-HFAL62 Sec. con núm. de ident.: 9	VL-c836 Sec. con núm. de ident.: 2	Numeración de la secuencias	Kabat	Chothia	CDR (sombreada)	HVL (sombreada)
E	E	E	79	79	79		
P	P	P	80	80	80		
E	E	E	81	81	81		
D	D	D	82	82	82		
F	F	F	83	83	83		
A	A	A	84	84	84		
V	V	M	85	85	85		
Y	Y	Y	86	86	86		
Y	Y	F	87	87	87		
C	C	C	88	88	88		
Q	Q	Q	89	89	89		
Q	Q	Q	90	90	90		
H	H	H	91	91	91		
D	N	N	92	92	92		
¹	E	E	93	93	93		
Y	Y	Y	94	94	94		
P	P	P	95	95	95		
Y	Y	Y	96	96	96		
T	T	T	97	97	97		
F	F	F	98	98	98		
G	G	G	99	99	99		
Q	Q	G	100	100	100		
G	G	G	101	101	101		
T	T	T	102	102	102		

¹ Esta posición se eliminó en la cadena ligera M1295. Como tal, la numeración de la secuencias para M1295 se ajusta por un residuo. Por ejemplo, el próximo residuo (Tyr) es el número 93 en M1295, pero es el número 94 en las secuencias de cadena ligera VL-62 y c836. Este ajuste en la numeración se refleja en el listado de secuencia.

115

VL-M1295 Sec. con núm. de ident.: 25	VL-HFAL62 Sec. con núm. de ident.: 9	VL-c836 Sec. con núm. de ident.: 2	Numeración de la secuencias	Kabat	Chothia	CDR (sombreada)	HVL (sombreada)
K	K	K	103	103	103		
L	L	L	104	104	104		
E	E	E	105	105	105		
I	I	I	106	106	106		
K	K	K	107	107	107		
R	R	R	108	108	108		

Secuencias de cadena pesada

VH-M1295 Sec. con núm. de ident.: 26	VH-62 Sec. con núm. de ident.: 20	VH-c836 Sec. con núm. de ident.: 3	Numeración de la secuencias	Kabat	Chothia	Sitio de unión (sombreado)	
Q	Q	Q	1	1	1	CDR	HVL
V	V	V	2	2	2		
T	T	T	3	3	3		
L	L	L	4	4	4		
K	K	K	5	5	5		
E	E	E	6	6	6		
S	S	S	7	7	7		
G	G	G	8	8	8		
P	P	P	9	9	9		
V	V	G	10	10	10		
L	L	I	11	11	11		
V	V	L	12	12	12		
K	K	Q	13	13	13		
P	P	P	14	14	14		
T	T	S	15	15	15		

112

VH-M1295 Sec. con núm. de ident.: 26	VH-62 Sec. con núm. de ident.: 20	VH-c836 Sec. con núm. de ident.: 3	Numeración de la secuencias	Kabat	Chothia	Sitio de unión (sombreado)	
						CDR	HVL
E	E	Q	16	16	16		
T	T	T	17	17	17		
L	L	L	18	18	18		
T	T	S	19	19	19		
L	L	L	20	20	20		
T	T	T	21	21	21		
C	C	C	22	22	22		
T	T	S	23	23	23		
V	V	F	24	24	24		
S	S	S	25	25	25		
G	G	G	26	26	26		
F	F	F	27	27	27		
S	S	S	28	28	28		
L	L	L	29	29	29		
S	S	S	30	30	30		
T	T	T	31	31	31		
Y	Y	Y	32	32	a		
G	G	G	33	33	b		
V	M	M	34	34	32		
G	G	G	35	35	33		
V	V	V	36	a	34		
G	G	G	37	b	35		
W	W	W	38	36	36		
I	I	I	39	37	37		
R	R	R	40	38	38		
Q	Q	Q	41	39	39		

VH-M1295 Sec. con núm. de ident.: 26	VH-62 Sec. con núm. de ident.: 20	VH-c836 Sec. con núm. de ident.: 3	Numeración de la secuencias	Kabat	Chothia	Sitio de unión (sombreado)	
						CDR	HVL
P	P	P	42	40	40		
P	P	S	43	41	41		
G	G	G	44	42	42		
K	K	K	45	43	43		
A	A	G	46	44	44		
L	L	L	47	45	45		
E	E	E	48	46	46		
W	W	W	49	47	47		
L	L	L	50	48	48		
A	A	A	51	49	49		
H	H	H	52	50	50		
I	I	I	53	51	51		
W	W	W	54	52	52		
W	W	W	55	53	53		
D	D	D	56	54	54		
D	D	D	57	55	55		
V	V	V	58	56	56		
K	K	K	59	57	57		
R	R	R	60	58	58		
Y	Y	Y	61	59	59		
N	N	N	62	60	60		
P	P	P	63	61	61		
A	A	A	64	62	62		
L	L	L	65	63	63		
K	K	K	66	64	64		
S	S	S	67	65	65		

119

VH-M1295 Sec. con núm. de ident.: 26	VH-62 Sec. con núm. de ident.: 20	VH-c836 Sec. con núm. de ident.: 3	Numeración de la secuencias	Kabat	Chothia	Sitio de unión (sombreado)	
						CDR	HVL
R	R	R	68	66	66		
L	L	L	69	67	67		
T	T	T	70	68	68		
I	I	I	71	69	69		
S	S	S	72	70	70		
K	K	K	73	71	71		
D	D	D	74	72	72		
T	T	T	75	73	73		
S	S	S	76	74	74		
K	K	G	77	75	75		
S	S	S	78	76	76		
Q	Q	Q	79	77	77		
V	V	V	80	78	78		
V	V	F	81	79	79		
L	L	L	82	80	80		
T	T	K	83	81	81		
M	M	I	84	82	82		
T	T	A	85	a	a		
N	N	S	86	b	b		
M	M	V	87	c	c		
D	D	D	88	83	83		
P	P	T	89	84	84		
V	V	S	90	85	85		
D	D	D	91	86	86		
T	T	T	92	87	87		
A	A	A	93	88	88		

120

VH-M1295 Sec. con núm. de ident.: 26	VH-62 Sec. con núm. de ident.: 20	VH-c836 Sec. con núm. de ident.: 3	Numeración de la secuencias	Kabat	Chothia	Sitio de unión (sombreado)	
						CDR	HVL
T	T	T	94	89	89		
Y	Y	Y	95	90	90		
Y	Y	Y	96	91	91		
C	C	C	97	92	92		
A	A	A	98	93	93		
R	R	R	99	94	94		
L	M	M	100	95	95		
G	G	G	101	96	96		
S	S	S	102	97	97		
D	D	D	103	98	98		
Y	Y	Y	104	99	99		
D	D	D	105	100	100		
V	V	V	106	a	a		
W	W	W	107	b	b		
F	F	F	108	c	c		
D	D	D	109	101	101		
Y	Y	Y	110	102	102		
W	W	W	111	103	103		
G	G	G	112	104	104		
Q	Q	Q	113	105	105		
G	G	G	114	106	106		
T	T	T	115	107	107		
L	L	L	116	108	108		
V	V	V	117	109	109		
T	T	T	118	110	110		
V	V	V	119	111	111		

						Sitio de unión (sombreado)	
VH-M1295 Sec. con núm. de ident.: 26	VH-62 Sec. con núm. de ident.: 20	VH-c836 Sec. con núm. de ident.: 3	Numeración de la secuencias	Kabat	Chothia	CDR	HVL
S	S	S	120	112	112		
A	A	A	121	113	113		
S	S	S	122	114	114		

121

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CENTOCOR ORTHO BIOTECH INC.

SWANSON, Ronald V.

CHI, Ellen

RAGHUNATHAN, Gopalan

ZHAO, Shanrong

FRANSSON, Johan

CORDIER, Wendy

ALMAGRO, Juan C.

HYUN, Linus

GILES-KOMAR, Jill

O'NEIL, Karyn T.

CARTON, Jill M.

ZHOU, Hong Mimi

TEPLYAKOV, Alexey V.

FENG, Yiqing

<120> ANTICUERPOS ANTI-IL-13 MODIFICADOS, COMPOSICIONES, MÉTODOS Y
USOS

<130> CEN5229WOPCT

<140> Desconocido

<141> Herewith

<150> 61/090,472

<151> 2008-08-20

122

<150> 61/097,232

<151> 2008-09-16

<160> 29

<170> PatentIn. versión 3.5

<210> 1

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> NOMBRE/CLAVE: VARIANTE

<222> UBICACIÓN: 110

<223> OTRA INFORMACIÓN: Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 1

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

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

123

Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala Leu Glu

35

40

45

Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr Gln Arg

50

55

60

Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln Phe Ser

65

70

75

80

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

85

90

95

Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Xaa Phe Asn

100

105

110

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

124

<221> UNIÓN

<222> (24)..(34)

<223> CDR1

<220>

<221> UNIÓN

<222> (50)..(56)

<223> CDR2

<220>

<221> UNIÓN

<222> (89)..(97)

<223> CDR3

<400> 2

Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Ala Ala Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Thr Ile Thr Leu Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile

35 40 45

125

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Tyr

85

90

95

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

100

105

108

<210> 3

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> UNIÓN

<222> (26)..(37)

<223> CDR1

<220>

126

<221> UNIÓN

<222> (52)..(67)

<223> CDR2

<220>

<221> UNIÓN

<222> (100)..(110)

<223> CDR3

<400> 3

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

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

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

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

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Gly Ser Gln Val

127

65

70

75

80

Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ser Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

85

90

95

Cys Ala Arg Met Gly Ser Asp Tyr Asp Val Trp Phe Asp Tyr Trp Gly

100

105

110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115

120

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humanizada

<220>

<221> UNIÓN

<222> (24)..(34)

<223> CDR1

128

<220>

<221> UNIÓN

<222> (50)..(56)

<223> CDR2

<220>

<221> UNIÓN

<222> (89)..(97)

<223> CDR3

<400> 4

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

129

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

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

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

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de inmunoglobulina humanizada

<220>

<221> UNIÓN

<222> (24)..(34)

<223> CDR1

<220>

130

<221> UNIÓN

<222> (50)..(56)

<223> CDR2

<220>

<221> UNIÓN

<222> (89)..(97)

<223> CDR3

<400> 5

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

131

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio variable de inmunoglobulina humanizada

<220>

<221> UNIÓN

<222> (24)..(34)

<223> CDR1

<220>

<221> UNIÓN

<222> (50)..(56)

132

<223> CDR2

<220>

<221> UNIÓN

<222> (89)..(97)

<223> CDR3

<400> 6

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

133

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Dominio variable de inmunoglobulina humanizada

<220>

<221> UNIÓN

<222> (24) .. (34)

<223> CDR1

<220>

<221> UNIÓN

<222> (50) .. (56)

<223> CDR2

134

<220>

<221> UNIÓN

<222> (89)..(97)

<223> CDR3

<400> 7

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Tyr

135

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Dominio variable de inmunoglobulina humanizada

<220>

<221> UNIÓN

<222> (24)..(34)

<223> CDR1

<220>

<221> UNIÓN

<222> (50)..(56)

<223> CDR2

<220>

<221> UNIÓN

136

<222> (89)..(97)

<223> CDR3

<400> 8

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Tyr

85 90 95

137

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Dominio variable de inmunoglobulina humanizada

<220>

<221> UNIÓN

<222> (24)..(34)

<223> CDR1

<220>

<221> UNIÓN

<222> (50)..(56)

<223> CDR2

<220>

<221> UNIÓN

<222> (89)..(97)

<223> CDR3

138

<400> 9

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

139

0)

100

105

108

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Dominio variable de inmunoglobulina humanizada

<220>

<221> UNIÓN

<222> (24) .. (34)

<223> CDR1

<220>

<221> UNIÓN

<222> (50) .. (56)

<223> CDR2

<220>

<221> UNIÓN

<222> (89) .. (97)

<223> CDR3

<400> 10

140

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

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

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

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

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

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

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

141

<210> 11
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región variable de inmunoglobulina humanizada

<220>
<221> UNIÓN
<222> (24)..(34)
<223> CDR1

<220>
<221> UNIÓN
<222> (50)..(56)
<223> CDR2

<220>
<221> UNIÓN
<222> (89)..(97)
<223> CDR3

<400> 11

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

742

1 5 10 15

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

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

<210> 12

143

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de inmunoglobulina humanizada

<220>

<221> UNIÓN

<222> (24)..(34)

<223> CDR1

<220>

<221> UNIÓN

<222> (50)..(56)

<223> CDR2

<220>

<221> UNIÓN

<222> (89)..(97)

<223> CDR3

<400> 12

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

144

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr

20

25

30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35

40

45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 13

<211> 107

<212> PRT

145

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de inmunoglobulina humanizada

<220>

<221> UNIÓN

<222> (24)..(34)

<223> CDR1

<220>

<221> UNIÓN

<222> (50)..(56)

<223> CDR2

<220>

<221> UNIÓN

<222> (89)..(97)

<223> CDR3

<400> 13

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr

146

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 14

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Región variable de inmunoglobulina humanizada

<220>

<221> UNIÓN

<222> (24)..(34)

<223> CDR1

<220>

<221> UNIÓN

<222> (50)..(56)

<223> CDR2

<220>

<221> UNIÓN

<222> (89)..(97)

<223> CDR3

<400> 14

Ala Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Phe Ser Ala Ser Thr Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

148

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Cys Leu Gln Ser

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 15

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio variable de inmunoglobulina humanizada

149

<220>

<221> UNIÓN

<222> (24) .. (34)

<223> CDR1

<220>

<221> UNIÓN

<222> (50) .. (56)

<223> CDR2

<220>

<221> UNIÓN

<222> (89) .. (97)

<223> CDR3

<400> 15

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

150

35

40

45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de inmunoglobulina humanizada

151

<220>

<221> UNIÓN

<222> (24)..(34)

<223> CDR1

<220>

<221> UNIÓN

<222> (50)..(56)

<223> CDR2

<220>

<221> UNIÓN

<222> (89)..(97)

<223> CDR3

<400> 16

Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys His Leu Ile

35 40 45

152

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 17

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de inmunoglobulina humanizada

<220>

<221> UNIÓN

153

<222> (24)..(34)

<223> CDR1

<220>

<221> UNIÓN

<222> (50)..(56)

<223> CDR2

<220>

<221> UNIÓN

<222> (89)..(97)

<223> CDR3

<400> 17

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

154

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 18

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de inmunoglobulina humanizada

<220>

<221> UNIÓN

<222> (24)..(34)

<223> CDR1

155

<220>

<221> UNIÓN

<222> (50)..(56)

<223> CDR2

<220>

<221> UNIÓN

<222> (89)..(97)

<223> CDR3

<400> 18

Val Ile Trp Met Thr Gln Ser Pro Ser Leu Leu Ser Ala Ser Thr Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

156

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Cys Leu Gln Ser
65 70 75 80

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

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

<210> 19

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio variable de inmunoglobulina humanizada

<220>

<221> UNIÓN

<222> (26)..(37)

<223> CDR1

<220>

157

<221> UNIÓN

<222> (52)..(67)

<223> CDR2

<220>

<221> UNIÓN

<222> (100)..(110)

<223> CDR3

<400> 19

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

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr

20 25 30

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu

35 40 45

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

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val

15%

65

70

75

80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

85

90

95

Cys Ala Arg Met Gly Ser Asp Tyr Asp Val Trp Phe Asp Tyr Trp Gly

100

105

110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 20

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio variable de inmunoglobulina humanizada

<220>

<221> UNIÓN

<222> (26) .. (37)

<223> CDR1

159

<220>

<221> UNIÓN

<222> (52)..(67)

<223> CDR2

<220>

<221> UNIÓN

<222> (100)..(110)

<223> CDR3

<400> 20

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

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr

20 25 30

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu

35 40 45

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

50 55 60

160

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

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

Cys Ala Arg Met Gly Ser Asp Tyr Asp Val Trp Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de inmunoglobulina humanizada

<220>

<221> UNIÓN

16.7

<222> (26)..(37)

<223> CDR1

<220>

<221> UNIÓN

<222> (52)..(67)

<223> CDR2

<220>

<221> UNIÓN

<222> (100)..(110)

<223> CDR3

<400> 21

Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln

1

5

10

15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr

20

25

30

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu

35

40

45

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

162

50

55

60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val

65

70

75

80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

85

90

95

Cys Ala His Met Gly Ser Asp Tyr Asp Val Trp Phe Asp Tyr Trp Gly

100

105

110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 22

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de inmunoglobulina humanizada

163

<220>

<221> UNIÓN

<222> (26)..(37)

<223> CDR1

<220>

<221> UNIÓN

<222> (52)..(67)

<223> CDR2

<220>

<221> UNIÓN

<222> (100)..(110)

<223> CDR3

<400> 22

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr

20 25 30

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

16.4

Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr Asn Pro Ala

50

55

60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65

70

75

80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85

90

95

Cys Ala Arg Met Gly Ser Asp Tyr Asp Val Trp Phe Asp Tyr Trp Gly

100

105

110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 23

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de inmunoglobulina humanizada

165

<220>

<221> UNIÓN

<222> (26)..(37)

<223> CDR1

<220>

<221> UNIÓN

<222> (52)..(67)

<223> CDR2

<220>

<221> UNIÓN

<222> (100)..(110)

<223> CDR3

<400> 23

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Asp

1

5

10

15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr

20

25

30

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

765

35

40

45

Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr Asn Pro Ala

50

55

60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65

70

75

80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Val Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85

90

95

Cys Ala Arg Met Gly Ser Asp Tyr Asp Val Trp Phe Asp Tyr Trp Gly

100

105

110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 24

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

167

<220>

<223> Región variable de inmunoglobulina humanizada

<220>

<221> UNIÓN

<222> (26) .. (37)

<223> CDR1

<220>

<221> UNIÓN

<222> (52) .. (67)

<223> CDR2

<220>

<221> UNIÓN

<222> (100) .. (110)

<223> CDR3

<400> 24

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr

20 25 30

168

Gly Met Gly Val Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35

40

45

Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr Asn Pro Ala

50

55

60

Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu

65

70

75

80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85

90

95

Cys Ala Arg Met Gly Ser Asp Tyr Asp Val Trp Phe Asp Tyr Trp Gly

100

105

110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 25

<211> 106

<212> PRT

169

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Humanized antibody light chain

<220>

<221> UNIÓN

<222> (24)..(34)

<223> CDR1

<220>

<221> UNIÓN

<222> (50)..(56)

<223> CDR2

<220>

<221> UNIÓN

<222> (89)..(97)

<223> CDR3

<400> 25

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr

178

30

45

60

80

95

108

<213> Secuencia artificial

121

<220>

<223> Cadena pesada de anticuerpo humanizado

<220>

<221> UNIÓN

<222> (26)..(37)

<223> CDR1

<220>

<221> UNIÓN

<222> (52)..(67)

<223> CDR2

<220>

<221> UNIÓN

<222> (100)..(110)

<223> CDR3

<400> 26

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

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr

20 25 30

172

Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu

35

40

45

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

50

55

60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val

65

70

75

80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

85

90

95

Cys Ala Arg Leu Gly Ser Asp Tyr Asp Val Trp Phe Asp Tyr Trp Gly

100

105

110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 27

<211> 107

<212> PRT

173

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> NOMBRE/CLAVE: VARIANTE

<222> UBICACIÓN: 38, 54, 91, 92, 93, 94

<223> OTRA INFORMACIÓN: Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 27

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Xaa Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Xaa Gln Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

174

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 28

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> NOMBRE/CLAVE: VARIANTE

<222> UBICACIÓN: 31, 34, 100, 106

<223> OTRA INFORMACIÓN: Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 28

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

1

5

10

15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Xaa Tyr

20

25

30

175

Gly Xaa Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu

35

40

45

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

50

55

60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val

65

70

75

80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

85

90

95

Cys Ala Arg Xaa Gly Ser Asp Tyr Asp Xaa Trp Phe Asp Tyr Trp Gly

100

105

110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

176

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> NOMBRE/CLAVE: VARIANTE

<222> UBICACIÓN: 3, 4, 5, 6

<223> OTRA INFORMACIÓN: Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 29

Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Tyr Thr

1

5

122



- (51) International Patent Classification:
A61K 39/395 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2009/053425
- (22) International Filing Date:
11 August 2009 (11.08.2009)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/090,472 20 August 2008 (20.08.2008) US
61/097,232 16 September 2008 (16.09.2008) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): CEN-
TOCOR ORTHO BIOTECH INC. [US/US]; 800/850
Ridgeview Drive, Horsham, PA 19044 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): SWANSON,
Ronald, V. [US/US]; 3210 Merryfield Row, San Diego,
CA 92121 (US). CHI, Ellen [US/US]; 3210 Merryfield
Row, San Diego, CA 92121 (US). RAGHUNATHAN,
Gopalan [US/US]; 3210 Merryfield Row, San Diego, CA
92121 (US). ZHAO, Shanrong [CN/US]; 3210 Merry-
field Row, San Diego, CA 92121 (US). FRANSSON, Jo-
han [SE/US]; 3210 Merryfield Row, San Diego, CA
92121 (US). CORDIER, Wendy [US/US]; 3210 Merry-
field Row, San Diego, CA 92121 (US). ALMAGRO,
Juan, C. [CU/US]; 145 King of Prussia Road, Radnor,
PA 19087 (US). HYUN, Linus [US/US]; 145 King of

Prussia Road, Radnor, PA 19087 (US). GILES-KO-
MAR, Jill [US/US]; 145 King of Prussia Road, Radnor,
PA 19087 (US). O'NEIL, Karyn, T. [US/US]; 145 King
of Prussia Road, Radnor, PA 19087 (US). CARTON,
Jill, M. [US/US]; 145 King of Prussia Road, Radnor, PA
19087 (US). ZHOU, Hong, Mimi [US/US]; 3210 Merry-
field Row, Dan Diego, CA 92121 (US). TEPLYAKOV,
Alexey, V. [US/US]; 145 King of Prussia Road, Radnor,
PA 19087 (US). FENG, Yiqing [US/US]; 13 Donna
Lane, Wayne, Pennsylvania (US).

- (74) Agents: JOHNSON, Phillip, S. et al.; Johnson & John-
son, One Johnson & Johnson Plaza, New Brunswick, NJ
08933 (US).

(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, CL, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, 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,

[Continued on next page]

(54) Title: ENGINEERED ANTI-IL-13 ANTIBODIES, COMPOSITIONS, METHODS AND USES

Fig. 1

```
SEQ ID 2 C863 LC (1) DVQITGSPSYLAASPGBITITLQKASKISKYLAHYQKFKGKTKLLIYSGSTLQSGIPPS
SEQ ID 9 VB L6 (1) EIVLTGSPATLSIAPGPRATLSCASKISKYLAHYQKFKGKTKLLIYSGSTLQSGIPPA
SEQ ID 6 VB L10 (1) AIGLTGSPSLASVGDRTITLQKASKISKYLAHYQKFKGKTKLLIYSGSTLQSGVPS
SEQ ID 5 VB 012 (1) DIQMTGSPSLASVGDRTITLQKASKISKYLAHYQKFKGKTKLLIYSGSTLQSGVPS
SEQ ID 11 VB L12 (1) DIQMTGSPSLASVGDRTITLQKASKISKYLAHYQKFKGKTKLLIYSGSTLQSGVPS

61 107
SEQ ID 2 C863 LC (61) RFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAMYPQOQHNEYPTTFGGGCKLEIK
SEQ ID 9 VB L6 (61) RFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAMYPQOQHNEYPTTFGGGCKLEIK
SEQ ID 6 VB L10 (61) RFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAMYPQOQHNEYPTTFGGGCKLEIK
SEQ ID 5 VB 012 (61) RFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAMYPQOQHNEYPTTFGGGCKLEIK
SEQ ID 11 VB L12 (61) RFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAMYPQOQHNEYPTTFGGGCKLEIK

1 50
SEQ ID 3 C863 HC (1) QVTLKESGPGILQPSQ7LSLTGSPFSLSTYGVGVNIRPPSKALEWLAHINWDDVKK
SEQ ID 20 VB 2-26 (1) QVTLKESGPGILQPSQ7LSLTGSPFSLSTYGVGVNIRPPSKALEWLAHINWDDVKK
SEQ ID 21 VB 2-05 (1) QVTLKESGPGILQPSQ7LSLTGSPFSLSTYGVGVNIRPPSKALEWLAHINWDDVKK

61 121
SEQ ID 3 C863 HC (61) ENPALKRLTISKDSGSGVFLKIASVDTSDIATTYCAHGGSDYDWFDTGGGGLVTVSA
SEQ ID 20 VB 2-26 (61) ENPALKRLTISKDSGSGVFLKIASVDTSDIATTYCAHGGSDYDWFDTGGGGLVTVSS
SEQ ID 21 VB 2-05 (61) ENPALKRLTISKDSGSGVFLKIASVDTSDIATTYCAHGGSDYDWFDTGGGGLVTVSS
```

(57) Abstract: The present invention relates to engineered antibodies immunospecific for human interleukin-13 (IL-13) protein or fragment thereof, as well as methods of making and using thereof, including therapeutic indications.



ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
 MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM,
 TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
 ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- without international search report and to be republished
 upon receipt of that report (Rule 48.2(g))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

JOHNSON, Philip, S.
Johnson & Johnson
One Johnson & Johnson Plaza
New Brunswick, NJ 08933
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 03 September 2009 (03.09.2009)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference CEN5229WOPCT	
International application No. PCT/US2009/053425	International filing date (day/month/year) 11 August 2009 (11.08.2009)

1. The following indications appeared on record concerning: ☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative		
Name and Address TEPLYAKOV, Alexey, V. 800/850 Ridgeview Drive Horsham, PA 19044 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: ☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence		
Name and Address TEPLYAKOV, Alexey, V. 145 King of Prussia Road Radnor, PA 19087 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to: ☒ the receiving Office ☐ the International Preliminary Examining Authority ☒ the International Searching Authority ☐ the designated Offices concerned ☐ the Authority(ies) specified for supplementary search ☐ the elected Offices concerned ☐ other:		

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 87 20	Authorized officer Mazoillier Auguste e-mail pt03.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 03
---	--

Form PCT/IB/306 (January 2009)

1/D6JEXPVD0

180



No. 11-019113- -00000-0000

Fecha: 2011-02-17 15:07:44 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 181

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTII

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
- ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
RODRIGUEZ D' ALEMAN DILIA MARIA
Apoderado(a) y/o Representante de
CENTOCOR ORTHO BIOTECH INC.

REFERENCIA	Radicación No.	11 019113
	Solicitud internacional	PCT/US2009/053425
	Fecha inicio fase nacional	20/03/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	

05770

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. Con respecto al resumen y de conformidad con lo dispuesto en el artículo 31 D. 486 en el cual se establece que el resumen consiste en una síntesis de la divulgación técnica contenida en la solicitud de patente, debe adecuar el resumen a lo dispuesto en dicha norma, teniendo en cuenta que el extracto permitirá precisar el objeto de la invención, sus elementos característicos y el campo de aplicación.

Anexo al presente requerimiento se sugieren los lineamientos principales para la presentación adecuada del resumen.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continúa en la página siguiente...



Continuación radicado No: 11 019113

183

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha
adpa11

31 MAR. 2011

ANEXO INFORMATIVO

Presentación

El resumen debe ser claro y tan conciso como lo permita la descripción. No debe exceder de 250 palabras, debiendo contener preferentemente de 50 a 150 palabras y puede incluir fórmulas químicas y matemáticas, cuadros o figuras, en tamaño 12x12.

Contenido

El resumen debe tratar esencialmente de lo que es nuevo y aporta la invención al estado de la técnica al que pertenece. De esta manera, si la naturaleza de la invención es la modificación de un aparato, o la presentación de un procedimiento, producto o compuesto, el resumen debe enfocarse hacia la descripción técnica de la modificación.

En el caso de que el documento de patente reivindique un producto, particularmente un compuesto o componente y también contenga un procedimiento o método de preparación, éste también debe ser incluido en el resumen.

En lo que concierne a los compuestos o composiciones químicas, el resumen debe contener la naturaleza química del compuesto o de la composición, así como el campo de aplicación. El resumen debe indicar la fórmula química que mejor caracterice la invención.

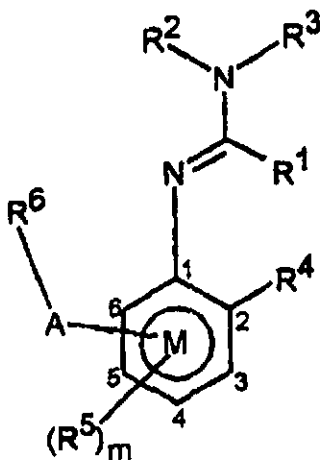
En lo que respecta a los procedimientos, el resumen debe explicar el tipo de reacción, los reactivos y las condiciones para llevar a cabo el procedimiento.

El resumen no debe contener declaraciones relativas a las ventajas asociadas a la invención.

Ejemplo:

Objeto de la Invención: Derivados de fenilamidina de fórmula (I) con aplicación como antifúngicos.

Características de la Invención: Compuestos fungicidas de fórmula (I) y sales donde: R1 es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, carbocíclico o heterocíclico cada uno de los cuales se encuentra sustituido; R2 y R3 son iguales o diferentes y se eligen entre: ciano, acilo, -ORa o -OSRa donde Ra es alquilo, alquenilo, alquinilo, carbocíclico o heterocíclico, o bien, R2 y R3 forman conjuntamente con el átomo al cual se unen un anillo que puede sustituirse por R4 que es alquilo, alquenilo, alquinilo, carbocíclico o heterocíclico y que pueden sustituirse por hidroxilo, mercapto, azido, nitro, halógeno, ciano, acilo. R5 es igual a la definición contemplada para R4, R6 es un anillo carbocíclico o heterocíclico opcionalmente sustituido y A es un grupo enlazante o AR6 y AR5 forman un anillo fusionado con el anillo de benceno M.

Figura característica:

Campo de aplicación: Producción de agentes antifúngicos con aplicación farmacéutica