06-129582

BT

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PCT

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

06-129582

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN

TITULO: ANTICUERPOS MONOCLONALES QUIMERICOS Y HUMANIZADOS CONTRA LA INTERLEUQUINA -13.

SOLICITANTE: GLAXO GROUP LIMITED.

DIRECCIÓN: Glaxo Wellcome House. Berkeley Avenue. Greenford. Middlesex UB6 ONN Inglaterra

APODERADO: J. IAN RAISBECK

BOGOTÁ 27 de diciembre de 2006

P2006/000280

OLARTERAISBECK

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-129582- -00000-0000
Fec: 2006-12-27 17:00:20 Dep: 2000 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTEYII
Cla: 570 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 429

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

(1) SOLICITUD DE:

[X] Patente de Invención. [ ] Patente de Modelo de Utilidad.

[X] Capítulo I. [ ] Capítulo II.

(2) SOLICITANTE (71)

Nombre: GLAXO GROUP LIMITED
Dirección: Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford, Middlesex UB6 ONN
Nacionalidad o Domicilio: BRITANICA
Lugar de Constitución: INGLATERRA
Teléfono: _____ Fax: _____
E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN
C.C. [ ] NIT [ ]
C.E. [ ] Otro [ ]
Cual _____
Número _____

(3) REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: J. IAN RAISBECK
Dirección: World Trade Center Torre A, Calle 100 No. 8A-37 Piso 10
Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799
E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN
C.C. [x] NIT [ ]
C.E. [ ] Otro [ ]
Cual _____
Número 79.376.996 Btá
TP 135.799

(4) INVENTOR (ES) (72)

Nombre: CLAIRE ASHMAN, MARTIN JOHN CASSIDY, JONATHAN HENRY ELLIS, TREVOR ANTHONY KENNETH WATTAM.
Dirección: Gunnels Wood Road, Stevenage, Hentfordshire SG12NY, Gran Bretaña.
Nacionalidad o Domicilio: BRITANICA

(5) PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/GB2005/002581 Fecha Junio 30, 2005

Publicación Internacional No. WO 2006/003407 Fecha Enero 12, 2006

(6) Título (54) ANTICUERPOS MONOCLONALES QUIMERICOS Y HUMANIZADOS CONTRA LA INTERLEUQUINA -13.

(7) Clasificación Internacional (51) C07K 16/00

(8) Prioridad

SI [X] N [ ]

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
GB	Julio 1, 2004	0414799.7
GB	Octubre 25, 2004	0423675.8

(9) Comprobante de pago No. 06 -97.312 **Fecha** Diciembre 19, 2006

(10) **ANEXOS**

- [x] 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.
- [x] Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple ver expediente No. 06-047.825.
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones.
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del 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 depósito del material biológico.
- [ ] Arte final 12 x 12.
- [ ] 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.
- [x] Otros. Búsqueda Internacional

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: J. IAN RAISBECK FIRMA:

C.C. 79.376.996 Btá T.P. 135.799

3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-129582- -00000-0000
Fec: 2006-12-27 17:00:20 Dep: 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTEYM
Sec: 376 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 429

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 97,312
FECHA : DICIEMBRE 19 DE 2006

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARTE RAISBECK	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	030-00110-6	41778697	18/12/2006	4,286,000.00

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

CANT.	NEMOTECNICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL : $	463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

Traducción oficial del Inglés por Marlén Neira Castro, resolución 2117 del Ministerio de Justicia de Colombia

APOSTILLA EN PODER DE REPRESENTACIÓN DE

GLAXO GROUP LIMITED

PODER DE REPRESENTACION

Bilingüe inglés- español otorgado en Brentford, Middlesex, Inglaterra el 13 de agosto de 2003 y firmado por Peter John Giddings, Apoderado y Funcionario autorizado.

Certificado de Notario De Pinna en español firmado por James Kerr Milligan

APOSTILLA

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

1. País: Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte
   - Este documento Público
2. ha sido firmado por James Kerr Milligan
3. Quien ejerce funciones de Notario público
4. Lleva el sello del Notario público

CERTIFICADO

5. En Londres
6. El 14 agosto 2003
7. Por el Secretario de Estado Principal de su Majestad para Asuntos exteriores y de la Mancomunidad
8. No. G229474
9. Gran Sello de la Oficina de Asuntos exteriores y de la Mancomunidad
10. Firma legible de J. Garbrah- Por el Secretario de Estado

Si el documento se usa en un país que no pertenece a la Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961 debe pasar por la sección consular de la Misión que representa el país.

Es traducción fiel del inglés, con copia archivo para confrontación. Bogotá 21 agosto-03.

Marlen Neira C

MARLEN NEIRA CASTR
Traductor e Intérprete Ofi
Inglés - Español - Ingle
Resolución No. 2117 del 7 O

Yo, el infrascrito **JAMES KERR MILLIGAN**, Notario Público de la Ciudad de Londres, Inglaterra, por la Autoridad Real debidamente admitido y juramentado,

C E R T I F I C O:

QUE es auténtica la firma suscrita al pie del adjunto Poder, por ser del puño y letra del Señor Don **PETER JOHN GIDDINGS**, cuya identidad me consta, Apoderado de la Sociedad inglesa denominada **"GLAXO GROUP LIMITED"**, Sociedad legalmente constituída y existente de acuerdo con las leyes de Inglaterra, e inscrita en la Oficina de Registro de Sociedades bajo el número **305979**, con domicilio social en Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford, Middlesex UB6 ONN, Inglaterra;

QUE el citado Señor Don **PETER JOHN GIDDINGS** está debiday suficientemente autorizado para firmar documentos de esta clase en nombre y representación de dicha Sociedad en virtud de un Poder otorgado por la referida Sociedad fechado 3 de julio de 2002.

Y QUE los objetos para los cuales se otorgó dicho Poder se encuentran dentro de los objetos o actividades de la citada Sociedad, de acuerdo con la Escritura Constitutiva y los Estatutos Sociales, los cuales he tenido a la vista.

Y PARA QUE CONSTE donde y como convenga y fuere necesario expido el presente Certificado que firmo y sello en dicha Ciudad de Londres, el día de hoy diez de agosto del año dos mil tres.

JAMES KERR MILLIGAN
Notario Público de Londres, Inglaterra

SCRIVENER NOTARIES

OLARTERAISBECK
OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER – TORRE C
CALLE 100 NO. 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
Fax: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Power of Attorney

The undersigned,

Glaxo Group Limited

domiciled in

Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford, Middlesex UB6 0NN, GB

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck and Ana María Frieri** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents, Utility Models and Industrial Designs in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, appeals, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

Poder

El suscrito,

Glaxo Group Limited

domiciliado en

Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford, Middlesex UB6 0NN, GB

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck y Ana María Frieri** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de Patentes, Modelos de Utilidad y Diseños Industriales de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, apelaciones, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma: _____

Peter John GIDDINGS as Attorney and Authorised Official

Date/Fecha: 13 August 2003

City,Country/Ciudad,País: Brentford, Middlesex, England

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
12 January 2006 (12.01.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/003407 A2

(51) International Patent Classification:
C07K 16/00 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/GB2005/002581

(22) International Filing Date: 30 June 2005 (30.06.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0414799.7 1 July 2004 (01.07.2004) GB
0423675.8 25 October 2004 (25.10.2004) GB

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: GLAXO GROUP LIMITED [GB/GB]; Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford, Middlesex UB6 0NN (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: ASHMAN, Claire [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB). CASSIDY, Martin, John [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB). ELLIS, Jonathan, Henry [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB). WATTAM, Trevor, Anthony, Kenneth [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB).

(74) Agent: NASH, Guy, Cameron; GlaxoSmithKline, Corporate Intellectual Property, 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS (GB).

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

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)*

— *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)*

— *of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only*

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: IMMUNOGLOBULINS

(57) Abstract: The present invention concerns immunoglobulins, particularly antibodies which specifically bind human Interleukin 13 (hIL-13). Antibodies of the invention may be used in the treatment of a variety of diseases or disorders responsive to modulation of the interaction between hIL-13 and the human IL-13 receptor. Such diseases include severe asthma, atopic dermatitis, COPD and various fibrotic diseases. Pharmaceutical compositions comprising said antibodies and methods of manufacture are also disclosed.

WO 2006/003407 A2

Immunoglobulins

Field of the Invention

The present invention relates to immunoglobulins that specifically bind Interleukin 13 (IL-13) and in particular human IL-13 (hIL-13). One embodiment of the invention relates to antibodies that specifically bind hIL-13. The present invention also concerns methods of treating diseases or disorders with said immunoglobulins, pharmaceutical compositions comprising said immunoglobulins and methods of manufacture. Other aspects of the present invention will be apparent from the description below.

Background of the Invention

Interleukin-13 (IL-13)

IL-13 is a 12kDa secreted cytokine originally described as a T cell-derived cytokine that inhibits inflammatory cytokine production. Structural studies indicate that it has a four-helical bundle arrangement held by two disulphide bonds. Although IL-13 has four potential glycosylation sites, analysis of native IL-13 from rat lung has indicated that it is produced as an unglycosylated molecule. Expression of human IL-13 from NSO and COS-7 cells confirms this observation (Eisenmesser et al, J. Mol. Biol. 2001 310(1):231-241; Moy et al, J. Mol. Biol 2001 310(1):219-230; Cannon-Carlson et al, Protein Expression and Purification 1998 12(2):239-248).

IL-13 is a pleiotropic cytokine produced by a variety of cell types including activated Th2 cells, mast cells, basophils, dendritic cells, keratinocytes and NKT cells. It can also be produced by Th0, Th1, CD8 and naïve $CD45RA^+$ T cells. IL-13 has immunoregulatory activities that partially overlap with those of IL4, this redundancy may be explained by shared components in the receptors for IL4 and IL-13. IL-13 signals through the type II IL4 receptor which is a heterodimer composed of the IL4Rα and the IL-13Rα1 chains. IL-13Rα1 binds IL-13 with low affinity (Kd = 2-10 nM), but when paired with IL4Rα it binds with a high affinity (Kd = 400 pM) and forms a functional IL-13 receptor (the human receptor is referred to herein as "hIL-13R") that signals, resulting in activation of JAK/STAT and IRS-1/IRS-2 pathways. An additional IL-13 receptor chain has also been characterised (IL-13Rα2) which binds IL-13 with high affinity (Kd = 250 pM) but does not signal, instead it is believed to act as a decoy receptor. Functional receptors for IL-13 are expressed on a wide range of cells including the airway epithelium, smooth muscle, mast cells, eosinophils, basophils, B cells, fibroblasts, monocytes and macrophages. T cells do not have functional receptors for IL-13 (Hilton et al, PNAS 1996 93(1):497-501; Caput et al, J. Biol. Chem. 1996 271(28):16921-16926; Hershey GK, J.Allergy Clin. Immunol. 2003 111(4):677-690).

Both IL-13 and IL-4 act to modify immune and inflammatory responses by promoting allergy associated inflammation and suppressing inflammation due to bacteria, viruses and intracellular pathogens. The principal biological effects of IL-13 include; induction of B cell proliferation and regulation of isotype switching to IgE; induction of MHC II and CD23 expression on B cells and monocytes; up-regulation of VCAM-1 on endothelial cells; regulation of chemokine production; activation of mast cell, eosinophil and neutrophil function as well as inhibition of pro-inflammatory gene expression in monocyte and macrophage populations.

IL-13 does not have any proliferative effects on T cells. Thus unlike IL4, IL-13 does not appear to be important in the initial differentiation of CD4 T cells into Th2-type cells, but rather appears to be important in the effector phase of allergic inflammation (McKenzie et al, PNAS 1993 90(8):3735-3739; Wynn TA, Annu. Rev. Immunol. 2003 21:425-456).

IL-13 and Asthma

Asthma is a chronic lung disease, caused by inflammation of the lower airways and is characterised by recurrent breathing problems. Airways of patients are sensitive and swollen or inflamed to some degree all the time, even when there are no symptoms. Inflammation results in narrowing of the airways and reduces the flow of air in and out of the lungs, making breathing difficult and leading to wheezing, chest tightness and coughing. Asthma is triggered by super-sensitivity towards allergens (e.g. dust mites, pollens, moulds), irritants (e.g. smoke, fumes, strong odours), respiratory infections, exercise and dry weather. The triggers irritate the airways and the lining of the airways swell to become even more inflamed, mucus then clogs up the airways and the muscles around the airways tighten up until breathing becomes difficult and stressful and asthma symptoms appear.

There is strong evidence from animal models and patients that asthmatic inflammation and other pathologies are driven by dysregulated Th2 responses to aeroallergens and other stimuli (Busse et al, Am. J. Resp. Crit. Care Med.1995 152(1):388-393). In particular, IL-13 is believed to be the major effector cytokine driving a variety of cellular responses in the lung, including airway hyperreactivity, eosinophilia, goblet cell metaplasia and mucus hyper-secretion.

Clinical Evidence for the role of IL-13 in asthma

The gene encoding IL-13 is located on chromosome 5q31. This region also contains genes encoding IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 and GM-CSF, and has been linked with asthma. Genetic variants of IL-13 that are associated with asthma and atopy have been found both in the promoter and coding regions (Vercelli D, Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 2002 2(5):389-393). Functional study data are available for the coding variant, Q130 IL-13 (referred to herein as "Q130 IL-13"). The +2044 G to A single nucleotide polymorphism (SNP) found in the fourth exon, results in a substitution of an arginine with a glutamine at position 130 (Q130 IL-13). Also note that in SEQ.ID.NO: 9, this is equivalent to position 110, where the first 'G' amino acid residue at the start of the mature human IL-13 amino acid sequence is position 1. This variant has been found to be associated with asthma, increased IgE levels and atopic dermatitis in Japanese and European populations. Q130 IL-13 is believed to have enhanced stability compared with wild-type IL-13. It also has slightly lower affinity for the IL-13Rα2 decoy receptor and consistent with these observations, higher median serum IL-13 levels are found in patients homozygous for the Q130 IL-13 variant compared with non-homozygous patients. These results indicate that Q130 IL-13 could influence the local and systemic concentrations of IL-13 (Kazuhiko et al, J. Allergy Clin. Immunol. 2002 109(6):980-987).

Elevated IL-13 levels have been measured in both atopic and non-atopic asthmatics. In one study, average serum IL-13 levels of 50 pg/ml were measured in asthmatic patients compared to 8 pg/ml in normal control patients (Lee et al, J. Asthma 2001 38(8):665-671). Increased IL-13 levels have also been measured in plasma, bronchio-alveolar lavage fluid, lung biopsy samples and sputum (Berry et al, J Allergy Clin. Immunol 2004 114(5):1106-1109; Kroegel et al, Eur Respir. J. 1996 9(5):899-904; Huang

et al, J. Immunol. 1995 155(5):2688-2694; Humbert et al, J. Allergy Clin. Immunol. 1997 99(5):657-665).

In vivo evidence for involvement of IL-13 in asthma

A number of studies have defined a critical effector role for IL-13 in driving pathology in both acute and chronic mouse models of allergic asthma. The high affinity IL-13 receptor (IL-13Rα2) or anti-IL-13 polyclonal antibodies have been used to neutralize mouse IL-13 bioactivity in these models. Blockade of IL-13 at the time of allergen challenge completely inhibited OVA-induced airway hyper-reponsiveness, eosinophilia and goblet cell metaplasia. In contrast, administration of antibody to IL-4 after sensitisation and during the allergen challenge phase only partially reduced the asthma phenotype. Thus although exogenous IL-4 and IL-13 are both capable of inducing an asthma-like phenotype, the effector activity for IL-13 appears to be superior to that for IL-4. These data suggest a primary role for IL-4 in immune induction (particularly for Th2 cell development and recruitment to airways, and IgE production), whereas IL-13 is believed to be principally engaged in various effector outcomes, including airway hyper-responsiveness, mucus overproduction and cellular inflammation (Wills-Karp et al, Science 1998 282:2258-2261; Grunig et al, Science 1998 282:2261-2263; Taube et al, J. Immunol. 2002 169:6482-6489; Blease at al, J. Immunol 2001 166(8):5219-5224).

In complementary experiments, lung IL-13 levels have been raised by over-expression in a transgenic mouse or by instillation of IL-13 protein into the trachea of wild-type mice. In both settings, asthma-like characteristics were induced: non-specific airway hyper-responsiveness to cholinergic stimulation, pulmonary eosinophilia, epithelial cell hyperplasia, mucus cell metaplasis, sub-epithelial fibrosis, airways obstruction and Charcot-Leyden-like crystals. In addition, IL-13 was found to be a potent

stimulator of matrix metalloproteinases and cathepsin proteases in the lung, resulting in emphysematous changes and mucus metaplasia. Therefore IL-13 may be an important effector molecule both in asthma and COPD disease phenotypes (Zhu et al, J. Clin. Invest. 1999 103(6):779-788; Zheng et al, J. Clin. Invest. 2000 106(9):1081-1093).

These data indicate that IL-13 activity is both necessary and sufficient to produce several of the major clinical and pathological features of allergic asthma in well-validated animal models.

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)

COPD is a generic term covering several clinical syndromes including emphysema and chronic bronchitis. Symptoms are similar to asthma and COPD can be treated with the same drugs. COPD is characterised by a chronic, progressive and largely irreversible airflow obstruction. The contribution of the individual to the course of the disease is unknown, but smoking cigarettes is thought to cause 90% of the cases. Symptoms include coughing, chronic bronchitis, breathlessness and respiratory infections. Ultimately the disease will lead to severe disability and death. Chronic bronchitis is diagnosed in patients with a history of cough or sputum production on most days for at least 3 months over 2 years without any other explanation. Emphysema of the lung is characterised by an abnormal permanent enlargement of the air spaces and destruction of alveolar walls.

IL-13 may play a role in the development of COPD. Human smokers who develop COPD have many inflammatory cell types (neutrophils, macrophages, eosinophils) in the lung parenchyma. IL-13 is a proinflammatory Th2 cytokine therefore to model the progression of

emphysema; Zheng et al targeted IL-13 over-expression to the airway epithelium in IL-13 transgenic mice. These animals developed airway and lung parenchymal inflammation and emphysema. They also developed mucus metaplasia reminiscent of chronic bronchitis (J. Clin. Invest. 2000 106(9):1081-1093).

The IL-13 promoter polymorphism (-1055 C to T) that is associated with allergic asthma has also been reported to have an increased frequency in COPD patients compared to healthy controls. This implies a functional role for the IL-13 promoter polymorphism in the enhanced risk to develop COPD (Kraan et al, Genes and Immunity 2002 3:436-439). In addition, an increased number of IL-13 and IL-4 positive cells were observed in smokers with chronic bronchitis compared to asymptomatic smokers (Miotto et al, Eur. Resp. J. 2003 22:602-608). However a recent study to assess the level of IL-13 expression in the lungs of severe emphysema patients did not find an association between IL-13 levels and disease (Boutten et al, Thorax 2004 59:850-854).

Allergic disease including atopic dermatitis and allergic rhinitis

IL-13 has also been implicated in atopic disorders such as atopic rhinitis and atopic dermatitis. Allergic rhinitis is the most common atopic disease in the United States and is estimated to affect up to 25% of adults and more than 40% of children. There is a close relationship between allergic rhinitis and asthma. Both conditions share common immunopathology and pathophysiology; they have similar immunologic processes in which eosinophils and Th2 lymphocytes in nasal and bronchial tissue play a role. Excessive production of Th2 cytokines, particularly IL-4 and IL-5, is thought to be fundamental in the pathogenesis of allergic disease. IL-13 shares several characteristics and effector functions with IL-4 and this,

combined with the functional overlap in IL-4 and IL-13 receptor usage, intracellular signaling components, and genetic organization provides compelling (albeit indirect) evidence for a role of IL-13 in promoting or maintaining human immediate hypersensitivity in vivo. This has been corroborated by Li *et al* (Li et al. *J Immunol* 1998;161:7007) who demonstrated that atopic subjects with seasonal allergic rhinitis exhibited significantly stronger IL-13 responses in response to Ag-dependent but not polyclonal activation.

Atopic dermatitis is a common, chronic, relapsing, highly pruritic inflammatory skin disease. The lesional skin of atopic dermatitis patients is histologically characterized by an inflammatory T-cell infiltrate, which during acute phases is associated with a predominance of IL-4, IL-5 and IL-13 expression (Simon et al, *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:887; Hamid et al. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 225) In addition, Tazawa et al have demonstrated that IL-13 mRNA (but not IL-4) is significantly upregulated in subacute and chronic skin lesions of atopic dermatitis patients (Tazawa et al, Arch Derm Res 2004;296:459). The frequency of IL-13 expressing circulating CD4+ and CD8+ T-cells is also significantly increased in these patients (Aleksza et al British J Dermatol 2002;147;1135). This increased IL-13 activity is thought to result in raised levels of serum IgE, thereby contributing to the pathogenesis of atopic dermatitis. Furthermore, increased production of IL-13 by neonatal CD4+ T cells is a useful marker for identifying newborns at high risk for subsequent development of allergic diseases, esp. atopic dermatitis (Ohshima et al. *Pediatr Res* 2002; 51:195). Additional evidence for the importance of IL-13 in the etiology of atopic dermatitis was provided by Simon et al (Simon et al, *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:887); topical treatment with tacrolimus ointment (an immunosuppressive drug that inhibits intracellular signaling pathways for cytokine production) resulted in

significant clinical and histological improvement of the atopic skin lesions accompanied by significant reductions in local expression of Th2 cytokines, including IL-13. Furthermore, IL-13 Rα1 (a cell surface protein that together with IL-4Rα forms a functional receptor for IL-13) has been shown to be over-expressed on the suprabasal keratinocytes in the skin of atopic dermatitis patients, and IL-13 was able to upregulate IL-13 Rα1 mRNA in vitro (Wongpiyabovorn et al., *J Dermatol Science* 2003;33:31).

These data collectively indicate that IL-13 targeted interventions, including an IL-13 monoclonal antibody, may provide an effective approach for treatment of human allergic disease.

Esophagal eosinophilia

The accumulation of eosinophils in the esophagus is a common medical problem in patients with diverse diseases, including gastro-esophageal reflux disease, eosinophilic esophagitis, eosinophilic gastroenteritis, and parasitic infections. Esophageal eosinophilia is associated with allergic responses, and repeated challenging of mice with aeroallergens established a link between allergic airway inflammation and esophagal eosinophilia. Th2 cells are thought to induce eosinophil-associated inflammation through the secretion of an array of cytokines including IL-4 and IL-13 that activate inflammatory and effector pathways both directly and indirectly. IL-13 appears to be particularly important because it is produced in high quantities by Th2-cells and regulates multiple features of allergic disease (e.g. IgE production, mucus over-production, eosinophil recruitment and survival, and airway hyperreactivity. Eosinophils can generate functionally active IL-13 after exposure to GM-CSF and/or IL-5 under in vitro, ex vivo, and in vivo conditions in eosinophilic inflammatory responses. (Schmid-Grendelmeier *J Immunology*, 2002, 169: 1021–1027).

IL-13 delivered to the lung of wild-type, STAT-6, eotaxin-1 or IL-5 deficient mice by intratracheal administration, established that pulmonary inflammation, triggered by IL-13, is associated with the development of esophagal eosinophilia (Mishra et al. *Gastroenterol* 2003;125:1419). Taken together, these data provide evidence for a role of IL-13 in esophagal eosinophilia.

Oncology Indications

Another important area of interest is in targeting IL-13 or IL-13 receptors to inhibit growth of certain types of tumors. Type 1 T cell–mediated host defenses are believed to mediate optimal tumor rejection in vivo, and deviation to a Th2-type response may contribute to blocking tumor rejection and/or promotion of tumor recurrence (Kobayashi M et al. *J. Immunol.* 1998; 160:5869). Several animal studies using transplantable tumor cell lines support this notion by demonstrating that Stat6, IL-4, and IL-13 (produced in part by NKT cells) were capable of inhibiting tumor rejection (Terabe et al. *Nat. Immunol.* 2000;1:515; Kacha et al. *J. Immunol.* 2000;165:6024–28; Ostrand-Rosenberg et al. *J. Immunol.* 2000;165:6015). The potent anti-tumor activity in the absence of Stat-6 was thought to be due to enhancement of tumor-specific IFNg production and CTL activity. In addition, a loss of NKT cells has been shown to reduce IL-13 production with a concomitant rise in tumor recurrence, indicating that IL-13, produced in part by NKT cells is important for immunosurveillance (Terabe et al. *Nat. Immunol.* 2000; 1:515). As such, these findings suggest that IL-13 inhibitors or novel IL-13 antagonists, including IL-13 mAb, may be effective as cancer immunotherapeutics by interfering with the negative regulatory IL-13 plays in downregulating immune responses to tumor cells.

In addition to boosting Th-type-1-associated anti-tumor defenses, IL-13 inhibitors may also be able to block tumor cell growth more directly. For example, in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) and Hodgkin's disease, IL-13 either blocks apoptosis or promotes tumor cell proliferation (Chaouchi et al. *Blood* 1996; 87:1022; Kapp et al. *J. Exp Med.* 1999; 189:1939). B-CLL is a clinically heterogeneous disease originating from B lymphocytes that involves apoptotic defect in the leukemic cells. IL-13 is not thought to act as a direct growth factor but protects tumor cells from in vitro spontaneous apoptosis (Chaouchi et al. *Blood* 1996; 87:1022; Lal et al. *J. Immunol.*1999; 162:78) and may contribute to B-CLL by preventing neoplastic cell death.

Hodgkin's disease is a type of lymphoma that primarily affects young adults and accounts for about 7,500 cases a year in the United States. The cancer is characterized by the presence of large multi-nucleated Hodgkin/Reed-Sternberg cells (H/RS). In a large majority of cases, the malignant cell population arises from B cells. Several Hodgkin's disease-derived cell lines, as well as lymph node tissue taken from Hodgkin's lymphoma patients, overexpress IL-13 and/or IL-13 receptors. (Kapp et al. *J. Exp Med.* 1999;189:1939, Billard et al. *Eur Cytokine Netw* 1997;8:19; Skinnider et al. *Blood* 2001; 97:250; Oshima et al, *Cell Immunol* 2001 ;211:37). Neutralizing anti-IL-13 mAbs or IL-13 antagonists have been shown to inhibit H/RS cell proliferation in a dose-dependent manner (Kapp et al. *J. Exp Med.* 1999; 189:1939; Oshima et al, *Cell Immunol* 2001; 211:37). Similarly, delivery of soluble IL-13Ra2 decoy receptor to NOD/SCID mice with an implanted Hodgkin's disease-derived cell line delayed tumor onset and growth, and enhanced survival, demonstrating that IL-13 neutralization can suppress Hodgkin's lymphoma growth *in vitro* and *in vivo* (Trieu et al. Cancer Research 2004;64:3271). Collectively,

these studies indicate that IL-13 stimulates the proliferation of H/RS cells in an autocrine fashion (Kapp et al. *J. Exp Med.* 1999; 189:1939; Ohshima et al. *Histopathology* 2001; 38:368).

Neutralization of IL-13 may therefore represent an attractive and effective treatment for Hodgkin's disease and other B cell–associated cancers by inhibiting tumor cell growth while at the same time enhancing anti-tumor defenses.

Inflammatory Bowel Diseases

There is a possible role for IL-13 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease (IBD). Inflammatory bowel disease comprises a number of diseases clinically classified as ulcerative colitis, Crohn's disease and indeterminate colitis. Its main manifestation is chronic intestinal inflammation due to an exaggerated immune response with an imbalance in the activation of Th1 and Th2 lymphocytes in the intestinal mucosa. This has been demonstrated in animal models of crohn's disease (Bamias et al. Gastroenterol 2005; 128:657) and ulcerative colitis (Heller et al, Immunity 2002; 17:629). Neutralization of IL-13 by IL-13Rα2-Fc administration prevented colitis in a murine Th2 model of human ulcerative colitis (Heller et al, Immunity 2002; 17:629). Furthermore, IL-13 production rapidly supersedes that of IL-4 in this model, and IL-13 production can be induced by stimulation of NKT cells, suggesting that tissue damage may result from toxic activity of IL-13 on the epithelium cells. There are some human data to support these findings: the frequency of IL-13 positive rectal biopsy specimens from patients with ulcerative colitis was significantly higher than of inflammatory and non-inflammatory control subjects, and a higher rate IL-4 and IL-13 expression was observed in acute than non-acute ulcerative colitis (Inoue et al. Am J

Gastroenterol 1999;94:2441). In addition Akido *et al* characterized the immune activity in the muscularis externa from intestinal segments of Crohn's disease patients and found that IL-4 and IL-13 mediate hypercontractility of the intestinal smooth muscle cells via a STAT-6 pathway. The authors concluded that this pathway may contribute to the hypercontractility of intestinal muscles in Crohn's disease (Akiho et al., *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288:619).

Thus, an IL-13 mAb, possibly in combination with molecules directed at other cytokines, may provide an approach to stop or slow the progression of IBDs.

Psoriasis and Psoriatic Arthritis

Psoriasis is a chronic skin disease characterized by hyper-proliferation of keratinocytes and an immunologic cellular infiltrate, including activated T cells, producing various cytokines that can influence the phenotype of epidermal keratinocytes. CDw60 is a carbohydrate-bearing molecule that is upregulated on the surface of psoriatic basal and suprabasal keratinocytes of psoriatic skin. IL-4 and IL-13 secreted from T cells derived from psoriatic lesions have been shown to strongly up-regulate the expression of CDw60 on keratinocytes, (Skov et al., *Am J Pathol* 1997;15:675), whereas interferon-gamma blocked IL-4/IL-13 mediated induction of CDw60 on cultured keratinocytes (Huang et al., *J Invest Dermatol* 2001;116:305). Thus, CDw60 expression on psoriatic epidermal keratinocytes is thought to be induced at least in part by IL-13 secreted by activated T cells within the lesion. In addition, IL-13 Rα1 and IL-4Rα, cell surface proteins that together form a receptor complex for IL-13, are differently expressed in skin biopsies from patients with and without psoriasis (Cancino-Diaz et al., *J Invest Dermatol* 2002;119:1114;

Wongpiyabovorn et al., *J Dermatol Science* 2003;33:31), and in vitro experiments demonstrated that IL-13 (but not IL-4) could upregulate the expression of IL-13Rα1 (Wongpiyabovorn et al., *J Dermatol Science* 2003;33:31). Since IL-13 has an effect on a variety of cell types, these studies suggest that the IL-13 receptor may play a part in the early inflammatory process of psoriasis.

Psoriatic arthritis is characterized by synovitis which is mediated by both pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. The role of IL-13 in various forms of arthritis has been receiving increased interest. Spadaro et al have observed significantly higher levels of IL-13 in synovial fluid of patients with psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis than in patients with osteoarthritis. In addition, synovial fluid levels of IL-13 were significantly higher than those in serum in patients with psoriatic arthritis, and the IL-13 synovial fluid/serum ratio was markedly higher in the psoriatic arthritis group than in the rheumatoid arthritis group, suggesting a possible role for the locally produced IL-13 in synovial tissues of patients with psoriatic arthritis (Spadaro et al., *Ann Rheum Dis* 2002; 61:174).

Potential Role of IL-13 in other conditions

Acute graft-versus-host disease is a serious cause of morbidity and mortality following stem cell transplantation and is directly related to the degree of human leukocyte antigen (HLA) incompatibility between donor and recipient. Jordan et al first identified IL-13 as a typical Th2 cytokine that is abundantly produced during unrelated, unmatched MLRs (mixed lymphocyte reaction; an in vitro assay for fine-tuning donor selection after initial HLA typing) (Jordan et al. J Immunol Methods; 2002;260:1). The same group subsequently showed that IL-13 production by donor T-cells is predictive of acute graft-versus-host-disease (aGVHD) following

unrelated donor stem cell transplantation (Jordan et al. *Blood* 2004; 103:717). All patients with severe, grade III aGVHD following stem cell transplantation had donors who produced very high pre-transplantation IL-13 responses, demonstrating a significant link between IL-13 levels and aGVHD and raising the possibility that IL-13 may be directly responsible for some of the aGVHD associated pathology. Consequently, a therapy based on specific blocking of IL-13 may be useful for the treatment of post-stem cell transplantation aGVHD.

Diabetic nephropathy is one of the major causes of end stage renal disease in the Western world. Although the incidence of nephropathy owing to type 1 diabetes is declining, diabetes mellitus type 2 is now the most common single cause of renal insufficiency in the USA, Japan and Europe. Furthermore, this group of patients has a very poor prognosis on maintenance dialysis owing to extremely high mortality caused by cardiovascular events. It is now increasingly clear that hemodynamic, metabolic and structural changes are interwoven, and various enzymes, transcription factors and growth factors have been identified that play a role in the pathogenesis of this disease. Particularly, TGF-β is important in the development of renal hypertrophy and accumulation of extracellular matrix components, and is considered the pivotal cytokine in mediating collagen formation in the kidney (Cooper. *Diabetologia* 2001; 44:1957; Wolf. *Eur J Clin Invest* 2004; 34 (12): 785). In experimental and human diabetic nephropathy TGF-1 bioactivity is increased and administration of TGF-β1 antibodies to diabetic mouse led to improvement in renal function and reduced extra-cellular matrix accumulation. IL-13 was recently shown in a transgenic mouse model of lung fibrosis to mediate its effects at least in part by regulating the production and activation of TGF-β1 and collagen deposition (Lee et al. *J. Exp. Med.* 2001; 194:809; Zhu et al. *J. Clin. Invest.* 1999; 103:779), thereby establishing a direct functional link

between IL-13 and TGF-β. Consequently a similar role for IL-13 in regulating TGF-b1 activity in the diabetic kidney can be envisioned and IL-13 targeted interventions could potentially have a role in the management of diabetic nephropathy.

Fibrotic Conditions

Pulmonary fibrosis is a condition of inappropriate and harmful scarring of the lungs, leading to disability and often death. The term encompasses a variety of different conditions with distinct etiologies, pathologies and responses to treatment. In some cases the cause of the fibrosis is identified. Causes include: (1) inhaled profibrotic material such as asbestos or silicon, or hard metal dust (2) inhaled organic material to which the patient has an idiosyncratic immunological response leading to fibrosis (e.g. farmer's lung) (3) drugs, such as nitrofurantoin, amiodarone and methotrexate (4) in association with a systemic inflammatory disease, such as Systemic Sclerosis or Rheumatoid Arthritis.

However, in many instances no cause or underlying condition is identified. Many such patients are diagnosed with Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF). This is a relative rare condition (prevalence 20/100 000). The diagnosis is based on the absence of an identified cause combined with certain radiological and pathological features, particularly honeycombing on the CT or lung biopsy. The disease is usually seen in older patients (>50) and often follows a relentless course of progressive lung impairment leading to death, with the median survival quoted as 2-5 years. Moreover, the patients have the most unpleasant experience of breathlessness progressing over months or years. This initially restricts physical activity, but in the terminal phase – which may last several months – the patient is breathless even at rest and is furthermore oxygen dependent.

At present there is no satisfactory treatment for this disease. Current treatment generally takes the form of corticosteroids and immunosuppressives such as azathioprine. However, corticosteroids may be ineffective in many of patients and their side effects may make the situation worse. There are many potential treatments under investigation including Interferon gamma, which has shown a trend to improved survival in a recent large study, and perfenidone.

There is evidence that IL-13 and cytokines associated with the Th2 phenotype are involved in the process of fibrosis in tissue repair (Wynn TA, Nat. Rev. Immunol. 2004 4:583-594; Jakubzick et al, Am. J. Pathol. 2004 164(6):1989-2001; Jakubzick et al, Immunol. Res. 2004 30(3):339-349; Jakubzick et al, J. Clin. Pathol. 2004 57:477-486). IL-13 and IL-4 have been implicated in a variety of fibrotic conditions. Hepatic fibrosis induced by *Schistosoma* appears to be IL-13 dependent and there is limited evidence that IL-13 is involved in the pathogenesis of scleroderma (Hasegawa et al, J. Rheumatol. 1997 24:328-332; Riccieri et al, Clin. Rheumatol. 2003 22:102-106)

In terms of pulmonary fibrosis, in vitro studies have shown that IL-13 promotes a fibrogenic phenotype. Animal studies have shown elevated levels of IL-13 expression in artificially induced models of fibrosis, and that fibrosis can be reduced by elimination of IL-13.

IL-13 promotes a profibrotic phenotype. At a cellular level, there are several mechanisms by which IL-13 may promote fibrosis. The signal pathways and importance of these various mechanisms are not well defined.

There is evidence that IL-13 acts on the fibroblast both to promote the production of collagen, and to inhibit its breakdown, thus favouring a fibrotic phenotype. Skin fibroblasts possess IL-13 receptors and exposure of cultured skin fibroblasts to IL-13 leads to upregulation of collagen generation (Oriente et al, J. Pharmacol. Exp. Ther. 2000 292:988-994). IL-4 also has a similar, but more transitory effect. A human lung fibroblast cell line (ICIG7) expresses the type II IL-4 receptor (Jinnin et al, J. Biol. Chem 2004 279:41783-41791). Exposure of these cells to IL-13 promotes secretion of a variety of inflammatory and profibrotic mediators: GM-CSF, G-CSF, VCAM beta1 integrin (Doucet et al, Int. Immunol. 1998 10(10):1421-1433).

IL-13 inhibits IL-1a-induced matrix metalloproteinases 1 and 3 protein production by skin fibroblasts which would tend to reduce breakdown of EC matrix (Oriente et al, J. Pharmacol. Exp. Ther. 2000 292:988-994). IL-13 acts synergistically with TGF-β on human fibroblasts obtained by biopsy of asthma airways to promote expression of tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1). Breakdown of extracellular matrix is effected by matrix metalloproteinases, which are inhibited by TIMP-1. This action of IL-13 would thus tend to reduce matrix degradation (Zhou et al, Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2005 288:C435-C442)

Over-expression of IL-13 in transgenic mice leads to subepithelial fibrosis, epithelial cell hypertrophy, goblet cell hyperplasia, crystal deposition (acidic mammalian chitinase), airway hyper-responsiveness, interstitial fibrosis, type 2 cell hypertrophy and surfactant accumulation (Zhu et al, J. Clin. Invest. 1999 103(6):779-788).

Different strains of mice have different susceptibilities to bleomycin-induced pulmonary fibrosis. C57B1/6J mice, which are susceptible, exhibit

rapid up regulation of IL-13, IL-13Rα and IL-4 (as well as TGFβ, TNFRα and IL1Rs) in response to bleomycin. BALB/c mice, which are not susceptible, do not show upregulation of IL-13.

Belperio et al (Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2002 27:419-427) studied the expression and role of IL-13, IL-4 and the CC chemokine C10 in a mouse bleomycin fibrosis model. Lung tissue levels of both IL-13 and IL-4 increased in response to bleomycin. Prior neutralisation of IL-13 using polyclonal anti IL-13 antibodies significantly reduced lung fibrosis in response to bleomycin as assessed by lung hydroxyproline levels. Despite the increased expression of IL-4 in the same model, neutralisation of IL-4 had no effect on lung fibrosis.

In another model of acute lung fibrosis induced by FITC in the BALB/c mouse, absence of IL-13 (in knockouts), but not IL-4, protected against lung fibrosis. There is no added protection of knockout of IL-4 in IL-13 knockouts (Kolodsick et al, J. Immunol. 2004 172:4068-4076). The protective effect of IL-13 absence is not due to a difference in cell recruitment into the lung: in all knockouts and BALB/c total cell numbers recruited are similar, so the initial inflammatory component seems to be the unaffected. Eosinophil recruitment is lower in IL-4 and IL-13 knockouts compared with BALB/c, but since IL-4 -/- were not protected against fibrosis this cannot explain the difference in fibrosis. Perhaps surprisingly, there was no difference in the levels of cytokines between IL-13 +/+ and -/-, including for IL10, MCP-1, gamma interferon, TGF-I. In addition, the same number of fibroblasts were isolated from lungs of the different animals post FITC, but in the IL-13 -/- mice the production of collagen I is reduced. This indicates the loss of IL-13 is not simply preventing the inflammatory response, but rather is having a more specific anti-fibrotic role. It has been suggested that IL-13 might exert its fibrotic effect via TGF-I (Lee et al, J. Exp. Med. 2001 194:809-821). However in

this FITC model, expression of TGF-I was not reduced in IL-13 knock-out mice.

Interleukin 4 may be expected to exert a similar effect as IL-13 as both act via the same receptor. IL-4 is significantly upregulated in the lungs of mice with bleomycin induced lung fibrosis (Gharaee-Kermani et al, Cytokine 2001 15:138-147). However, comparing bleomycin-induced lung fibrosis in C57BL6/J mice which overexpress IL-4, IL-4 knockouts and wild type, Izbicki et al (Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol 2002 283(5):L1110-L1116) did not find evidence that IL-4 was involved in lung fibrosis. Fibrosis was not reduced in IL-4 knockouts, and IL-4 over-expressing mice had increased levels of fibrosis.

BAL cytokine levels of IL-13 are significantly elevated in patients with a variety of forms of pulmonary fibrosis, though with considerable variability. Expression of IL-13 is significantly upregulated in alveolar macrophages obtained from patients with lung fibrosis.

The strongest clinical evidence comes from research at the University of Michigan. Jakubzick and colleagues have studied gene expression of IL-13 and IL-4 and their receptors in surgical lung biopsies from patients with pulmonary fibrosis. IL-13 gene expression is markedly greater in specimens from IPF affected lung than lung from normals or other lung fibrotic conditions. Fibroblasts cultured from patients with IPF/UIP show heightened expression of the IL-13 and IL-4 receptor, compared with tissue and fibroblasts obtained biopsies from patients with normal lungs or other forms of lung fibrosis. In particular, the fibroblastic foci, which are presumably the epicentre of disease activity, stain particularly strongly for these receptors (Jakubzick et al, J. Immunol 2003 171:2684-2693; Jakubzick et al, Am. J. Pathol. 2003 162:1475-1486; Jakubzick et al, Am.

J. Pathol. 2004 164(6):1989-2001; Jakubzick et al, Immunol. Res. 2004 30(3):339-349; Jakubzick et al, J. Clin. Pathol. 2004 57:477-486).

There is good in vitro evidence that Th2 cytokines in general and IL-13 in particular promote a profibrotic phenotype. In at least 2 animal models it has been shown that chemically-induced fibrosis can be reduced by elimination of IL-13 (either in gene knock-out or by anti-IL-13 antibodies). Some evidence indicates that IL-13 is more important at promoting pulmonary fibrosis than IL-4. Clinical evidence for the role of IL-13 in pulmonary fibrosis suggests that IL-13 and its receptors are unregulated in the lungs of patients with IPF.

A growing body of data suggests an important role for IL-13 based therapies for the treatment of a variety of fibrotic conditions, including schistosomiasis-induced hepatic fibrosis, and various forms of pulmonary fibrosis (e.g. IPF [discussed elsewhere], scleroderma).

Experiments in which IL-4 and IL-13 were inhibited independently identified IL-13 as the dominant effector cytokine of fibrosis in several models (Chiaramonte et al *J. Clin. Invest.* 1999;104: 777–785; Blease *et al. J. Immunol.* 2001; 166:5219; Kumar *et al. Clin. Exp. Allergy* 2002; 32:1104). In schistosomiasis, although the egg-induced inflammatory response was unaffected by IL-13 blockade, collagen deposition decreased by more than 85% in chronically infected animals (Chiaramonte et al *J. Clin. Invest.* 1999; 104: 777; Chiaramonte et al *Hepatology* 2001; 34:273) despite continued and undiminished production of IL-4.

The amino acid sequence for hIL-13 is set forth as SEQ.I.D.NO: 9. (This is the mature protein sequence, that is, no signal sequence is present).

A cDNA encoding hIL-13 is set forth in SEQ.I.D.NO:10. (This is the DNA sequence for the mature protein sequence, that is, no signal sequence is present).

All patent and literature references disclosed within the present specification (including any patent application to which this application claims priority) are expressly and entirely incorporated herein by reference.

Recently vaccines raising immune responses against IL-13 for the treatment of asthma have been described (WO 02/070711). A role for IL-13 in the sensitisation of the skin to environmental allergens has also been recently described (Herrick et al., The Journal of Immunology, 2003, 170:2488-2495).

The present invention provides, *inter alia*, an antibody referred to as 6A1. As demonstrated below, 6A1 binding with hIL-13 appears dependent on the presence of arginine at position 107 of SEQ.I.D.NO:9. Arginine at position 107 of SEQ.I.D.NO:9 is reported to be an important residue involved in hIL-13/hIL-13R interaction. Thompson J.P and Debinski W (1999) J.Biol.Chem, vol.24, No:42 pp29944-29950 stated "Glutamic acids at positions 13 and 16 in hIL13 α-helix A, arginine and serine at positions 66 and 69 in helix C, and arginine at position 109 in helix D were found to be important in inducing biological signalling since their specific mutation resulted in loss and/or gain of function phenomena." (See abstract and entire disclosure). The arginine at position 109 of this paper is equivalent to 107 in SEQ.I.D.NO:9 of the present specification due to a differing numbering approach used by the present inventors to that used by the

authors of this paper. Thus 6A1 binding with hIL-13 involves one of the residues on hIL-13 previously identified as being important in hIL-13/hIL-13R interaction and therefore biological signalling of the IL-13 pathway.

Summary of the Invention

The present invention therefore provides a therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof which specifically binds hIL-13 and neutralises the activity of hIL-13. See, for example, Table A below.

The term "specifically binds" as used throughout the present specification in relation to antibodies and antigen binding fragments thereof of the invention means that the antibody binds hIL-13 with no or insignificant binding to other human proteins and in particular human IL-4. The term however does not exclude the fact that antibodies of the invention may also be cross-reactive with cynomolgus IL-13.

In another aspect of the present invention there is provided a therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof which specifically binds hIL-13 and modulates (e.g. inhibits or blocks) the interaction between hIL-13 and hIL-13R. Such inhibition includes but is not limited to competitive inhibition. In certain embodiments, antibodies of the invention at least inhibit the interaction between hIL-13 and hIL-13R but may also block the interaction between hIl-13 and hIL-13R thereby decoupling the hIL-13/hIL-13R signalling pathway.

In another aspect, there is provided a therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof which specifically binds hIL-13, and comprises a CDRH3 having the sequence set forth in SEQ.I.D.NO:3.

In another aspect of the invention there is provided a therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof which specifically binds hIL-13 and comprises a CDRH3 which is a variant of the sequence set forth in SEQ.I.D.NO:3 in which one or two residues within said CDRH3 of said variant differs from the residue in the corresponding position in SEQ.I.D.NO:3.

In another aspect of the present invention there is provided a therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof which specifically binds hIL-13, and comprises the following CDRs:

CDRH1: SEQ.I.D.NO: 1
CDRH2: SEQ.I.D.NO: 2
CDRH3: SEQ.I.D.NO: 3
CDRL1: SEQ.I.D.NO: 4
CDRL2: SEQ.I.D.NO: 5
CDRL3: SEQ.I.D.NO: 6

Throughout this specification, amino acid residues in antibody sequences are numbered according to the Kabat scheme. Similarly, the terms "CDR", "CDRL1", "CDRL2", "CDRL3", "CDRH1", "CDRH2", "CDRH3" follow the Kabat numbering system as set forth in Kabat *et al; Sequences of proteins of Immunological Interest* NIH, 1987. "CDRH1" is taken to be the stretch of sequence which includes both the Kabat definition of CDRH1 (residues 31-35B) and also the CDRH1 definition of Chothia (Chothia et al (1989); Conformations of Immunoglobulins hypervariable regions; Nature 342, p877-883) which comprises Kabat 26-32. Therefore the following defines the CDRs according to the invention:

30
32

CDR:	Residues
CDRH1:	26-35B
CDRH2:	50-65
CDRH3:	95-102
CDRL1:	24-34
CDRL2:	50-56
CDRL3:	89-97

In another aspect of the invention there is provided a therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof comprising a VH domain having the sequence set forth in SEQ.I.D.NO:7 and a VL domain having the sequence set forth in SEQ.I.D.NO:8.

In another aspect of the invention there is provided an isolated VH domain of an antibody comprising (or consisting essentially of, or consisting of) SEQ.I.D.NO: 7 or 11, 12, 13, 14.

In another aspect of the invention there is provided a therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof comprising a VH domain selected from the group consisting of; SEQ.I.D.NO: 7 or 11,12,13,14

In another aspect of the present invention there is provided a therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof which competitively inhibits the binding of the therapeutic antibody comprising the CDRH3 of SEQ I.D.NO: 3 to hIL-13.

In another aspect of the invention there is provided a therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof which competitively inhibits the

binding of the therapeutic antibody comprising CDRs of SEQ.I.D. NO: 1,2,3,4, 5 and 6 to hIL-13.

In another aspect of the invention there is provided a therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof which competitively inhibits the binding of the therapeutic antibody comprising a heavy chain of SEQ.I.D.NO: 18 and a light chain of SEQ.I.D.NO:22 to hIL-13.

In accordance with the present invention there is provided a humanised therapeutic antibody which antibody comprises a VH domain selected from the group consisting of: SEQ.I.D.NO:11, 12, 13, 14 and a VL domain selected from the group consisting of: SEQ.I.D.NO:15, 16.

In another aspect of the invention there is provided a method of treating a human patient afflicted with a disease or disorder responsive to modulation of the interaction between hIL-13 and hIL-13R (such as asthma, COPD, allergic rhinitis, atopic dermatitis) which method comprises the step of administering to said patient a therapeutically effective amount of the therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof as described herein.

Use of an antibody of the invention in the manufacture of a medicament for the treatment of a disease or disorder responsive to modulation of the interaction between hIL-13 and hIL-13R is also provided.

In another aspect of the present invention there is provided a therapeutic antibody that specifically binds human IL-13, which antibody specifically binds human IL-13 between residues 97 to 108 of SEQ.I.D.NO:9. As is apparent to those skilled in the art on the basis of the results disclosed

below,."between residues 97 to 108 of SEQ.I.D.NO:9" is inclusive of positions 97 and 108.

In another aspect of the present invention there is provided a therapeutic antibody that competitively inhibits the binding of the therapeutic antibody having CDRH3 of SEQ.I.D.NO:3 to human IL-13 (such as a therapeutic antibody comprising a heavy chain of SEQ.I.D.NO:18 and a light chain of SEQ.I.D.NO:22), which competing antibody specifically binds human IL-13 between residues 97 to 108 of SEQ.I.D.NO:9.

In another aspect of the present invention there is provided a therapeutic antibody that specifically binds human IL-13 between residues 103 to 107 inclusively of SEQ.I.D.NO:9 and modulates (e.g. inhibits or blocks) the interaction between hIL-13 and hIL-13R.

In one embodiment of the invention there is provided a pharmaceutical composition comprising a plurality of monoclonal therapeutic antibodies (which are typically human or humanised) which specifically bind hIL-13 between residues 103 to 107, of SEQ.I.D.NO:9 and modulate (e.g. inhibits or blocks) the interaction between hIL-13 and hIL-13R and a pharmaceutical acceptable carrier.

In another embodiment of the invention there is provided a method of producing a therapeutic antibody which specifically binds hIL-13 between residues 103 to 107 of SEQ.I.D.NO:9 and modulate (e.g. inhibits or blocks) the interaction between hIL-13 and hIL-13R which method comprises the step of culturing in a serum-free culture media, a recombinant host cell comprising a first and second vector wherein said first vector comprises a polynucleotide encoding the heavy chain of said antibody and said second vector comprises a polynucleotide encoding the

light chain of said antibody. As will be apparent to the skilled person on the basis of the results below "between 103 to 107 of SEQ.I.D.NO:9" is inclusive of positions 103 and 107.

In another embodiment of the invention there is provided a method of producing a therapeutic antibody which specifically binds hIL-13 between residues 97 to 108 of SEQ.I.D.NO:9 and modulate (e.g. inhibits or blocks) the interaction between hIL-13 and hIL-13R which method comprises the step of culturing in a serum-free culture media, a recombinant host cell comprising a first and second vector wherein said first vector comprises a polynucleotide encoding the heavy chain of said antibody and said second vector comprises a polynucleotide encoding the light chain of said antibody.

In another embodiment of the invention there is provided an intact therapeutic antibody which binds hIL-13 and modulates (e.g. inhibits or blocks) the interaction between hIL-13 and hIL-13R which antibody interacts with residue 107 of SEQ.I.D.NO:9.

In another embodiment of the invention there is provided an intact therapeutic antibody which binds hIL-13 and modulates (e.g. inhibits or blocks) the interaction between hIL-13 and hIL-13R wherein the binding between said therapeutic antibody and hIl-13 depends on (or positively correlates to) the presence of an arginine residue at position 107 of SEQ.I.D.NO:9.

In another embodiment there is provided a therapeutic antibody that specifically binds hIL-13 and modulates (e.g. inhibits or blocks) the interaction between hIL-13 and hIL-13R and has a dissociation constant k_{off} in the range 1.4×10^{-4} to 8.22×10^{-5} s^{-1} (for example as measured by

Biacore™). Such antibody may comprise a CDRH3 of SEQ.I.D.NO:3 or variant thereof and may further comprise in addition to SEQ.I.D.NO:3 or variant thereof, SEQ:I.D.NO:1, 2, 4, 5 and 6.

In another embodiment there is provided an antibody that specifically binds hIL-13 and modulates (e.g. inhibits or blocks) the interaction between hIL-13 and hIL-13R which antibody comprises CDRH3 of SEQ.I.D.NO:3 and optionally further comprises each of CDRH1 of SEQ.I.D.NO:1, CDRH2 of SEQ.I.D.NO:2, CDRL1 of SEQ.I.D.NO:4, CDRL2 of SEQ.I.D.NO:5 and CDRL3 of SEQ.I.D.NO:6 wherein said antibody is also cross-reactive with cynomolgus IL-13 (cIL-13).

Brief Description of the Drawings

Figure 1
Sandwich ELISA illustrating the binding of monoclonal antibody 6A1 to recombinant E.coli-expressed human IL-13 at increasing concentrations.

Figure 2A
ELISA illustrating the ability of monoclonal antibody 6A1 at increasing concentrations to inhibit recombinant E.coli-expressed human IL-13 binding to the human IL-13 receptor α 1 chain.

Figure 2B
ELISA illustrating the ability of monoclonal antibody 6A1 at increasing concentrations to inhibit recombinant E.coli-expressed human IL-13 binding to the human IL-13 receptor α 2 chain.

Figure 3

Neutralisation assay illustrating the ability of 6A1 at increasing concentrations to inhibit the bioactivity of recombinant E.coli-expressed human and cynomolgus in a TF-1 cell proliferation assay.

Figure 4
Neutralisation assay illustrating the ability of 6A1 at increasing concentrations to inhibit the bioactivity of mammalian-expressed (CHO cell) human IL-13 in a TF-1 cell proliferation assay.

Figure 5
Neutralisation assay illustrating the ability of 6A1 at increasing concentrations to inhibit the bioactivity of recombinant E.coli-expressed Q130 human IL-13 in a TF-1 cell proliferation assay.

Figure 6
Sandwich ELISA demonstrating that 6A1 does not bind recombinant E.coli-expressed human IL-4.

Figure 7
An IL5 neutralisation assay, demonstrating that 6A1 does not inhibit the bioactivity of recombinant E.coli-expressed human IL-5 in a TF-1 cell proliferation assay.

Figure 8
Sandwich ELISA illustrating the binding of chimaeric 6A1 mAb to recombinant E.coli-expressed human IL-13 and cynomolgus IL-13 at increasing concentrations.

Figure 9

Sandwich ELISA illustrating the binding of 8 humanised anti-human IL-13 mAbs to recombinant E.coli-expressed human IL-13 at increasing concentrations .

Figure 10a
Sandwich ELISA illustrating the binding of chimaeric 6A1, L1+A1 and L2+A1 to recombinant E.coli-expressed human IL-13 at increasing concentrations.

Figure 10b
Sandwich ELISA illustrating the binding of chimaeric 6A1, L1+A1 and L2+A1 to recombinant E.coli-expressed cynomolgus IL-13 at increasing concentrations.

Figure 11.
Sandwich ELISA illustrating the binding of chimaeric 6A1, L1+A1 and L2+A1 to native human IL-13 at increasing concentrations.

Figure 12a
ELISA illustrating the ability of monoclonal antibody 6A1, chimaeric 6A1, L1+A1 and L2+A1 at increasing concentrations to inhibit recombinant E.coli-expressed human IL-13 binding to the human IL-13 receptor α 1 chain.

Figure 12b
ELISA illustrating the ability of monoclonal antibody 6A1, chimaeric 6A1, L1+A1 and L2+A1 at increasing concentrations to inhibit recombinant

E.coli-expressed human IL-13 binding to the human IL-13 receptor α 2 chain.

Figure 13a

Neutralisation assay illustrating the ability of 6A1, chimaeric 6A1, L1+A1 and L2+A1 at increasing concentrations to inhibit the bioactivity of recombinant E.coli-expressed human IL-13 in a.TF-1 cell proliferation assay.

Figure 13b

Neutralisation assay illustrating the ability of 6A1, chimaeric 6A1, L1+A1 and L2+A1 at increasing concentrations to inhibit the bioactivity of recombinant E.coli-expressed cynomolgus IL-13 in a TF-1 cell proliferation assay.

Figure 13c

Neutralisation assay illustrating the ability of 6A1, chimaeric 6A1, L1+A1 and L2+A1 at increasing concentrations to inhibit the bioactivity of recombinant E.coli-expressed Q130 human IL-13 in a TF-1 cell proliferation assay.

Figure 13d

Neutralisation assay illustrating the ability of 6A1, chimaeric 6A1, L1+A1 and L2+A1 at increasing concentrations to inhibit the bioactivity of mammalian-expressed (CHO cell) human IL-13 in a TF-1 cell proliferation assay.

Figure 14a

Sandwich ELISA demonstrating that 6A1, chimaeric 6A1, L1+A1 and L2+A1 do not bind recombinant E.coli-expressed human IL-4.

Figure 14b

Sandwich ELISA demonstrating that 6A1, chimaeric 6A1, L1+A1 and L2+A1 do not bind recombinant E.coli-expressed human GM-CSF.

Figure 14c

An IL5 neutralisation assay, demonstrating that 6A1, chimaeric 6A1, L1+A1 and L2+A1 do not inhibit the bioactivity of recombinant E.coli-expressed human IL-5 in a TF-1 cell proliferation assay.

Figure 15

An epitope mapping ELISA to determine the binding epitope for 6A1 on human and cynomolgus IL-13.

Figure 16a

An epitope mapping ELISA to identify the fine binding specificity of 6A1 on human IL-13

Figure 16b

An epitope mapping ELISA to identify the fine binding specificity of 6A1 on cynomolgus IL-13

Figure 17a

An epitope mapping ELISA to determine the key amino acid residues required for binding of 6A1 to human IL-13

Figure 17b

An epitope mapping ELISA to determine the key amino acid residues required for binding of L1+A1 to human IL-13.

Figure 17c and 17d are graphs illustrating the alanine scanning analysis for the parental (murine) 6A1 (Fig.17c) and humanised L1-A1 antibody.

Detailed Description of the Invention

1. Antibody Structures

1.1 Intact Antibodies

Intact antibodies include heteromultimeric glycoproteins comprising at least two heavy and two light chains. Aside from IgM, intact antibodies are usually heterotetrameric glycoproteins of approximately 150Kda, composed of two identical light (L) chains and two identical heavy (H) chains. Typically, each light chain is linked to a heavy chain by one covalent disulfide bond while the number of disulfide linkages between the heavy chains of different immunoglobulin isotypes varies. Each heavy and light chain also has intrachain disulfide bridges. Each heavy chain has at one end a variable domain (VH) followed by a number of constant regions. Each light chain has a variable domain (VL) and a constant region at its other end; the constant region of the light chain is aligned with the first constant region of the heavy chain and the light chain variable domain is aligned with the variable domain of the heavy chain. The light chains of antibodies from most vertebrate species can be assigned to one of two types called Kappa and Lambda based on the amino acid sequence of the constant region. Depending on the amino acid sequence of the constant region of their heavy chains, human antibodies can be assigned to five different classes, IgA, IgD, IgE, IgG and IgM. IgG and IgA

can be further subdivided into subclasses, IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4; and IgA1 and IgA2. Species variants exist with mouse and rat having at least IgG2a, IgG2b. The variable domain of the antibody confers binding specificity upon the antibody with certain regions displaying particular variability called complementarity determining regions (CDRs). The more conserved portions of the variable region are called Framework regions (FR). The variable domains of intact heavy and light chains each comprise four FR connected by three CDRs. The CDRs in each chain are held together in close proximity by the FR regions and with the CDRs from the other chain contribute to the formation of the antigen binding site of antibodies. The constant regions are not directly involved in the binding of the antibody to the antigen but exhibit various effector functions such as participation in antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), phagocytosis via binding to Fcγ receptor, half-life/clearance rate via neonatal Fc receptor (FcRn) and complement dependent cytotoxicity via the C1q component of the complement cascade.

In one embodiment therefore we provide an intact therapeutic antibody that specifically binds hIL-13, which antibody modulates (e.g. inhibits or blocks) the interaction between hIL-13 and hIL-13R. The intact therapeutic antibody may comprise a constant region of any isotype or subclass thereof described *supra*. In one embodiment, the antibody is of the IgG isotype, particularly IgG1. The antibody may be rat, mouse, rabbit, primate or human. In one typical embodiment, the antibody is primate (such as cynomolgus, Old World monkey or Great Ape, see e.g. WO99/55369, WO93/02108) or human.

In another embodiment there is provided an isolated intact therapeutic antibody comprising a CDRH3 of SEQ.I.D.NO: 3. In another embodiment

there is provided an intact therapeutic antibody comprising a variable region having CDRs of SEQ.I.D.NO: 1, 2,3,4,5 and 6.

In another embodiment, there is provided an isolated murine intact therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof comprising a VH domain having the sequence of SEQ.I.D.NO: 7 and a VL domain of the sequence of SEQ.I.D.NO: 8.

1.1.2 Human antibodies

Human antibodies may be produced by a number of methods known to those of skill in the art. Human antibodies can be made by the hybridoma method using human myeloma or mouse-human heteromyeloma cells lines see Kozbor J.Immunol 133, 3001, (1984) and Brodeur, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp51-63 (Marcel Dekker Inc, 1987). Alternative methods include the use of phage libraries or transgenic mice both of which utilize human V region repertories (see Winter G, (1994), Annu.Rev.Immunol 12,433-455, Green LL (1999), J.Immunol.methods 231, 11-23).

Several strains of transgenic mice are now available wherein their mouse immunoglobulin loci has been replaced with human immunoglobulin gene segments (see Tomizuka K, (2000) PNAS 97,722-727; Fishwild D.M (1996) Nature Biotechnol. 14,845-851, Mendez MJ, 1997, Nature Genetics, 15,146-156). Upon antigen challenge such mice are capable of producing a repertoire of human antibodies from which antibodies of interest can be selected. Of particular note is the Trimera™ system (see Eren R *et al*, (1998) Immunology 93:154-161) where human lymphocytes are transplanted into irradiated mice, the Selected Lymphocyte Antibody

System (SLAM, see Babcook *et al*, PNAS (1996) 93:7843-7848) where human (or other species) lymphocytes are effectively put through a massive pooled *in vitro* antibody generation procedure followed by deconvulated, limiting dilution and selection procedure and the Xenomouse II™ (Abgenix Inc). An alternative approach is available from Morphotek Inc using the Morphodoma™ technology.

Phage display technology can be used to produce human antibodies (and fragments thereof), see McCafferty; Nature, 348, 552-553 (1990) and Griffiths AD *et al* (1994) EMBO 13:3245-3260. According to this technique antibody V domain genes are cloned in frame into either a major or minor coat of protein gene of a filamentous bacteriophage such as M13 or fd and displayed (usually with the aid of a helper phage) as functional antibody fragments on the surface of the phage particle. Selections based on the functional properties of the antibody result in selection of the gene encoding the antibody exhibiting those properties. The phage display technique can be used to select antigen specific antibodies from libraries made from human B cells taken from individuals afflicted with a disease or disorder described above or alternatively from unimmunized human donors (see Marks; J.Mol.Bio. 222,581-597, 1991). Where an intact human antibody is desired comprising a Fc domain it is necessary to reclone the phage displayed derived fragment into a mammalian expression vectors comprising the desired constant regions and establishing stable expressing cell lines.

The technique of affinity maturation (Marks; Bio/technol 10,779-783 (1992)) may be used to improve binding affinity wherein the affinity of the primary human antibody is improved by sequentially replacing the H and L chain V regions with naturally occurring variants and selecting on the basis of improved binding affinities. Variants of this technique such as

43

45

"epitope imprinting" are now also available see WO 93/06213. See also Waterhouse; Nucl.Acids Res 21, 2265-2266 (1993).

Thus in another embodiment there is provided an isolated human intact therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof which specifically binds hIL-13 and modulates (e.g. inhibits or blocks) the interaction between hIL-13 and hIL-13R.

In another aspect there is provided an isolated human intact therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof comprising a CDRH3 of SEQ.I.D.NO: 3 which specifically binds hIL-13 and modulates (e.g. inhibits or blocks) the interaction between hIL-13 and hIL-13R. In another aspect there is provided an isolated human intact therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof comprising a variable region having CDRs of SEQ.I.D.NO: 1, 2, 3, 4, 5 and 6 as defined *supra*.

1.2 Chimaeric and Humanised Antibodies

The use of intact non-human antibodies in the treatment of human diseases or disorders carries with it the potential for the now well established problems of immunogenicity, that is the immune system of the patient may recognise the non-human intact antibody as non-self and mount a neutralising response. This is particularly evident upon multiple administration of the non-human antibody to a human patient. Various techniques have been developed over the years to overcome these problems and generally involve reducing the composition of non-human amino acid sequences in the intact antibody whilst retaining the relative ease in obtaining non-human antibodies from an immunised animal e.g. mouse, rat or rabbit. Broadly two approaches have been used to achieve

this. The first are chimaeric antibodies, which generally comprise a non-human (e.g. rodent such as mouse) variable domain fused to a human constant region. Because the antigen-binding site of an antibody is localised within the variable regions the chimaeric antibody retains its binding affinity for the antigen but acquires the effector functions of the human constant region and are therefore able to perform effector functions such as described *supra*. Chimaeric antibodies are typically produced using recombinant DNA methods. DNA encoding the antibodies (e.g. cDNA) is isolated and sequenced using conventional procedures (e.g. by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the H and L chains of the antibody of the invention, e.g. DNA encoding SEQ.I.D.NO 1,2,3,4,5 and 6 described *supra*). Hybridoma cells serve as a typical source of such DNA. Once isolated, the DNA is placed into expression vectors which are then transfected into host cells such as *E.Coli*, COS cells, CHO cells or myeloma cells that do not otherwise produce immunoglobulin protein to obtain synthesis of the antibody. The DNA may be modified by substituting the coding sequence for human L and H chains for the corresponding non-human (e.g. murine) H and L constant regions see e.g. Morrison; PNAS 81, 6851 (1984).

The second approach involves the generation of humanised antibodies wherein the non-human content of the antibody is reduced by humanizing the variable regions. Two techniques for humanisation have gained popularity. The first is humanisation by CDR grafting. CDRs build loops close to the antibody's N-terminus where they form a surface mounted in a scaffold provided by the framework regions. Antigen-binding specificity of the antibody is mainly defined by the topography and by the chemical characteristics of its CDR surface. These features are in turn determined by the conformation of the individual CDRs, by the relative disposition of

the CDRs, and by the nature and disposition of the side chains of the residues comprising the CDRs. A large decrease in immunogenicity can be achieved by grafting only the CDRs of a non-human (e.g. murine) antibodies ("donor" antibodies) onto human framework ("acceptor framework") and constant regions (see Jones *et al* (1986) Nature 321,522-525 and Verhoeyen M *et al* (1988) Science 239, 1534-1536). However, CDR grafting *per se* may not result in the complete retention of antigen-binding properties and it is frequently found that some framework residues (sometimes referred to as "backmutations") of the donor antibody need to be preserved in the humanised molecule if significant antigen-binding affinity is to be recovered (see Queen C *et al* (1989) PNAS 86, 10,029-10,033, Co, M *et al* (1991) Nature 351, 501-502). In this case, human V regions showing the greatest sequence homology to the non-human donor antibody are chosen from a database in order to provide the human framework (FR). The selection of human FRs can be made either from human consensus or individual human antibodies. Where necessary key residues from the donor antibody are substituted into the human acceptor framework to preserve CDR conformations. Computer modelling of the antibody maybe used to help identify such structurally important residues, see WO99/48523.

Alternatively, humanisation maybe achieved by a process of "veneering". A statistical analysis of unique human and murine immunoglobulin heavy and light chain variable regions revealed that the precise patterns of exposed residues are different in human and murine antibodies, and most individual surface positions have a strong preference for a small number of different residues (see Padlan E.A. *et al*; (1991) Mol.Immunol.28, 489-498 and Pedersen J.T. *et al* (1994) J.Mol.Biol. 235; 959-973). Therefore it is possible to reduce the immunogenicity of a non-human Fv by replacing exposed residues in its framework regions that differ from those usually

found in human antibodies. Because protein antigenicity may be correlated with surface accessibility, replacement of the surface residues may be sufficient to render the mouse variable region "invisible" to the human immune system (see also Mark G.E. *et al* (1994) in *Handbook of Experimental Pharmacology vol.113: The pharmacology of monoclonal Antibodies*, Springer-Verlag, pp105-134). This procedure of humanisation is referred to as "veneering" because only the surface of the antibody is altered, the supporting residues remain undisturbed.

Thus another embodiment of the invention there is provided a chimaeric therapeutic antibody comprising a non-human (e.g. rodent) variable domain fused to a human constant region (which maybe of a IgG isotype e.g. IgG1) which specifically binds hIL-13 and modulates (e.g. inhibits or blocks) the interaction between hIL-13 and hIL-13R.

In another embodiment there is provided a chimaeric therapeutic antibody comprising a non-human (e.g. rodent) variable region and a human constant region (which maybe of an IgG isotype e.g. IgG1) which specifically binds hIL-13, which antibody further comprises a CDRH3 of SEQ.I.D.NO3. Such antibodies may further comprise a human constant region of the IgG isotype, e.g. IgG1

In another embodiment there is chimaeric therapeutic antibody comprising a non-human (e.g. rodent) variable region and a human constant region (which maybe of a IgG isotype e.g. IgG1) which specifically binds hIL-13 having the CDRs of SEQ.I.D.NO: 1, 2,3,4,5 and 6.

In another embodiment there is provided a chimaeric therapeutic antibody comprising a VH domain of SEQ.I.D.NO:7 and a VL domain of SEQ.I.D.NO:8 and a human constant region of an IgG isotype, e.g. IgG1

which specifically binds hIL-13 and modulates (e.g. inhibits or blocks) the interaction between hIL-13 and hIL-13R.

In another embodiment there is provided a humanised therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof which specifically binds hIL-13 and modulates (e.g. inhibits or blocks) the interaction between hIL-13 and hIL-13R.

In another embodiment there is provided a humanised therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof which specifically binds hIL-13 and comprises a CDRH3 of SEQ.I.D.NO: 3. Such antibodies may comprise a human constant region of the IgG isotype, e.g. IgG1.

In another embodiment there is provided a humanised therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof which specifically binds hIL-13 and comprises CDRs of SEQ.I.D.NO1, 2,3,4,5 and 6. Such antibodies may comprise a human constant region of the IgG isotype, e.g. IgG1.

In accordance with the present invention there is provided a humanised therapeutic antibody which antibody comprises a VH domain selected from the group of: SEQ.I.D.NO:11, 12, 13, 14 and a VL domain selected from the group of: SEQ.I.D.NO:15,16. Such antibodies may comprise a human constant region of the IgG isotype e.g. IgG1.

In another embodiment there is provided a humanised therapeutic antibody which antibody comprises a VH domain of SEQ.I.D.NO: 11 and a VL domain of SEQ.I.D.NO:15.

In another embodiment there is provided a humanised therapeutic antibody which antibody comprises a VH domain of SEQ.I.D.NO: 12 and a VL domain of SEQ.I.D.NO:15.

In another embodiment there is provided a humanised therapeutic antibody which antibody comprises a VH domain of SEQ.I.D.NO: 13 and a VL domain of SEQ.I.D.NO:15.

In another embodiment there is provided a humanised therapeutic antibody which antibody comprises a VH domain of SEQ.I.D.NO: 14 and a VL domain of SEQ.I.D.NO:15.

In another embodiment there is provided a humanised therapeutic antibody which antibody comprises a VH domain of SEQ.I.D.NO: 11 and a VL domain of SEQ.I.D.NO:16.

In another embodiment there is provided a humanised therapeutic antibody which antibody comprises a VH domain of SEQ.I.D.NO: 12 and a VL domain of SEQ.I.D.NO:16.

In another embodiment there is provided a humanised therapeutic antibody which antibody comprises a VH domain of SEQ.I.D.NO: 13 and a VL domain of SEQ.I.D.NO:16.

In another embodiment there is provided a humanised therapeutic antibody which antibody comprises a VH domain of SEQ.I.D.NO: 14 and a VL domain of SEQ.I.D.NO:16

In another embodiment of the present invention there is provided a humanised therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof which

specifically binds hIL-13 wherein said antibody or fragment thereof comprises CDRH3 (SEQ.I.D.NO:3) optionally further comprising CDRs of SEQ.I.D.NO:1,2,4,5 and 6 wherein the residues selected from the group consisting of 19,38,73 and 81 of the human acceptor heavy chain framework region and the residue at position 85 of the human acceptor light chain framework are substituted by the corresponding residues found in the donor antibody framework from which CDRH3 is derived.

It will be apparent to those skilled in the art that the term "derived" is intended to define not only the source in the sense of it being the *physical* origin for the material but also to define material which is structurally identical (in terms of primary amino acid sequence) to the material but which does not originate from the reference source. Thus "residues found in the donor antibody from which CDRH3 is derived" need not necessarily have been purified from the donor antibody.

In another embodiment there is provided a humanised therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof which specifically binds hIL-13 wherein said antibody or fragment thereof comprises CDRH3 of SEQ.I.D.NO:3 optionally further comprising CDRs of SEQ.I.D.NO:1, 2, 4, 5 and 6 wherein the human heavy chain framework comprises one or more (e.g. all) of the following residues (or a conservative substitute thereof):

Position	Residue
38	I
19	R
73	T
81	R

and the human light chain comprises

Position	Residue

It is well recognised in the art that certain amino acid substitutions are regarded as being "conservative". Amino acids are divided into groups based on common side-chain properties and substitutions within groups that maintain all or substantially all of the binding affinity of the antibody of the invention or antigen binding fragment thereof are regarded as conservative substitutions, see the following table:

Side chain	Members
Hydrophobic	met, ala,val,leu,ile
neutral hydrophilic	cys, ser, thr
Acidic	asp, glu
Basic	asn, gln, his, lys, arg
residues that influence chain orientation	gly, pro
Aromatic	trp, tyr, phe

In accordance with the present invention there is provided a humanised therapeutic antibody comprising a heavy chain selected from the group consisting of: SEQ.I.D.NO: 18,19,20,21 and a light chain selected from the group consisting of; SEQ.I.D.NO:22, 23.

In one embodiment of the invention there is provided a humanised therapeutic antibody which specifically binds hIL-13 comprising a heavy chain of SEQ.I.D.NO:18 and a light chain of SEQ.I.D.NO:22.

In one embodiment of the invention there is provided a humanised therapeutic antibody which specifically binds hIL-13 comprising a heavy chain of SEQ.I.D.NO:19 and a light chain of SEQ.I.D.NO:22.

In one embodiment of the invention there is provided a humanised therapeutic antibody which specifically binds hIL-13 comprising a heavy chain of SEQ.I.D.NO:20 and a light chain of SEQ.I.D.NO:22.

In one embodiment of the invention there is provided a humanised therapeutic antibody which specifically binds hIL-13 comprising a heavy chain of SEQ.I.D.NO:21 and a light chain of SEQ.I.D.NO:22.

In one embodiment of the invention there is provided a humanised therapeutic antibody which specifically binds hIL-13 comprising a heavy chain of SEQ.I.D.NO:18 and a light chain of SEQ.I.D.NO:23.

In one embodiment of the invention there is provided a humanised therapeutic antibody which specifically binds hIL-13 comprising a heavy chain of SEQ.I.D.NO:19 and a light chain of SEQ.I.D.NO:23.

In one embodiment of the invention there is provided a humanised therapeutic antibody which specifically binds hIL-13 comprising a heavy chain of SEQ.I.D.NO:20 and a light chain of SEQ.I.D.NO:23.

In one embodiment of the invention there is provided a humanised therapeutic antibody which specifically binds hIL-13 comprising a heavy chain of SEQ.I.D.NO:21 and a light chain of SEQ.I.D.NO:23.

1.3 Bispecific antibodies

52
54

A bispecific antibody is an antibody having binding specificities for at least two different epitopes. Methods of making such antibodies are known in the art. Traditionally, the recombinant production of bispecific antibodies is based on the coexpression of two immunoglobulin H chain-L chain pairs, where the two H chains have different binding specificities see Millstein *et al*, Nature 305 537-539 (1983), WO93/08829 and Traunecker *et al* EMBO, 10, 1991, 3655-3659. Because of the random assortment of H and L chains, a potential mixture of ten different antibody structures are produced of which only one has the desired binding specificity. An alternative approach involves fusing the variable domains with the desired binding specificities to heavy chain constant region comprising at least part of the hinge region, CH2 and CH3 regions. It is preferred to have the CH1 region containing the site necessary for light chain binding present in at least one of the fusions. DNA encoding these fusions, and if desired the L chain are inserted into separate expression vectors and are then cotransfected into a suitable host organism. It is possible though to insert the coding sequences for two or all three chains into one expression vector. In one preferred approach, the bispecific antibody is composed of a H chain with a first binding specificity in one arm and a H-L chain pair, providing a second binding specificity in the other arm, see WO94/04690. Also see Suresh *et al* Methods in Enzymology 121, 210, 1986.

In one embodiment of the invention there is provided a bispecific therapeutic antibody wherein at least one binding specificity of said antibody is for hIL-13, wherein said antibody modulates (e.g. inhibits or blocks) the interaction between hIL-13 and IL-13R. Such antibodies may further comprise a human constant region of the IgG isotype, e.g. IgG1. In some embodiments, the bispecific therapeutic antibody has a first binding specificity for hIL-13 and modulates (e.g. inhibits or blocks) the interaction between hIL-13 and hIL-13R and a second binding specificity for hIL-4

55

and modulates (e.g. inhibits or blocks) the interaction between hIL-4 and a receptor for hIL-4.

In one embodiment of the invention there is provided a bispecific therapeutic antibody wherein at least one binding specificity of said antibody is for hIL-13, wherein said antibody comprises a CDRH3 of SEQ.I.D.NO: 3. Such antibodies may further comprise a human constant region of the IgG isotype, e.g. IgG1.

In one embodiment of the invention there is provided a bispecific therapeutic antibody wherein at least one binding specificity of said antibody is for hIL-13, wherein said antibody comprises at least CDRs of SEQ.I.D.NO: 1, 2,3,4,5 and 6. Such antibodies may further comprise a human constant region of the IgG isotype, e.g. IgG1.

1.4 Antibody Fragments

In certain embodiments of the invention there is provided therapeutic antibody fragments which modulate the interaction between hIL-13 and hIL-13R. Such fragments may be functional antigen binding fragments of intact and/or humanised and/or chimaeric antibodies such as Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, ScFv fragments of the antibodies described *supra*.
Traditionally such fragments are produced by the proteolytic digestion of intact antibodies by e.g. papain digestion (see for example, WO 94/29348) but may be produced directly from recombinantly transformed host cells. For the production of ScFv, see Bird *et al* ;(1988) Science, 242, 423-426. In addition, antibody fragments may be produced using a variety of engineering techniques as described below.

Fv fragments appear to have lower interaction energy of their two chains than Fab fragments. To stablise the association of the VH and VL domains, they have been linked with peptides (Bird *et al*, (1988) Science 242, 423-426, Huston *et al*, PNAS, 85, 5879-5883), disulphide bridges (Glockshuber *et al*, (1990) Biochemistry, 29, 1362-1367) and "knob in hole" mutations (Zhu *et al* (1997), Protein Sci., 6, 781-788). ScFv fragments can be produced by methods well known to those skilled in the art see Whitlow *et al* (1991) Methods companion Methods Enzymol, 2, 97-105 and Huston *et al* (1993) Int.Rev.Immunol 10, 195-217. ScFv may be produced in bacterial cells such as *E.Coli* but are more preferably produced in eukaryotic cells. One disadvantage of ScFv is the monovalency of the product, which precludes an increased avidity due to polyvalent binding, and their short half-life. Attempts to overcome these problems include bivalent $(ScFv')_2$ produced from ScFV containing an additional C terminal cysteine by chemical coupling (Adams *et al* (1993) Can.Res 53, 4026-4034 and McCartney *et al* (1995) Protein Eng. 8, 301-314) or by spontaneous site-specific dimerization of ScFv containing an unpaired C terminal cysteine residue (see Kipriyanov *et al* (1995) Cell. Biophys 26, 187-204). Alternatively, ScFv can be forced to form multimers by shortening the peptide linker to 3 to 12 residues to form "diabodies", see Holliger *et al* PNAS (1993), 90, 6444-6448. Reducing the linker still further can result in ScFV trimers ("triabodies", see Kortt *et al* (1997) Protein Eng, 10, 423-433) and tetramers ("tetrabodies", see Le Gall *et al* (1999) FEBS Lett, 453, 164-168). Construction of bivalent ScFV molecules can also be achieved by genetic fusion with protein dimerizing motifs to form "miniantibodies" (see Pack *et al* (1992) Biochemistry 31, 1579-1584) and "minibodies" (see Hu *et al* (1996), Cancer Res. 56, 3055-3061). ScFv-Sc-Fv tandems ((ScFV)2) may also be produced by linking

55
57

two ScFv units by a third peptide linker, see Kurucz *et al* (1995) J.Immol.154, 4576-4582. Bispecific diabodies can be produced through the noncovalent association of two single chain fusion products consisting of VH domain from one antibody connected by a short linker to the VL domain of another antibody, see Kipriyanov *et al* (1998), Int.J.Can 77,763-772. The stability of such bispecific diabodies can be enhanced by the introduction of disulphide bridges or "knob in hole" mutations as described *supra* or by the formation of single chain diabodies (ScDb) wherein two hybrid ScFv fragments are connected through a peptide linker see Kontermann *et al* (1999) J.Immunol.Methods 226 179-188. Tetravalent bispecific molecules are available by e.g. fusing a ScFv fragment to the CH3 domain of an IgG molecule or to a Fab fragment through the hinge region see Coloma *et al* (1997) Nature Biotechnol. 15, 159-163. Alternatively, tetravalent bispecific molecules have been created by the fusion of bispecific single chain diabodies (see Alt *et al*, (1999) FEBS Lett 454, 90-94. Smaller tetravalent bispecific molecules can also be formed by the dimerization of either ScFv-ScFv tandems with a linker containing a helix-loop-helix motif (DiBi miniantibodies, see Muller *et al* (1998) FEBS Lett 432, 45-49) or a single chain molecule comprising four antibody variable domains (VH and VL) in an orientation preventing intramolecular pairing (tandem diabody, see Kipriyanov *et al*, (1999) J.Mol.Biol. 293, 41-56). Bispecific $F(ab')_2$ fragments can be created by chemical coupling of Fab' fragments or by heterodimerization through leucine zippers (see Shalaby *et al*, (1992) J.Exp.Med. 175, 217-225 and Kostelny *et al* (1992), J.Immunol. 148, 1547-1553). Also available are isolated VH and VL domains (Domantis plc), see US 6, 248,516; US 6,291,158; US 6, 172,197.

In one embodiment there is provided a therapeutic antibody fragment (e.g. ScFv, Fab, Fab', $F(ab')_2$) or an engineered antibody fragment as

56

58

described *supra* that specifically binds hIL-13 and modulates (e.g. inhibits or blocks) the interaction between hIL-13 and hIL-13R. The therapeutic antibody fragment typically comprises a CDRH3 having the sequence of SEQ.I.D.NO: 3 optionally together with CDRs having the sequence set forth in SEQ.I.D.NO: 1,2,4,5 and 6.

1.5 Heteroconjugate antibodies

Heteroconjugate antibodies also form an embodiment of the present invention. Heteroconjugate antibodies are composed of two covalently joined antibodies formed using any convenient cross-linking methods. See, for example, US 4,676,980.

1.6 Other Modifications.

The interaction between the Fc region of an antibody and various Fc receptors (FcγR) is believed to mediate the effector functions of the antibody which include antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), fixation of complement, phagocytosis and half-life/clearance of the antibody. Various modifications to the Fc region of antibodies of the invention may be carried out depending on the desired property. For example, specific mutations in the Fc region to render an otherwise lytic antibody, non-lytic is detailed in EP 0629 240B1 and EP 0307 434B2 or one may incorporate a salvage receptor binding epitope into the antibody to increase serum half life see US 5,739,277. There are five currently recognised human Fcγ receptors, FcγR (I), FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa and neonatal FcRn. Shields *et al*, (2001) J.Biol.Chem 276, 6591-6604

59

59

demonstrated that a common set of IgG1 residues is involved in binding all FcγRs, while FcγRII and FcγRIII utilize distinct sites outside of this common set. One group of IgG1 residues reduced binding to all FcγRs when altered to alanine: Pro-238, Asp-265, Asp-270, Asn-297 and Pro-239. All are in the IgG CH2 domain and clustered near the hinge joining CH1 and CH2. While FcγRI utilizes only the common set of IgG1 residues for binding, FcγRII and FcγRIII interact with distinct residues in addition to the common set. Alteration of some residues reduced binding only to FcγRII (e.g. Arg-292) or FcγRIII (e.g. Glu-293). Some variants showed improved binding to FcγRII or FcγRIII but did not affect binding to the other receptor (e.g. Ser-267Ala improved binding to FcγRII but binding to FcγRIII was unaffected). Other variants exhibited improved binding to FcγRII or FcγRIII with reduction in binding to the other receptor (e.g. Ser-298Ala improved binding to FcγRIII and reduced binding to FcγRII). For FcγRIIIa, the best binding IgG1 variants had combined alanine substitutions at Ser-298, Glu-333 and Lys-334. The neonatal FcRn receptor is believed to be involved in both antibody clearance and the transcytosis across tissues (see Junghans R.P (1997) Immunol.Res 16. 29-57 and Ghetie *et al* (2000) Annu.Rev.Immunol. 18, 739-766). Human IgG1 residues determined to interact directly with human FcRn includes Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 and His435. Switches at any of these positions described in this section may enable increased serum half-life and/or altered effector properties of antibodies of the invention.

Other modifications include glycosylation variants of the antibodies of the invention. Glycosylation of antibodies at conserved positions in their constant regions is known to have a profound effect on antibody function, particularly effector functioning such as those described above, see for example, Boyd *et al* (1996), Mol.Immunol. 32, 1311-1318. Glycosylation variants of the therapeutic antibodies or antigen binding fragments thereof

58
60

of the present invention wherein one or more carbohydrate moiety is added, substituted, deleted or modified are contemplated. Introduction of an asparagine-X-serine or asparagine-X-threonine motif creates a potential site for enzymatic attachment of carbonhydrate moieties and may therefore be used to manipulate the glycosylation of an antibody. In Raju *et al* (2001) Biochemistry 40, 8868-8876 the terminal sialyation of a TNFR-IgG immunoadhesin was increased through a process of regalactosylation and/or resialylation using beta-1, 4-galactosyltransferace and/or alpha, 2,3 sialyltransferase. Increasing the terminal sialylation is believed to increase the half-life of the immunoglobulin. Antibodies, in common with most glycoproteins, are typically produced as a mixture of glycoforms. This mixture is particularly apparent when antibodies are produced in eukaryotic, particularly mammalian cells. A variety of methods have been developed to manufacture defined glycoforms, see Zhang *et al* Science (2004), 303, 371, Sears *et al*, Science, (2001) 291, 2344, Wacker *et al* (2002) Science, 298 1790, Davis *et al* (2002) Chem.Rev. 102, 579, Hang *et al* (2001) Acc.Chem.Res 34, 727. Thus the invention contemplates a plurality of therapeutic (monoclonal) antibodies (which maybe of the IgG isotype, e.g. IgG1) as herein described comprising a defined number (e.g. 7 or less, for example 5 or less such as two or a single) glycoform(s) of said antibodies or antigen binding fragments thereof.

Further embodiments of the invention include therapeutic antibodies of the invention or antigen binding fragments thereof coupled to a non-proteinaeous polymer such as polyethylene glycol (PEG), polypropylene glycol or polyoxyalkylene. Conjugation of proteins to PEG is an established technique for increasing half-life of proteins, as well as reducing antigenicity and immunogenicity of proteins. The use of PEGylation with different molecular weights and styles (linear or

59
61

branched) has been investigated with intact antibodies as well as Fab' fragments, see Koumenis I.L. *et al* (2000) Int.J.Pharmaceut. 198:83-95.

2. Competing antibodies

The present invention also contemplates antibodies and antigen binding fragments of antibodies which specifically bind hIL-13 and competitively inhibit, the binding to hIL-13 of the therapeutic antibody of the invention or antigen binding fragment thereof comprising a CDRH3 of SEQ.I.D.NO: 3 and/or a therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof comprising CDRs of SEQ.I.D.NO: 1,2,3,4,5 and 6 to hIL-13. In some embodiments, the therapeutic antibody is the murine antibody comprising a VH domain of SEQ.I.D.NO:7 and a VL domain of SEQ.I.D.NO:8. Such competing antibodies bind to the same, overlapping or spatially adjacent epitope of hIL-13 as that bound by the therapeutic antibody comprising CDRs of SEQ.I.D.NO:1, 2,3,4,5 and 6. The competing antibody or antibody fragment displays, at equimolar concentrations, at least 25% inhibition, typically 35% or greater, more typically at least 50% inhibition.

Thus in one embodiment of the invention there is provided a method of screening a candidate antibody or antibody fragment to determine whether the candidate antibody or antibody fragment is a competing antibody as herein described which method comprises the steps of;

(a) incubating the candidate antibody or antibody fragment with a therapeutic antibody comprising CDRH3 of SEQ.I.D.NO: 3, optionally further comprising CDRs of SEQ.I.D.NO: 1,2,4,5 and 6 (such as a murine therapeutic antibody having a VH domain of SEQ.I.D.NO:7 and a VL domain of SEQ.I.D.NO:8 or a humanised therapeutic antibody having a heavy chain of SEQ.I.D.NO: 18 and a light chain of SEQ.I.D.NO:22 or a

62

humanised therapeutic antibody having a heavy chain of SEQ.I.D.NO:19 and a light chain of SEQ.I.D.NO:23) or antigen binding fragment thereof; (b) determining whether the candidate antibody or antibody fragment thereof of step (a) competitively inhibits the binding of the therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof to hIL-13.

There is also provided a competing antibody or antigen binding fragment thereof which competitively inhibits the binding of a therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof which therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof comprises CDR having the sequences set forth in SEQ.I.D.NO: 1, 2,3,4,5 and 6.

In another embodiment there is provided a competing antibody or antigen binding fragment thereof which competitively inhibits the binding of a therapeutic antibody of the invention to hIL-13 which therapeutic antibody comprises a heavy chain of SEQ.I.D.NO:18 and a light chain of SEQ.I.D.NO:22.

A competing antibody or antigen binding fragment thereof maybe of any of the above antibody structures. For example, the competing antibody may be a primate or human intact antibody or a humanised antibody preferably of an IgG isotype e.g. IgG1 or IgG4. Competing antibody fragments maybe Fab, Fab', $F(ab')_2$, ScFv and the like. A competing antibody may be produced according to the methods disclosed within this present specification.

84
63

3. Production Methods

Antibodies of the invention maybe produced as a polyclonal population but are more preferably produced as a monoclonal population (that is as a substantially homogenous population of identical antibodies directed against a specific antigenic binding site). It will of course be apparent to those skilled in the art that a population implies more than one antibody entity. Antibodies of the present invention may be produced in transgenic organisms such as goats (see Pollock *et al* (1999), J.Immunol.Methods 231:147-157), chickens (see Morrow KJJ (2000) Genet.Eng.News 20:1-55, mice (see Pollock *et al*) or plants (see Doran PM, (2000) Curr.Opinion Biotechnol. 11, 199-204, Ma JK-C (1998), Nat.Med. 4; 601-606, Baez J *et al*, BioPharm (2000) 13: 50-54, Stoger E *et al*; (2000) Plant Mol.Biol. 42:583-590). Antibodies may also be produced by chemical synthesis. However, antibodies of the invention are typically produced using recombinant cell culturing technology well known to those skilled in the art. A polynucleotide encoding the antibody is isolated and inserted into a replicable vector such as a plasmid for further cloning (amplification) or expression. One useful expression system is a glutamate synthetase system (such as sold by Lonza Biologics), particularly where the host cell is CHO or NS0 (see below). Polynucleotide encoding the antibody is readily isolated and sequenced using conventional procedures (e.g. oligonucleotide probes). Vectors that may be used include plasmid, virus, phage, transposons, minichromsomes of which plasmids are a typical embodiment. Generally such vectors further include a signal sequence, origin of replication, one or more marker genes, an enhancer element, a promoter and transcription termination sequences operably linked to the light and/or heavy chain polynucleotide so as to facilitate expression. Polynucleotide encoding the light and heavy chains may be inserted into separate vectors and transfected into the same host cell or, if desired both the heavy chain and light chain can be inserted into the same vector for

transfection into the host cell. Thus according to one aspect of the present invention there is provided a process of constructing a vector encoding the light and/or heavy chains of a therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof of the invention, which method comprises inserting into a vector, a polynucleotide encoding either a light chain and/or heavy chain of a therapeutic antibody of the invention.

In other aspect of the invention there is provided a polynucleotide encoding a murine VH domain having the sequence set forth as SEQ.I.D.NO:24.

In another aspect of the invention there is provided polynucleotide encoding a murine VL domain having the sequence set forth as SEQ.I.D.NO: 25.

In another embodiment there is provided a polynucletotide encoding a VH domain having the sequence selected from the group consisting of SEQ.I.D.NO:26, 27, 28, 29.

In another embodiment there is provided a polynucletotide encoding a VL domain having the sequence selected from the group consisting of; SEQ.I.D.NO:30, 31.

In accordance with the present invention there is provided a polynucleotide encoding a heavy chain of the invention which polynucleotide is selected from the group consisting of; SEQ.I.D.NO:32, 33, 34, 35.

In accordance with the present invention there is provided a polynucleotide encoding a light chain of the invention which polynucleotide is selected from the group consisting of; SEQ.I.D.NO:36, 37.

It will be immediately apparent to those skilled in the art that due to the redundancy of the genetic code, alternative polynucleotides to those disclosed herein are also available that will encode the polypeptides of the invention.

3.1 Signal sequences

Antibodies of the present invention maybe produced as a fusion protein with a heterologous signal sequence having a specific cleavage site at the N terminus of the mature protein. The signal sequence should be recognised and processed by the host cell. For prokaryotic host cells, the signal sequence may be an alkaline phosphatase, penicillinase, or heat stable enterotoxin II leaders. For yeast secretion the signal sequences may be a yeast invertase leader, α factor leader or acid phosphatase leaders see e.g. WO90/13646. In mammalian cell systems, viral secretory leaders such as herpes simplex gD signal and a native immunoglobulin signal sequence are available. Typically the signal sequence is ligated in reading frame to DNA encoding the antibody of the invention.

3.2 Origin of replication

Origin of replications are well known in the art with pBR322 suitable for most gram-negative bacteria, 2μ plasmid for most yeast and various viral origins such as SV40, polyoma, adenovirus, VSV or BPV for most mammalian cells. Generally the origin of replication component is not needed for mammalian expression vectors but the SV40 may be used since it contains the early promoter.

3.3 Selection marker

64
66

Typical selection genes encode proteins that (a) confer resistance to antibiotics or other toxins e.g. ampicillin, neomycin, methotrexate or tetracycline or (b) complement auxiotrophic deficiencies or supply nutrients not available in the complex media. The selection scheme may involve arresting growth of the host cell. Cells, which have been successfully transformed with the genes encoding the therapeutic antibody of the present invention, survive due to e.g. drug resistance conferred by the selection marker. Another example is the so-called DHFR selection marker wherein transformants are cultured in the presence of methotrexate. In typical embodiments, cells are cultured in the presence of increasing amounts of methotrexate to amplify the copy number of the exogenous gene of interest. CHO cells are a particularly useful cell line for the DHFR selection. A further example is the glutamate synthetase expression system (Lonza Biologics). A suitable selection gene for use in yeast is the trp1 gene, see Stinchcomb *et al* Nature 282, 38, 1979.

3.4 Promoters

Suitable promoters for expressing antibodies of the invention are operably linked to DNA/polynucleotide encoding the antibody. Promoters for prokaryotic hosts include phoA promoter, Beta-lactamase and lactose promoter systems, alkaline phosphatase, tryptophan and hybrid promoters such as Tac. Promoters suitable for expression in yeast cells include 3-phosphoglycerate kinase or other glycolytic enzymes e.g. enolase, glyceralderhyde 3 phosphate dehydrogenase, hexokinase, pyruvate decarboxylase, phosphofructokinase, glucose 6 phosphate isomerase, 3-phosphoglycerate mutase and glucokinase. Inducible yeast promoters include alcohol dehydrogenase 2, isocytochrome C, acid phosphatase,

metallothionein and enzymes responsible for nitrogen metabolism or maltose/galactose utilization.

Promoters for expression in mammalian cell systems include viral promoters such as polyoma, fowlpox and adenoviruses (e.g. adenovirus 2), bovine papilloma virus, avian sarcoma virus, cytomegalovirus (in particular the immediate early gene promoter), retrovirus, hepatitis B virus, actin, rous sarcoma virus (RSV) promoter and the early or late Simian virus 40. Of course the choice of promoter is based upon suitable compatibility with the host cell used for expression. In one embodiment therefore there is provided a first plasmid comprising a RSV and/or SV40 and/or CMV promoter, DNA encoding light chain V region (VL) of the invention, κC region together with neomycin and ampicillin resistance selection markers and a second plasmid comprising a RSV or SV40 promoter, DNA encoding the heavy chain V region (VH) of the invention, DNA encoding the γ1 constant region, DHFR and ampicillin resistance markers

3.5 Enhancer element

Where appropriate, e.g. for expression in higher eukaroytics, an enhancer element operably linked to the promoter element in a vector may be used. Suitable mammalian enhancer sequences include enhancer elements from globin, elastase, albumin, fetoprotein and insulin. Alternatively, one may use an enhancer element from a eukaroytic cell virus such as SV40 enhancer (at bp100-270), cytomegalovirus early promoter enhancer, polyma enhancer, baculoviral enhancer or murine IgG2a locus (see WO04/009823). The enhancer is preferably located on the vector at a site upstream to the promoter.

3.6 Host cells

Suitable host cells for cloning or expressing vectors encoding antibodies of the invention are prokaroytic, yeast or higher eukaryotic cells. Suitable prokaryotic cells include eubacteria e.g. enterobacteriaceae such as *Escherichia* e.g. *E.Coli* (for example ATCC 31,446; 31,537; 27,325), *Enterobacter, Erwinia, Klebsiella Proteus, Salmonella* e.g. *Salmonella typhimurium*, Serratia e.g. *Serratia marcescans* and *Shigella* as well as Bacilli such as *B.subtills* and *B.licheniformis* (see DD 266 710), Pseudomonas such as *P.aeruginosa* and *Streptomyces*. Of the yeast host cells, *Saccharomyces cerevisiae, schizosaccharomyces pombe*, Kluyveromyces (e.g. ATCC 16,045; 12,424; 24178; 56,500), yarrowia (EP402, 226), *Pichia Pastoris* (EP183, 070, see also Peng *et al* J.Biotechnol. 108 (2004) 185-192), *Candida, Trichoderma reesia* (EP244, 234), *Penicillin, Tolypocladium* and *Aspergillus* hosts such as *A.nidulans* and *A.niger* are also contemplated.

Although Prokaryotic and yeast host cells are specifically contemplated by the invention, preferably however, host cells of the present invention are higher eukaryotic cells. Suitable higher eukaryotic host cells include mammalian cells such as COS-1 (ATCC No.CRL 1650) COS-7 (ATCC CRL 1651), human embryonic kidney line 293, baby hamster kidney cells (BHK) (ATCC CRL.1632), BHK570 (ATCC NO: CRL 10314), 293 (ATCC NO.CRL 1573), Chinese hamster ovary cells CHO (e.g. CHO-K1, ATCC NO: CCL 61, DHFR-CHO cell line such as DG44 (see Urlaub *et al*, (1986) Somatic Cell Mol.Genet.12, 555-556)), particularly those CHO cell lines adapted for suspension culture, mouse sertoli cells, monkey kidney cells, African green monkey kidney cells (ATCC CRL-1587), HELA cells, canine kidney cells (ATCC CCL 34), human lung cells (ATCC CCL 75), Hep G2 and myeloma or lymphoma cells e.g. NS0 (see US 5,807,715), Sp2/0, Y0.

Thus in one embodiment of the invention there is provided a stably transformed host cell comprising a vector encoding a heavy chain and/or light chain of the therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof as herein described. Preferably such host cells comprise a first vector encoding the light chain and a second vector encoding said heavy chain.

Bacterial fermentation

Bacterial systems are particularly suited for the expression of antibody fragments. Such fragments are localised intracellularly or within the periplasma. Insoluble periplasmic proteins can be extracted and refolded to form active proteins according to methods known to those skilled in the art, see Sanchez *et al* (1999) J.Biotechnol. 72, 13-20 and Cupit PM *et al* (1999) Lett Appl Microbiol, 29, 273-277.

3.7 Cell Culturing Methods.

Host cells transformed with vectors encoding the therapeutic antibodies of the invention or antigen binding fragments thereof may be cultured by any method known to those skilled in the art. Host cells may be cultured in spinner flasks, roller bottles or hollow fibre systems but it is preferred for large scale production that stirred tank reactors are used particularly for suspension cultures. Preferably the stirred tankers are adapted for aeration using e.g. spargers, baffles or low shear impellers. For bubble columns and airlift reactors direct aeration with air or oxygen bubbles maybe used. Where the host cells are cultured in a serum free culture media it is preferred that the media is supplemented with a cell protective agent such as pluronic F-68 to help prevent cell damage as a result of the

68
70

aeration process. Depending on the host cell characteristics, either microcarriers maybe used as growth substrates for anchorage dependent cell lines or the cells maybe adapted to suspension culture (which is typical). The culturing of host cells, particularly invertebrate host cells may utilise a variety of operational modes such as fed-batch, repeated batch processing (see Drapeau *et al* (1994) cytotechnology 15: 103-109), extended batch process or perfusion culture. Although recombinantly transformed mammalian host cells may be cultured in serum-containing media such as fetal calf serum (FCS), it is preferred that such host cells are cultured in synthetic serum –free media such as disclosed in Keen *et al* (1995) Cytotechnology 17:153-163, or commercially available media such as ProCHO-CDM or UltraCHO™ (Cambrex NJ, USA), supplemented where necessary with an energy source such as glucose and synthetic growth factors such as recombinant insulin. The serum-free culturing of host cells may require that those cells are adapted to grow in serum free conditions. One adaptation approach is to culture such host cells in serum containing media and repeatedly exchange 80% of the culture medium for the serum-free media so that the host cells learn to adapt in serum free conditions (see e.g. Scharfenberg *K et al* (1995) in *Animal Cell technology: Developments towards the 21st century* (Beuvery E.C. *et al* eds), pp619-623, Kluwer Academic publishers).

Antibodies of the invention secreted into the media may be recovered and purified using a variety of techniques to provide a degree of purification suitable for the intended use. For example the use of therapeutic antibodies of the invention for the treatment of human patients typically mandates at least 95% purity, more typically 98% or 99% or greater purity (compared to the crude culture medium). In the first instance, cell debris from the culture media is typically removed using centrifugation followed by a clarification step of the supernatant using e.g. microfiltration,

ultrafiltration and/or depth filtration. A variety of other techniques such as dialysis and gel electrophoresis and chromatographic techniques such as hydroxyapatite (HA), affinity chromatography (optionally involving an affinity tagging system such as polyhistidine) and/or hydrophobic interaction chromatography (HIC, see US 5, 429,746) are available. In one embodiment, the antibodies of the invention, following various clarification steps, are captured using Protein A or G affinity chromatography followed by further chromatography steps such as ion exchange and/or HA chromatography, anion or cation exchange, size exclusion chromatography and ammonium sulphate precipitation. Typically, various virus removal steps are also employed (e.g. nanofiltration using e.g. a DV-20 filter). Following these various steps, a purified (preferably monoclonal) preparation comprising at least 75mg/ml or greater e.g. 100mg/ml or greater of the antibody of the invention or antigen binding fragment thereof is provided and therefore forms an embodiment of the invention. Suitably such preparations are substantially free of aggregated forms of antibodies of the invention.

4. Pharmaceutical Compositions

Purified preparations of antibodies of the invention (particularly monoclonal preparations) as described *supra*, may be incorporated into pharmaceutical compositions for use in the treatment of human diseases and disorders such as atopic diseases e.g. asthma, allergic rhinitis, COPD. Typically such compositions comprise a pharmaceutically acceptable carrier as known and called for by acceptable pharmaceutical practice, see e.g. Remingtons Pharmaceutical Sciences, 16th edition, (1980), Mack Publishing Co. Examples of such carriers include sterilised carrier such as saline, Ringers solution or dextrose solution, buffered with suitable buffers to a pH within a range of 5 to 8. Pharmaceutical

70
72

compositions for injection (e.g. by intravenous, intraperitoneal, intradermal, subcutaneous, intramuscular or intraportal) or continuous infusion are suitably free of visible particulate matter and may comprise between 0.1ng to 100mg of antibody, preferably between 5mg and 25mg of antibody. Methods for the preparation of such pharmaceutical compositions are well known to those skilled in the art. In one embodiment, pharmaceutical compositions comprise between 0.1ng to 100mg of therapeutic antibodies of the invention in unit dosage form, optionally together with instructions for use. Pharmaceutical compositions of the invention may be lyophilised (freeze dried) for reconstitution prior to administration according to methods well known or apparent to those skilled in the art. Where embodiments of the invention comprise antibodies of the invention with an IgG1 isotype, a chelator of copper such as citrate (e.g. sodium citrate) or EDTA or histidine may be added to pharmaceutical composition to reduce the degree of copper-mediated degradation of antibodies of this isotype, see EP0612251. Anti-hIL-13 treatment maybe given orally, by inhalation, topically (for example, intraocular, intransnasal, rectal into wounds on the skin).

Effective doses and treatment regimes for administering the antibody of the invention are generally determined empirically and are dependent on factors such as the age, weight and health status of the patient and disease or disorder to be treated. Such factors are within the purview of the attending physician. Guidance in selecting appropriate doses may be found in e.g. Smith *et al* (1977) Antibodies in human diagnosis and therapy, Raven Press, New York but will in general be between 1mg and 1000mg.

74
73

Depending on the disease or disorder to be treated (but particularly asthma), pharmaceutical compositions comprising a therapeutically effective amount of the antibody of the invention may be used simultaneously, separately or sequentially with an effective amount of another medicament such as anti-inflammatory agents (e.g. corticosteroid or an NSAID), anticholinergic agents (particularly M1/M2/M3 receptor antagonists), β_2 adrenoreceptor agonists, antiinfective agents (e.g. antibiotics, antivirals), antihistamines, PDE4 inhibitor. Examples of β_2 adrenoreceptor agonists include salmeterol, salbutamol, formoterol, salmefamol, fenoterol, terbutaline. Preferred long acting β_2 adrenoreceptor agonists include those described in WO02/66422A, WO02/270490, WO02/076933, WO03/024439 and WO03/072539. Suitable corticosteroids include methyl prednisolone, prednisolone, dexamethasone, fluticasone propionate, 6α,9α-difluoro-17α-[(2-furanylcarbonyl)oxy]-11β-hydroxy-16α-methyl-3-oxo-androsta-1,4-diene-17β-carbothioic acid *S*-fluoromethyl ester, 6α,9α-difluoro-11β-hydroxy-16α-methyl-3-oxo-17α-propionyloxy- androsta-1,4-diene-17β-carbothioic acid *S*-(2-oxo-tetrahydro-furan-3S-yl) ester, beclomethasone esters (eg. the 17-propionate ester or the 17,21-dipropionate ester), budesonide, flunisolide, mometasone esters (eg. the furoate ester), triamcinolone acetonide, rofleponide, ciclesonide (16α,17-[[(*R*)-cyclohexylmethylene]bis(oxy)]-11β,21-dihydroxy-pregna-1,4-diene-3,20-dione), butixocort propionate, RPR-106541, and ST-126. Preferred corticosteroids include fluticasone propionate, 6α,9α-difluoro-11β-hydroxy-16α-methyl-17α-[(4-methyl-1,3-thiazole-5-carbonyl)oxy]-3-oxo-androsta-1,4-diene-17β-carbothioic acid *S*-fluoromethyl ester and 6α,9α-difluoro-17α-[(2-furanylcarbonyl)oxy]-11β-hydroxy-16α-methyl-3-oxo-androsta-1,4-diene-17β-carbothioic acid *S*-fluoromethyl ester, more preferably 6α,9α-difluoro-17α-[(2-furanylcarbonyl)oxy]-11β-hydroxy-16α-methyl-3-oxo-androsta-1,4-diene-17β-carbothioic acid *S*-fluoromethyl ester.

Non-steroidal compounds having glucocorticoid agonism that may posess selectivity for transrepression over transactivation and that may be useful in combination therapy include those covered in the following patents: WO03/082827, WO01/10143, WO98/54159, WO04/005229, WO04/009016, WO04/009017, WO04/018429, WO03/104195, WO03/082787, WO03/082280, WO03/059899, WO03/101932, WO02/02565, WO01/16128, WO00/66590, WO03/086294, WO04/026248, WO03/061651, WO03/08277.

Suitable anti-inflammatory agents include non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID's).

Suitable NSAID's include sodium cromoglycate, nedocromil sodium, phosphodiesterase (PDE) inhibitors (e.g. theophylline, PDE4 inhibitors or mixed PDE3/PDE4 inhibitors), leukotriene antagonists, inhibitors of leukotriene synthesis (eg. montelukast), iNOS inhibitors, tryptase and elastase inhibitors, beta-2 integrin antagonists and adenosine receptor agonists or antagonists (e.g. adenosine 2a agonists), cytokine antagonists (e.g. chemokine antagonists, such as a CCR3 antagonist) or inhibitors of cytokine synthesis, or 5-lipoxygenase inhibitors. Suitable other β_2-adrenoreceptor agonists include salmeterol (e.g. as the xinafoate), salbutamol (e.g. as the sulphate or the free base), formoterol (e.g. as the fumarate), fenoterol or terbutaline and salts thereof. An iNOS (inducible nitric oxide synthase inhibitor) is preferably for oral administration. Suitable iNOS inhibitors include those disclosed in WO93/13055, WO98/30537, WO02/50021, WO95/34534 and WO99/62875. Suitable CCR3 inhibitors include those disclosed in WO02/26722.

Of particular interest is use of the antibodies of the invention in combination with a phosphodiesterase 4 (PDE4) inhibitor. The PDE4-specific inhibitor useful in this aspect of the invention may be any compound that is known to inhibit the PDE4 enzyme or which is discovered to act as a PDE4 inhibitor, and which are only PDE4 inhibitors, not compounds which inhibit other members of the PDE family, such as PDE3 and PDE5, as well as PDE4.

Compounds of interest include *cis*-4-cyano-4-(3-cyclopentyloxy-4-methoxyphenyl)cyclohexan-1-carboxylic acid, 2-carbomethoxy-4-cyano-4-(3-cyclopropylmethoxy-4-difluoromethoxyphenyl)cyclohexan-1-one and *cis*-[4-cyano-4-(3-cyclopropylmethoxy-4-difluoromethoxyphenyl)cyclohexan-1-ol]. Also, *cis*-4-cyano-4-[3-(cyclopentyloxy)-4-methoxyphenyl]cyclohexane-1-carboxylic acid (also known as cilomilast) and its salts, esters, pro-drugs or physical forms, which is described in U.S. patent 5,552,438 issued 03 September, 1996; this patent and the compounds it discloses are incorporated herein in full by reference.

AWD-12-281 from Elbion (Hofgen, N. et al. 15th EFMC Int Symp Med Chem (Sept 6-10, Edinburgh) 1998, Abst P.98; CAS reference No. 247584020-9); a 9-benzyladenine derivative nominated NCS-613 (INSERM); D-4418 from Chiroscience and Schering-Plough; a benzodiazepine PDE4 inhibitor identified as CI-1018 (PD-168787) and attributed to Pfizer; a benzodioxole derivative disclosed by Kyowa Hakko in WO99/16766; K-34 from Kyowa Hakko; V-11294A from Napp (Landells, L.J. et al. Eur Resp J [Annu Cong Eur Resp Soc (Sept 19-23, Geneva) 1998] 1998, 12 (Suppl. 28): Abst P2393); roflumilast (CAS reference No 162401-32-3) and a pthalazinone (WO99/47505, the disclosure of which is hereby incorporated by reference) from Byk-Gulden; Pumafentrine, (-)-p-

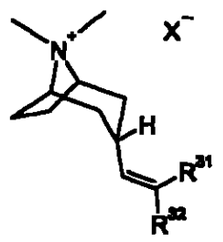
74
76

[(4aR*,10bS*)-9-ethoxy-1,2,3,4,4a,10b-hexahydro-8-methoxy-2-methylbenzo[c][1,6]naphthyridin-6-yl]-N,N-diisopropylbenzamide which is a mixed PDE3/PDE4 inhibitor which has been prepared and published on by Byk-Gulden, now Altana; arofylline under development by Almirall-Prodesfarma; VM554/UM565 from Vernalis; or T-440 (Tanabe Seiyaku; Fuji, K. et al. J Pharmacol Exp Ther,1998, 284(1): 162), and T2585.

Further compounds of interest are disclosed in the published international patent application WO04/024728 (Glaxo Group Ltd), PCT/EP2003/014867 (Glaxo Group Ltd) and PCT/EP2004/005494 (Glaxo Group Ltd).

Suitable anticholinergic agents are those compounds that act as antagonists at the muscarinic receptors, in particular those compounds which are antagonists of the M_1 or M_3 receptors, dual antagonists of the M_1/M_3 or M_2/M_3, receptors or pan-antagonists of the $M_1/M_2/M_3$ receptors. Exemplary compounds for administration via inhalation include ipratropium (e.g. as the bromide, CAS 22254-24-6, sold under the name Atrovent), oxitropium (e.g. as the bromide, CAS 30286-75-0) and tiotropium (e.g. as the bromide, CAS 136310-93-5, sold under the name Spiriva). Also of interest are revatropate (e.g. as the hydrobromide, CAS 262586-79-8) and LAS-34273 which is disclosed in WO01/04118. Exemplary compounds for oral administration include pirenzepine (CAS 28797-61-7), darifenacin (CAS 133099-04-4, or CAS 133099-07-7 for the hydrobromide sold under the name Enablex), oxybutynin (CAS 5633-20-5, sold under the name Ditropan), terodiline (CAS 15793-40-5), tolterodine (CAS 124937-51-5, or CAS 124937-52-6 for the tartrate, sold under the name Detrol), otilonium (e.g. as the bromide, CAS 26095-59-0, sold under the name Spasmomen), trospium chloride (CAS 10405-02-4) and solifenacin (CAS 242478-37-1, or CAS 242478-38-2 for the succinate also known as YM-905 and sold under the name Vesicare).

Other suitable anticholinergic agents include compounds of formula (XXI), which are disclosed in US patent application 60/487981:



(XXI)

in which the preferred orientation of the alkyl chain attached to the tropane ring is endo;

R^{31} and R^{32} are, independently, selected from the group consisting of straight or branched chain lower alkyl groups having preferably from 1 to 6 carbon atoms, cycloalkyl groups having from 5 to 6 carbon atoms, cycloalkyl-alkyl having 6 to 10 carbon atoms, 2-thienyl, 2-pyridyl, phenyl, phenyl substituted with an alkyl group having not in excess of 4 carbon atoms and phenyl substituted with an alkoxy group having not in excess of 4 carbon atoms;

X^- represents an anion associated with the positive charge of the N atom. X^- may be but is not limited to chloride, bromide, iodide, sulfate, benzene sulfonate, and toluene sulfonate,

including, for example:

(3-*endo*)-3-(2,2-di-2-thienylethenyl)-8,8-dimethyl-8-azoniabicyclo[3.2.1]octane bromide;

(3-*endo*)-3-(2,2-diphenylethenyl)-8,8-dimethyl-8-azoniabicyclo[3.2.1]octane bromide;

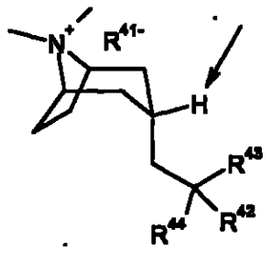
(3-*endo*)-3-(2,2-diphenylethenyl)-8,8-dimethyl-8-azoniabicyclo[3.2.1]octane 4-methylbenzenesulfonate;

(3-*endo*)-8,8-dimethyl-3-[2-phenyl-2-(2-thienyl)ethenyl]-8-azoniabicyclo[3.2.1]octane bromide; and/or

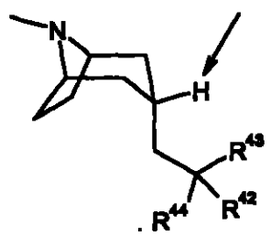
76
78

(3-*endo*)-8,8-dimethyl-3-[2-phenyl-2-(2-pyridinyl)ethenyl]-8-azoniabicyclo[3.2.1]octane bromide.

Further suitable anticholinergic agents include compounds of formula (XXII) or (XXIII), which are disclosed in US patent application 60/511009:



(XXII)



(XXIII)

wherein:

the H atom indicated is in the exo position;

R^{41-} represents an anion associated with the positive charge of the N atom. R1$^-$ may be but is not limited to chloride, bromide, iodide, sulfate, benzene sulfonate and toluene sulfonate;

R^{42} and R^{43} are independently selected from the group consisting of straight or branched chain lower alkyl groups (having preferably from 1 to 6 carbon atoms), cycloalkyl groups (having from 5 to 6 carbon atoms), cycloalkyl-alkyl (having 6 to 10 carbon atoms), heterocycloalkyl (having 5 to 6 carbon atoms) and N or O as the heteroatom, heterocycloalkyl-alkyl (having 6 to10 carbon atoms) and N or O as the heteroatom, aryl, optionally substituted aryl, heteroaryl, and optionally substituted heteroaryl;

R^{44} is slected from the group consisting of $(C_1\text{-}C_6)$alkyl, $(C_3\text{-}C_{12})$cycloalkyl, $(C_3\text{-}C_7)$heterocycloalkyl, $(C_1\text{-}C_6)$alkyl$(C_3\text{-}C_{12})$cycloalkyl, $(C_1\text{-}C_6)$alkyl$(C_3\text{-}C_7)$heterocycloalkyl, aryl, heteroaryl, $(C_1\text{-}C_6)$alkyl-aryl, $(C_1\text{-}C_6)$alkyl-heteroaryl, $-OR^{45}$, $-CH_2OR^{45}$, $-CH_2OH$, $-CN$, $-CF_3$, $-CH_2O(CO)R^{46}$, -

CO_2R^{47}, $-CH_2NH_2$, $-CH_2N(R^{47})SO_2R^{45}$, $-SO_2N(R^{47})(R^{48})$, $-CON(R^{47})(R^{48})$, $-CH_2N(R^{48})CO(R^{46})$, $-CH_2N(R^{48})SO_2(R^{46})$, $-CH_2N(R^{48})CO_2(R^{45})$, $-CH_2N(R^{48})CONH(R^{47})$;

R^{45} is selected from the group consisting of (C_1-C_6)alkyl, (C_1-C_6)alkyl(C_3-C_{12})cycloalkyl, (C_1-C_6)alkyl(C_3-C_7)heterocycloalkyl, (C_1-C_6)alkyl-aryl, (C_1-C_6)alkyl-heteroaryl;

R^{46} is selected from the group consisting of (C_1-C_6)alkyl, (C_3-C_{12})cycloalkyl, (C_3-C_7)heterocycloalkyl, (C_1-C_6)alkyl(C_3-C_{12})cycloalkyl, (C_1-C_6)alkyl(C_3-C_7)heterocycloalkyl, aryl, heteroaryl, (C_1-C_6)alkyl-aryl, (C_1-C_6)alkyl-heteroaryl;

R^{47} and R^{48} are, independently, selected from the group consisting of H, (C_1-C_6)alkyl, (C_3-C_{12})cycloalkyl, (C_3-C_7)heterocycloalkyl, (C_1-C_6)alkyl(C_3-C_{12})cycloalkyl, (C_1-C_6)alkyl(C_3-C_7)heterocycloalkyl, (C_1-C_6)alkyl-aryl, and (C_1-C_6)alkyl-heteroaryl, including, for example:

(Endo)-3-(2-methoxy-2,2-di-thiophen-2-yl-ethyl)-8,8-dimethyl-8-azonia-bicyclo[3.2.1]octane iodide;

3-((Endo)-8-methyl-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-yl)-2,2-diphenyl-propionitrile;

(Endo)-8-methyl-3-(2,2,2-triphenyl-ethyl)-8-aza-bicyclo[3.2.1]octane;

3-((Endo)-8-methyl-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-yl)-2,2-diphenyl-propionamide;

3-((Endo)-8-methyl-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-yl)-2,2-diphenyl-propionic acid;

(Endo)-3-(2-cyano-2,2-diphenyl-ethyl)-8,8-dimethyl-8-azonia-bicyclo[3.2.1]octane iodide;

(Endo)-3-(2-cyano-2,2-diphenyl-ethyl)-8,8-dimethyl-8-azonia-bicyclo[3.2.1]octane bromide;

3-((Endo)-8-methyl-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-yl)-2,2-diphenyl-propan-1-ol;

N-Benzyl-3-((endo)-8-methyl-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-yl)-2,2-diphenyl-propionamide;

(Endo)-3-(2-carbamoyl-2,2-diphenyl-ethyl)-8,8-dimethyl-8-azonia-bicyclo[3.2.1]octane iodide;

1-Benzyl-3-[3-((endo)-8-methyl-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-yl)-2,2-diphenyl-propyl]-urea;
1-Ethyl-3-[3-((endo)-8-methyl-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-yl)-2,2-diphenyl-propyl]-urea;
N-[3-((Endo)-8-methyl-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-yl)-2,2-diphenyl-propyl]-acetamide;
N-[3-((Endo)-8-methyl-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-yl)-2,2-diphenyl-propyl]-benzamide;
3-((Endo)-8-methyl-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-yl)-2,2-di-thiophen-2-yl-propionitrile;
(Endo)-3-(2-cyano-2,2-di-thiophen-2-yl-ethyl)-8,8-dimethyl-8-azonia-bicyclo[3.2.1]octane iodide;
N-[3-((Endo)-8-methyl-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-yl)-2,2-diphenyl-propyl]-benzenesulfonamide;
[3-((Endo)-8-methyl-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-yl)-2,2-diphenyl-propyl]-urea;
N-[3-((Endo)-8-methyl-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-yl)-2,2-diphenyl-propyl]-methanesulfonamide; and/or
(Endo)-3-[2,2-diphenyl-3-[(1-phenyl-methanoyl)-amino]-propyl]-8,8-dimethyl-8-azonia-bicyclo[3.2.1]octane bromide.

More preferred compounds useful in the present invention include:
(Endo)-3-(2-methoxy-2,2-di-thiophen-2-yl-ethyl)-8,8-dimethyl-8-azonia-bicyclo[3.2.1]octane iodide;
(Endo)-3-(2-cyano-2,2-diphenyl-ethyl)-8,8-dimethyl-8-azonia-bicyclo[3.2.1]octane iodide;
(Endo)-3-(2-cyano-2,2-diphenyl-ethyl)-8,8-dimethyl-8-azonia-bicyclo[3.2.1]octane bromide;
(Endo)-3-(2-carbamoyl-2,2-diphenyl-ethyl)-8,8-dimethyl-8-azonia-bicyclo[3.2.1]octane iodide;
(Endo)-3-(2-cyano-2,2-di-thiophen-2-yl-ethyl)-8,8-dimethyl-8-azonia-bicyclo[3.2.1]octane iodide; and/or

(Endo)-3-[2,2-diphenyl-3-[(1-phenyl-methanoyl)-amino]-propyl]-8,8-dimethyl-8-azonia-bicyclo[3.2.1]octane bromide.

Suitable antihistamines (also referred to as H1-receptor antagonists) include any one or more of the numerous antagonists known which inhibit H1-receptors, and are safe for human use. First generation antagonists, include derivatives of ethanolamines, ethylenediamines, and alkylamines, e.g diphenylhydramine, pyrilamine, clemastine, chlropheniramine. Second generation antagonists, which are non-sedating, include loratidine, desloratidine,terfenadine,astemizole,acrivastine, azelastine, levocetirizine fexofenadine and cetirizine.

Examples of preferred anti-histamines include loratidine, desloratidine, fexofenadine and cetirizine.

Other contemplated combinations include the use of antibodies of the invention in combination with an anti-IL-4 agent (e.g. anti-IL-4 antibody such as pascolizumab) and/or anti-IL-5 agent (e.g. anti-IL-5 antibody such as mepolizumab) and/or anti-IgE agent (e.g. anti-IgE antibody such as omalizumab (Xolair™) or talizumab).

Conveniently, a pharmaceutical composition comprising a kit of parts of the antibody of the invention or antigen binding fragment thereof together with such another medicaments optionally together with instructions for use is also contemplated by the present invention.

The invention furthermore contemplates a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of monoclonal therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof as herein described for use

80

82

in the treatment of diseases responsive to modulation of the interaction between hIL-13 and hIL-13R.

In accordance with the present invention there is provided a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of a monoclonal humanised therapeutic antibody which antibody comprises a VH domain selected from the group consisting of: SEQ.I.D.NO:11,12,13,14 and a VL domain selected from the group consisting of: SEQ.I.D.NO:15,16.

In accordance with the present invention there is provided a pharmaceutical composition comprising a monoclonal therapeutic antibody comprising a heavy chain selected from the group consisting of: SEQ.I.D.NO: 18,19,20,21 and a light chain selected from the group consisting of; SEQ.I.D.NO:22, 23.

In accordance with the present invention there is provided a pharmaceutical composition comprising a monoclonal therapeutic antibody comprising a heavy chain of SEQ.I.D.NO:18 and a light chain of SEQ.I.D.NO:22 and a pharmaceutically acceptable carrier.

In accordance with the present invention there is provided a pharmaceutical composition comprising a monoclonal antibody comprising (or consisting essentially of) a heavy chain of SEQ.I.D.NO:18 and a light chain of SEQ.I.D.NO:22 and a pharmaceutically acceptable carrier.

In accordance with the present invention there is provided a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and a therapeutically effective amount of a monoclonal population

82
83

of therapeutic antibody which therapeutic antibody comprises a heavy chain of SEQ.I.D.NO:18 and a light chain of SEQ.I.D.NO:22.

5. Clinical uses.

Antibodies of the invention may be used in the treatment of atopic diseases/ disorders and chronic inflammatory diseases/disorders. Of particular interest is their use in the treatment of asthma, such as allergic asthma, particularly severe asthma (that is asthma that is unresponsive to current treatment, including systemically administered corticosteroids; see Busse WW et al, J Allergy Clin. Immunol 2000, 106: 1033-1042), "difficult" asthma (defined as the asthmatic phenotype characterised by failure to achieve control despite maximally recommended doses of prescribed inhaled steroids, see Barnes PJ (1998), Eur Respir J 12:1208-1218), "brittle" asthma (defines a subgroup of patients with severe, unstable asthma who maintain a wide peak expiratory flow (PEF) variability despite high doses of inhaled steroids, see Ayres JG et al (1998) Thorax 58:315-321), nocturnal asthma, premenstrual asthma, steroid resistant asthma (see Woodcock AJ (1993) Eur Respir J 6:743-747), steroid dependent asthma (defined as asthma that can be controlled only with high doses of oral steroids), aspirin induced asthma, adult-onset asthma, paediatric asthma . Antibodies of the invention maybe used to prevent, reduce the frequency of, or mitigate the effects of acute, asthmatic episodes (*status asthmaticus*). Antibodies of the invention may also be used to reduce the dosing required (either in terms of amount administered or frequency of dosing) of other medicaments used in the treatment of asthma. For example, antibodies of the invention may be used to reduce the dosing required for steroid treatment of asthma such as corticosteroid treatment ("steroid sparing"). Other diseases or disorders that may be treated with antibodies of the invention include atopic dermatitis, allergic rhinitis,

82
84

Crohn's disease, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), eosinophilic esophagitis, fibrotic diseases or disorders such as idiopathic pulmonary fibrosis, progressive systemic sclerosis (scleroderma), hepatic fibrosis, hepatic granulomas, schistosomiasis, leishmaniasis, and diseases of cell cycle regulation, e.g. Hodgkins disease, B cell chronic lymphocytic leukaemia. Further diseases or disorders that may be treated with antibodies of the invention are detailed in the Background of the invention section above.

In one embodiment of the invention there is provided a method of treating a human patient afflicted with an asthmatic condition which is refractory to treatment with corticosteroids which method comprises the step of administering to said patient a therapeutically effective amount of an antibody of the invention.

In another embodiment there is provided a method of preventing an acute asthmatic attack in a human patient which method comprises the step of administering to said patient a therapeutically effective amount of an antibody of the invention.

In another embodiment there is provided a method of reducing the frequency of and/or mitigating the effects of an acute asthmatic attack in a human patient which method comprises the step of administering to said patient a therapeutically effective amount of an antibody of the invention.

In another embodiment of the invention there is provided a method of biasing T helper cell response towards a Th1 type response following an inflammatory and/or allergic insult in a human patient which method comprises administering to said patient a therapeutically effective amount of an antibody or antigen binding fragment thereof of the invention.

83

85

In another embodiment of the invention there is provided a method of treating a human patient having the Q130hIL-13 variant which patient is afflicted with asthma, such as severe asthma, said method comprising the step of administering to said patient a therapeutically effective amount of an antibody or antigen binding fragment thereof of the invention.

Although the present invention has been described principally in relation to the treatment of human diseases or disorders, the present invention may also have applications in the treatment of similar diseases or disorders in non-human mammals.

The present invention is now described by way of example only.

Exemplification

1.GENERATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AND CHARACTERISATION OF MOUSE MONOCLONAL ANTIBODY 6A1

Monoclonal antibodies (mAbs) are produced by hybridoma cells generally in accordance with the method set forth in E Harlow and D Lane, Antibodies a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. The result of the fusion of mouse myeloma cells with B-lymphocytes from mice immunised with the target antigen. The hybridoma cell is immortalised by the myeloma fusion partner while the capacity to produce antibodies is provided by the B lymphocyte.

Five SJL mice were immunised by intraperitoneal injection each with 2µg recombinant human IL-13 derived from E.Coli (Cambridge Bioscience, Cat. No. CH-013). An immunisation schedule was used to develop a high

86

84

titre anti-human IL-13 antibody immune response in the mice. After 5 immunisations over 64 days, the mice were culled and spleen cells harvested. Spleen cells from 3 of the mice were removed and B lymphocytes fused with mouse myeloma cells derived from P3X cells using PEG1500 (Boehringer) to generate hybridomas. Individual hybridoma cell lines were cloned by limiting dilution (E Harlow and D Lane, *supra*). Wells containing single colonies were identified microscopically and supernatants tested for activity. Cells from the most active clones were expanded for cryopreservation, antibody production etc.

Initially, hybridoma supernatants were screened for binding activity against an E.coli-expressed recombinant det-1 tagged human IL-13 protein (made in-house) in a sandwich assay format. A secondary screen of these positives was completed using a BIAcore™ method to detect for binding to the det-1 tagged human IL-13 protein. Samples from these hybridomas were then tested for ability to neutralise the bioactivity of E.coli-expressed recombinant human IL-13 (Cambridge Bioscience, cat. no CH-013) in a TF-1 cell bioassay.

Six positives identified from the human IL-13 neutralising bioassay were subcloned by limiting dilution to generate stable monoclonal cell lines. Immunoglobulins from these hybridomas, grown in cell factories under serum free conditions, were purified using immobilised Protein A columns. These purified mAbs were then re-screened in the following assay systems;

- Binding to E.coli-expressed recombinant human IL-13 (in a sandwich ELISA format)
- Inhibition of E.coli-expressed recombinant det-1 tagged human IL-13 binding to both IL-13 receptor chains (in a sandwich ELISA format)

87

85

- Neutralisation of either human or cynomolgus E.coli-expressed recombinant IL-13 (in a TF-1 cell bioassay)
- Neutralisation of mammalian-expressed human IL-13 (in a TF-1 cell bioassay)
- Neutralisation of an E.coli-expressed recombinant Q130 human IL-13 variant (in a TF-1 cell bioassay)
- Specificity for binding to human IL-13 by assessment of mAb cross-reactivity to human IL-4 in an anti-IL-4 ELISA and assessment of mAb cross-reactivity to human IL5 in an IL5 neutralisation bioassay
- BIAcore™ analysis for binding affinity measurements to human IL-13

Monoclonal antibody 6A1 was identified as an antibody that neutralised both human and cynomolgus IL-13 bioactivity. The following analyses describe the profile for monoclonal antibody 6A1 in these assays.

1.1 Binding to E.Coli-expressed recombinant human IL-13

6A1 bound E.Coli-expressed recombinant human IL-13 in a sandwich ELISA, method substantially as described in section 7. See Figure 1.

1.2 Inhibition of E.Coli-expressed recombinant det-1 tagged human IL-13 binding to IL-13Rα1 and IL-13Rα2 in an ELISA format

6A1 inhibited the binding of E.Coli-expressed recombinant det-1 tagged human IL-13 to both human IL-13 receptor chains. In addition, it inhibited binding more effectively than a commercially available anti-human IL-13 polyclonal and an anti-human IL-13 monoclonal antibody reagent (sourced

88

from R&D Systems). An IC_{50} value of 0.165µg/ml was calculated for the inhibition of human IL-13 binding to human IL-13Rα1 by monoclonal antibody 6A1. An IC_{50} value of 0.056µg/ml was calculated for the inhibition of human IL-13 binding to human IL-13Rα2 by monoclonal antibody 6A1. See Figures 2A and 2B. A control IgG of irrelevant specificity had no detectable activity.

1.3 Neutralisation of E.Coli-expressed recombinant human and cynomolgus IL-13 in a TF-1 cell proliferation bioassay

TF-1 cells can proliferate in response to human IL-13 and cynomolgus IL-13. A bioassay was developed to assess the neutralisation capacity of an anti-IL-13 mAb on human and cynomolgus IL-13-induced TF-1 cell proliferation. 6A1 neutralised the bioactivty of both recombinant human and cynomolgus IL-13 in a TF-1 cell bioassay. In addition, it neutralised both human and cynomolgus IL-13 more potently than commercially available anti-human IL-13 polyclonal and anti-human IL-13 monoclonal antibody reagents (sourced from R&D Systems). See Figure 3.

An average ND_{50} value of 0.0783µg/ml was calculated for the neutralisation of 5ng/ml E.Coli-expressed recombinant human IL-13 bioactivity in a TF-1 cell bioassay by monoclonal antibody 6A1. An ND_{50} value of 0.04µg/ml was calculated for the neutralisation of 5ng/ml E.Coli-expressed recombinant cynomolgus IL-13 bioactivity in a TF-1 cell bioassay by monoclonal antibody 6A1. [The ND_{50} (neutralisation dose) value is the concentration of monoclonal antibody required to reduce TF-1 cell proliferation by 50%, in response to a set concentration of IL-13].

1.4 Neutralisation of mammalian-expressed (CHO cell) human IL-13 in a TF-1 cell proliferation bioassay

The neutralisation capacity of monoclonal antibody 6A1 for human IL-13 expressed from CHO cells was assessed in a TF-1 cell proliferation assay. 6A1 neutralised mammalian-expressed human IL-13 more potently than a commercially available anti-human IL-13 polyclonal reagent as measured by ND_{50} values. An ND_{50} value of 0.037µg/ml was calculated for the neutralisation of ~ 50ng/ml mammalian-expressed human IL-13 in a TF-1 cell bioassay by monoclonal antibody 6A1. See Figure 4.

1.5 Neutralisation of recombinant Q130 human IL-13 variant in a TF-1 cell proliferation bioassay

The neutralisation capacity of monoclonal antibody 6A1 for E.Coli-expressed recombinant Q130 human IL-13 (Peprotech, Cat. No. 200-13A) was assessed in a TF-1 cell proliferation assay. 6A1 neutralised Q130 human IL-13 more potently than a commercially available anti-human IL-13 polyclonal reagent. An ND_{50} value of 0.11µg/ml was calculated for the neutralisation of 60ng/ml Q130 human IL-13 bioactivity in a TF-1 cell bioassay by monoclonal antibody 6A1. See Figure 5.

1.6 Specificity for binding to human IL-13

As human IL-4 shares the most identity with human IL-13 both structurally and functionally, the specificity of monoclonal antibody 6A1 for human IL-13 was assessed in a human IL-4 binding ELISA. 6A1 did not detectably bind E.coli-expressed recombinant human IL-4, indicating the high level of specificity of this monoclonal antibody for human IL-13. In addition, 6A1 did not detectably cross-neutralise the bioactivity of E.Coli-expressed recombinant human IL5 in a TF-1 cell bioassay. See Figures 6 and 7.

90

88

1.7 BIAcore™ analysis

The affinity of 6A1 for recombinant human and cynomolgus IL-13 was assessed by BIAcore™ analysis. See Table 1.

Table 1.

IL13 sample	On rate Ka (1/Ms)	Off rate Kd (1/s)	Affinity constant (KD)
det-1 tagged human IL13	2.25×10^{6}	7.2×10^{-5}	32 pM
human IL13 (CA)	6.82×10^{5}	1.84×10^{-4}	270 pM
cyno IL13 (CA)	9.14×10^{5}	5.6×10^{-5}	61.2 pM

These data indicate that 6A1 has an affinity for both human and cynomolgus IL-13. [Two different human IL-13 samples (both generated in E.Coli) were used for this analysis. IL-13 is substantially insoluble when produced in E.Coli but can be solubilised and then refolded *in vitro*. Differences in the quality of the two refolded IL-13 samples may explain the difference in binding affinities for each of these human IL-13 samples].

2. CLONING OF VARIABLE REGIONS OF CLONE 6A1

Total RNA was extracted from clone 6A1 hybridoma cells and the cDNA of the heavy and light variable domains was produced by reverse transcription using primers specific for the murine leader sequence and the antibody constant regions according to the pre-determined isotype (IgG1/κ). The cDNA of the variable heavy and light domains was then cloned into vector pCR2.1 for sequencing.

91

89

2.1 RNA extraction

Total RNA was extracted from pellets of approximately 10^6 cells of hybridoma clone 6A1 using the SV Total RNA Isolation System from Promega according to manufacturer's instructions.

2.2 Reverse transcription

RNA was reverse transcribed to produce cDNA of the variable heavy and light domains using primers specific for the murine leader sequences and murine IgG1/κ constant regions. The mixture of primers used is set forth in Jones ST and Bendig MM Bio/technology 9:88-89 (1991)

Pools of murine V_H and V_L leader sequence forward primers were prepared at 50μM. Solutions of the murine IgG1 and κ constant region reverse primers were also prepared at 50μM.

2.3 Reverse Transcription PCR (RT-PCR)

Reverse transcription of the RNA encoding the variable heavy and light regions were carried out in duplicates using the Access RT-PCR System from Promega according to manufacturer's instructions. VH and VL forward and reverse primers were as described above.

2.4 Gel purification of RT-PCR product

The products of RT-PCR ($2xV_H$ and $2xV_L$) were loaded in gel loading solution on a preparative 1% agarose gel containing 0.01% ethidium bromide and run in TAE buffer at 100V for 1hour and the V region bands excised. A 100bp DNA ladder was also run on the gel to allow identification of the V_H and V_L bands.

92

The DNA fragments were extracted and purified from the gel using the QIAquick ™Gel extraction kit from Qiagen according to manufacturer's instructions.

2.5 Ligation

The purified RT-PCR fragments ($2xV_H$ and $2xV_L$) were cloned into the pCR2.1 vector using the TA cloning kit from Invitrogen according to manufacturer's instructions.

2.6 Transformation

Ligated plasmids were transformed into TOP10F' cells according to TA cloning kit instructions. 50µl and 200µl of transformed cells were spread on L-agar plates containing 100µg/ml ampicillin and coated with 8µl of 500mM IPTG solution and 16µl of 50mg/ml X-Gal solution in DMF. Plates were incubated overnight at 37°C.

2.7 Sequencing

Colonies were picked and cultured overnight at 37°C in 5ml LB medium supplemented with 100µg/ml ampicillin.
pCR2.1 plasmids containing 6A1 V_H and V_L domains were extracted and purified using the Qiagen QIAprep Spin Miniprep kit according to manufacturer's instructions. The V_H and V_L domains were sequenced using primers T7, M13 forward and M13 reverse.

6A1 V_H region amino acid sequence (consensus of 10 clones from 2 RT-PCR reactions):

SEQ.I.D.NO:7

6A1 V_L region amino acid sequence (consensus of 10 clones from 2 RT-PCR reactions):

SEQ.I.D.NO:8

3. CHIMAERIC ANTIBODY

A chimaeric antibody consisting of parent murine V regions (described in section 2.7) was grafted onto human IgG1/k wild type C regions, this was designed to confirm the cloning of the correct murine V regions and also to be used as a reference when testing humanised constructs. The chimaeric antibody was expressed in CHO cells, purified and tested for binding to human IL-13 by ELISA.

3.1 PCR amplification

The cloned murine V regions were amplified by PCR to introduce restriction sites required for cloning into mammalian expression vectors Rld and Rln. Hind III and Spe I sites were designed to frame the V_H domain and allow cloning into a modified Rld vector containing the human γ1 wild type C region. Hind III and BsiW I sites were designed to frame the V_L domain and allow cloning into a modified Rln vector containing the human κ C region.

V_H forward primer:
5'-GAT GAA GCT TGC CAC CAT GAA ATG CAG CTG GGT CAT C-3'
(SEQ.I.D.NO:86)
The Hind III restriction site is underlined and Kozak sequence in bold.

V_H reverse primer:

94

92

5'-GAT GGA CTA GTG TTC CTT GAC CCC AGT A -3' (SEQ.I.D.NO:87)
The Spe I restriction site is underlined.

V_L forward primer:
5'-GAT GAA GCT TGC CAC CAT GAA GTT GCC TGT TAG GCT G-3' (SEQ.I.D.NO:88)
The Hind III restriction site is underlined and Kozak sequence in bold.

V_L reverse primer:
5'-GAT GCG TAC GTT TGA TTT CCA GCT TGG TGC C-3' (SEQ.I.D.NO:89)
The BsiW I restriction site is underlined

PCR reaction:	water	66µl
	10x PCR buffer	10µl
	dNTP (2mM)	10µl
	primer 1 (5µM)	4µl
	primer 2 (5µM)	4µl
	AmpliTaq polymerase	2µl
	purified plasmid	4µl
	total vol	100µl

Primer 1: V_H or V_L forward primer
Primer 2: V_H or V_L reverse primer

Purified plasmid: pCR2.1 V_H or V_L plasmid purified by Qiagen Minipreps (diluted 200x)

PCR cycle: 1- 95°C for 4min
2- 95°C for 1min

95

93

3- 55°C for 1min
4- 72°C for 1min
5- 72°C for 7min
steps 2 to 4: were repeated 30 times

3.2 Cloning into mammalian expression vectors

The PCR products were purified using the MinElute PCR Purification kit from Qiagen according to manufacturer's instructions.

The V_H PCR product and Rld hCγ1wt mammalian expression vector were digested Hind III-Spe I:

10x buffer (NEBuffer2)	5µl
BSA 100x (NEB)	0.5µl
DNA	5µl
Hind III (Promega)	2µl
Spe I (NEB)	2µl
water	35.5µl
total vol	50µl

DNA: purified V_H PCR product or Rld hCγ1wt vector (at 0.25mg/ml)
Incubated at 2h at 37°C.

The V_L PCR product and Rln hCκ mammalian expression vector were digested Hind III-BsiW I:

10x buffer (NEBuffer2)	5µl
DNA	5µl

96
94

Hind III (Promega)	2µl
water	38µl
total vol	50µl

DNA: purified V_L PCR product or RIn hCκ vector (at 0.25mg/ml) incubated at 2h at 37°C. 2µl of BsiW I (NEB) was added and incubated 2h at 55°C.

The products of restriction digests were loaded in gel loading solution on a preparative 1% agarose gel containing 0.01% ethidium bromide and run in TAE buffer at 100V for 1hour and the RId and RIn vector as well as V_H and V_L PCR fragment bands were excised. A 100bp DNA ladder was also run on the gel to allow identification of the V_H, V_L and vector bands. The DNA was extracted and purified from the gel using the QIAquick Gel extraction kit from Qiagen according to manufacturer's instructions.
The V_H PCR fragment Hind III-Spe I digested was ligated into the RId hCγ1wt vector Hind III-Spe I digested. The V_L PCR fragment Hind III-BsiW I digested was ligated into the RIn hCκ vector Hind III-BsiW I digested.
The ligation was carried out using the LigaFast Rapid DNA Ligation System from Promega according to manufacturer's instructions providing:

V_H: vector: RId hCγ1wt Hind III-Spe I digested
insert: V_H PCR fragment Hind III-Spe I digested

V_L: vector: RIn hCκ Hind III-BsiW I digested
insert: V_L PCR fragment Hind III-BsiW I digested

Ligated products were transformed into DH5α competent cells. 200µl DH5α vials were thawed on ice. 50µl aliquots were prepared in

transformation tubes. 2µl of ligation mixture was added and mixed gently with a pipette tip followed by incubation for 30min on ice. The mixture was incubated for 45sec at 42°C without shaking. This was then transferred to ice for 2min. 450µl SOC medium was added and the tubes incubated for 1h at 37°C on shaker incubator. 100µl of culture was spread on L-agar plates supplemented with 100µg/ml ampicillin and incubated overnight at 37°C.

3.3 Sequencing

V_H and V_L clones were cultured overnight at 37°C in 5ml LB medium supplemented with 100µg/ml ampicillin. Rld and Rln plasmids containing V_H and V_L domains respectively were extracted and purified using the QIAprep Spin Miniprep kit from Qiagen according to manufacturer's instructions. The V_H region was sequenced using forward primers in the Rld vector and signal sequence and reverse primer in the human Cγ1 region.

The V_L region was sequenced using forward primers in the Rln vector and signal sequence and reverse primer in the human Cκ region. Clones with the correct V_H and V_L sequences were identified and plasmids prepared for expression in CHO cells.

3.4 Chimaeric antibody expression in CHO cells

Rld and Rln plasmids containing 6A1 V_H and V_L domains respectively were transiently co-transfected into CHO cells and expressed. The chimaeric antibody produced was purified from cell culture supernatant by affinity chromatography on Protein A Sepharose.

3.4.1 Plasmid purification

DH5α cells containing Rid-6A1V_H and Rln-6A1V_L plasmids were cultured in 5ml of LB media supplemented with 100μg/ml ampicillin for 8h at 37°C in a shaker incubator. 200ml of LB media supplemented with 100μg/ml ampicillin was inoculated with 1ml of day culture and incubated overnight at 37°C in a shaker incubator. The plasmids were extracted and purified using the QIAfilter Plasmid Maxi kit from Qiagen according to manufacturer's instructions. The ethanol pellet was resuspended in 200μl TE buffer and plasmid concentration was measured by absorbance at 260nm after 100-fold dilution of stock solution.

3.4.2 Transfection

CHO cells were cultured to confluence in Dulbecco's MEM with Glutamax-1 (DMEM) media supplemented with Ultra Low Fetal Bovine Serum and 1% Penicillin-Streptomycin in 4x175cm^2 BD Falcon tissue culture flasks at 37°C.

For each flask, in a 50ml Falcon tube, the following were added and mixed:

8ml Optimem 1 with Glutamax-1
20μg Rid-6A1V_H purified plasmid
20μg Rln-6A1V_L purified plasmid
240μl TransFast Transfection Reagent under vortex

The mixture was incubated for 10-15min at RT. DMEM media was removed from flask then the mixture was vortexed and added to flask. The mixture was incubated at 37°C for 1h. 32ml Optimem was added to the flask and incubated at 37°C for 48-72h.

3.4.3 Purification of chimaeric antibody

Media from all 175cm^2 flasks were pooled and centrifuged at 1500rpm for 3min on an MSE Mistral 2000 and supernatant passed through a 500mL Filter System 0.22µm CA. The antibody was purified from clarified supernatant on an Amersham Biosciences Akta Explorer using Unicorn software. The column used was a 1ml HiTrap rProtein A Sepharose FF. The flow rate was 1ml/min.

The column was equilibrated with 10CV of Dulbecco's PBS then loaded with clarified supernatant through pump A. The column was washed with 20CV of Dulbecco's PBS, pump A was washed to waste and a further 10CV of Dulbecco's PBS was passed through the column to ensure complete clearance of supernatant.

The antibody was eluted with 10CV of ImmunoPure IgG Elution Buffer (Pierce) and collected in 1ml fractions containing 100µl of 1M Trizma-HCl pH8.0 neutralisation buffer. The column was re-equilibrated with 5CV of Dulbecco's PBS.

Antibody in eluate fractions was quantified by reading the absorbance at 280nm against a blank solution containing 10 volumes of ImmunoPure IgG Elution Buffer + 1 volume of 1M Trizma-HCl pH8.0 and fractions with sufficient amounts of pure antibody were pooled and stored in 100µl aliquots at –20°C.

3.4.4 Analysis of chimaeric antibody

Supernatant and purified 6A1 chimaeric antibody (6A1c) were analysed in human and cynomolgus IL-13 binding ELISAs.

Supernatant from CHO cells transiently transfected with chimaeric 6A1 monoclonal antibody, bound both E.coli-expressed recombinant human and cynomolgus IL-13 in a sandwich ELISA. Purified antibody also bound

both E.coli-expressed recombinant human and cynomolgus IL-13 in the sandwich ELISA (data not shown). See Figure 8.

The amino acid sequence and a cDNA sequence for cynomolgus IL-13 (including signal sequence) is set forth as SEQ.I.D.NO:90 and 91 respectively.

These results confirm that the correct 6A1 variable regions have been cloned successfully to produce an antigen binding chimaeric antibody capable of binding both human and cynomologus IL-13.

4. HUMANISATION OF CLONE 6A1

4.1 Humanisation strategy

4.1.1 Search of the mouse database

12 mouse sequences with the highest homology for the 6A1 V_H amino acid sequence and 11 mouse sequences with the highest homology for the V_L amino acid sequence were identified by searching a peptide database (Genbank)

The 6A1 V_H amino acid sequence was compared to all 12 mouse sequences from the database search and the following framework residues were identified as significant:

Position	6A1 VH	mouse	occurrence
19	R	K	12/12
38	I	K	12/12
81	R	Q	12/12

99
101

Position is according to the Kabat *et al* numbering system.
The 6A1 V_L amino acid sequence was compared to 11 mouse sequences from the database search no framework residues were identified as significant.

5

4.1.2. Search of the human database

Human framework sequences with the highest homology to 6A1 V_H and V_L frameworks were identified using the EasyBlast in a peptide database.

10

One set of human sequences were identified for 6A1 V_H of which the following framework was selected for humanisation:
SEQ.I.D.NO:92

15 The following framework residues were identified as potentially important in recovering affinity and may need to be backmutated:

Position (Kabat#)	Human V_H	6A1 V_H
19	K	R
20 38	R	I
73	E	T
81	E	R

4 humanised V_H constructs with different backmutations were designed,
25 one as a straight graft according to the definitions of CDR given above (A1), the others with various backmutations (A2, A3, A4).
Therefore
A2 is A1 plus R38I
A3 is A2 plus E73T

A4 is A3 plus K19R plus E81R

One set of human sequences was identified for 6A1 V_L of which the following framework was selected for humanisation:

SEQ.I.D.NO:93

The following residues were identified as potentially important in recovering affinity and may need to be backmutated:

Position (Kabat#)	mouse 6A1 V_L	Human V_L
85	V	I

Two constructs were designed, one as a straight graft (L1), the other with the backmutation (L2) (i.e. L1 with I85V).

Humanised V_H construct A1:

SEQ.I.D.NO:11

Humanised V_H construct A2:

SEQ.I.D.NO:12

Humanised V_H construct A3:

SEQ.I.D.NO:13

Humanised V_H construct A4:

SEQ.I.D.NO:14

Humanised V_L construct L1:

SEQ.I.D.NO:15

Humanised V_L construct L2:

SEQ.I.D.NO:16.

4.2 Humanisation of 6A1

Humanised V_H and V_L constructs were prepared *de novo* by build up of overlapping oligonucleotides including restriction sites for cloning into Rld and Rln mammalian expression vectors as well as a human signal sequence. Hind III and Spe I restriction sites were introduced to frame the V_H domain containing the human signal sequence for cloning into Rld containing the human γ1 wild type constant region. Hind III and BsiW I restriction sites were introduced to frame the V_L domain containing the human signal sequence for cloning into Rln containing the human kappa constant region.

Human signal sequence: SEQ.I.D.NO:17

4 humanised V_H constructs and two humanised V_L constructs were designed. This would result in 8 different heavy chain-light chain combinations.

Approximately 10 oligonucleotides of approximately 60 bases long with approximately 18 base overlap were designed for build up.

4.2.1 Oligonucleotide Build-up

Oligonucleotide pool solutions were prepared from 5µl of each oligo stock solution at 100µM. Synthesis of the humanised V_H and V_L genes by build

104
102

up of overlapping oligonucleotides was carried out generally according to Stemmer WP et al.(1995) Gene 164(1):49-53 using software described in Ertl PF et al (2003) Methods 31:199-206.

4.2.1.1 Representative assembly PCR reaction:

water	41.5µl
10xProofStart PCR buffer	5µl
dNTP (10mM)	1.5µl
oligo pool	1µl
ProofStart DNA Polymerase	1µl
total vol	50µl

Assembly PCR cycle:

1- 94°C for 2min
2- 94°C for 30sec
3- 40°C for 2min
4- 72°C for 10sec
5- 94°C for 15sec
6- 40°C for 30sec
7- 72°C for 20sec + 3sec/cycle

steps 4 to 7 were repeated 25 times

4.2.1.2 Representative Recovery PCR

Primers 1 and 2 were the first upper and lower oligonucleotides used in the assembly PCR. The recovery PCR allows the amplification of the complete V gene.

Recovery PCR reaction:

water	42µl
10xProofStart PCR buffer	4µl
dNTP (10mM)	1.5µl
primer 1 (100µM)	0.5µl

primer 2 (100μM)	0.5μl
assembly PCR reaction	1μl
ProofStart DNA Polymerase	0.5μl
total vol	50μl

Recovery PCR cycle:
1- 94°C for 2min
2- 94°C for 45sec
3- 60°C for 30sec
4- 72°C for 2min
5- 72°C for 4min
steps 2 to 4 were repeated 25 times

The recovery PCR products were purified using the MinElute PCR Purification kit from Qiagen according to manufacturer's instructions.

4.2.2 Restriction digests

Humanised 6A1 V_H constructs A1, A2, A3, A4 were digested with Hind III-Spe I, humanised 6A1 V_L constructs L1, L2 were digested with Hind-III-BsiW I as described similarly to section 3.

4.2.3 Gel purification

The products of restriction digest were purified similarly to section 3.

4.2.4 Ligation

The 6A1 humanised V_H fragments Hind III-Spe I digested were ligated into the RId hCγ1wt vector Hind III-Spe I digested.

The 6A1 humanised V_L fragments Hind III-BsiW I digested were ligated into the RIn hCκ vector Hind III-BsiW I digested.

The ligation was carried out using the LigaFast Rapid DNA Ligation System from Promega according to manufacturer's instructions.

4.2.5 Transformation

Similarly as described previously in section 3

4.2.6 Representative sequencing method

Colonies from each reaction plate were cultured overnight at 37°C in 5ml LB medium supplemented with 100μg/ml ampicillin. Plasmids were extracted and purified using the QIAprep Spin Miniprep kit from Qiagen according to manufacturer's instructions and sequenced using primers described previously in section 3. Clones with the correct humanised V_H and V_L sequences were identified and plasmids prepared for expression in CHO cells.

5. EXPRESSION AND CHARACTERISATION OF HUMANISED ANTIBODIES

Four humanised V_H constructs (A1, A2, A3, A4) and two humanised V_L constructs (L1 and L2) were prepared in RId hCγ1wt and RIn hCκ mammalian expression vectors. Eight plasmid heavy chain-light chain combinations (A1L1, A1L2, A2L1, A2L2, A3L1, A3L2, A4L1, A4L2) were transiently co-transfected into CHO cells and expressed at small scale to give 8 different humanised antibodies. The antibodies produced in the CHO cell supernatant were analysed in the human IL-13 binding ELISA.

107

105

5.1 Representative Plasmid purification method

DH5α cells containing one of the plasmids described above were cultured in 5ml of LB media supplemented with 100μg/ml ampicillin for 8h at 37°C in a shaker incubator. 200ml of LB media supplemented with 100μg/ml ampicillin was inoculated with 1ml of day culture and incubated overnight at 37°C in a shaker incubator. The plasmids were extracted and purified using the QIAfilter Plasmid Maxi kit from Qiagen according to manufacturer's instructions. The ethanol pellet was resuspended in 200μl TE buffer and plasmid concentration was measured by absorbance at 260nm after 100 fold dilution of stock solution.

5.2 Representative Transfection method

9 wells of Corning Costar 3506 6-well plates were seeded with 10^6 CHO cells and cultured overnight in Dulbecco's MEM with Glutamax-1 (DMEM) media supplemented with Ultra Low Fetal Bovine Serum and 1% Penicillin-Streptomycin at 37°C.

For each well, the following were added in a 5ml Bijou so that each transfection contained a diffferent combination of light and heavy chains.

:

1ml Optimem 1 with Glutamax-1

5μg plasmid carrying humanised V_H

5μg plasmid carrying humanised V_L

30μg TransFast Transfection Reagent under vortex

Incubation took place for 10-15 min at room temperature. DMEM media was removed from wells then vortex mixture and added to the appropriate well. Incubation took place at 37°C for 1h. 2ml Optimem was added per well and incubated at 37°C for 48-72h.

108

5.3 Analysis of humanised antibodies

Media from each well was recovered and centrifuged at 13000rpm for 1min on an Eppendorf 5415R bench centrifuge and supernatant passed through a 0.2µm Pall Acrodisc 25mm syringe filter. Cell supernatant was assessed for binding to human IL-13 in an ELISA. All 8 humanised antibodies bound human IL-13 with a similar profile to the 6A1 chimaeric antibody in a human IL-13 binding ELISA. See figure 9.

Humanised antibodies L1+A1 and L2+A1 were selected for expression scale-up, purification and further analysis.

6. ASSESSMENT OF HUMANISED ANTI-HUMAN IL-13 ANTIBODIES L1+A1 AND L2+A1

6.1 Activity in human and cynomolgus IL-13 binding ELISAs

L1+A1 and L2+A1 were successfully generated from scale-up and assessed for binding to *E.coli*-expressed human and cynomolgus IL-13 by ELISA. See figures 10a and 10b and Table B.

Table B

ELISA	mAb	EC_{50} (µg/ml)
Human IL-13 binding	6A1 parental mAb	0.049
	chimaeric 6A1	0.015
	L1+A1	0.018
	L2+A1	0.024
Cynomolgus IL-13 binding	6A1 parental mAb	0.039
	chimaeric 6A1	0.018
	L1+A1	0.021
	L2+A1	0.028

Both L1+A1 and L2+A1 bound *E.coli*-expressed human and cynomolgus IL-13 with a similar profile. EC_{50} values (generated using an Excel

'Robosage' curve fitting function) indicated binding activity is very similar to the chimaeric 6A1 mAb standard.

6.2 Assessment of L1+A1 and L2+A1 for binding to native (PBMC derived) human IL-13

Supernatant from CD4+ Th2 cells (generated from human PBMC cultures) stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 was used to assess the binding of chimaeric 6A1 mAb, L1+A1 and L2+A1 to native (PBMC derived) human IL-13. In an ELISA, all 3 antibodies bound native human IL-13 in the Th2 cell supernatant with very similar performance to that of the parental 6A1 mAb. See figure 11.

In addition, a standard curve was generated using commercially available reagents, to determine the level of native human IL-13 present in the Th2 cell supernatant. All 3 antibodies and a commercially available anti-human IL-13 mAb detected equivalent amounts of IL-13 in the Th2 supernatant sample. See Table 2 below.

Table 2

mAb	Native IL-13 (ng/ml)
6A1 parental mAb	22.5
chimaeric 6A1	19.6
L1+A1	25.1
L2+A1	22.7
+ control mAb	28.0

110
108

6.3 Inhibitory activity of L1+A1 and L2+A1 for human IL-13 in IL-13 receptor binding ELISAs

6A1 parental mouse mAb, chimaeric 6A1, L1+A1 and L2+A1, were assessed for ability to inhibit binding of human IL-13 to IL-13Rα1 and IL-13Rα2 chains in a competition ELISA. See figures 12a and 12b and Table 3 below.

Table 3

ELISA	mAb	IC_{50} (µg/ml)
Human IL-13Rα1 competition	6A1 parental mAb	0.039
	chimaeric 6A1	0.034
	L1+A1	0.044
	L2+A1	0.056
Human IL-13Rα2 competition	6A1 parental mAb	0.020
	chimaeric 6A1	0.040
	L1+A1	0.113
	L2+A1	0.117

All antibodies inhibited the binding of *E.coli*-expressed det-1 tagged human IL-13 to human IL-13Rα1 with a similar profile. Similarly, all antibodies inhibited the binding of *E.coli*-expressed det-1 tagged human IL-13 to human IL-13Rα2, though with some reduction in potency for L1+A1 and L2+A1 in this assay (IC_{50} values were generated using the Excel 'Robosage' curve fitting function).

6.4 Affinity assessment of L1+A1 and L2+A1 for binding to human IL-13

The binding kinetics of L1+A1 and L2+A1 for human IL-13 were assessed using the BIAcore™ system. See Section 7 below for methods used.

111

Analysis 1:

Completed for both human and cynomolgus IL-13 (*E.coli*-expressed protein). The quoted KD values are the average from 5 different IL-13 concentration curves (done in triplicate). Note that mass transfer issues were apparent in this analysis and that a modified experimental protocol (to correct for this issue) has been completed in analysis 4 (where no mass transfer issues were present). See Table 4.

Table 4

IL-13 sample	mAb	On rate ka (Ms^{-1})	Off rate kd (s^{-1})	Affinity constant KD (pM)
Human IL-13	6A1 parental mAb	1.96×10^6	6.78×10^{-5}	35
	chimaeric 6A1	4.64×10^5	2×10^{-5}	43
	L1+A1	5.07×10^5	1.55×10^{-4}	300
	L2+A1	5.07×10^5	1.56×10^{-4}	310
Cynomolgus IL-13	6A1 parental mAb	9.14×10^5	5.6×10^{-5}	61
	chimaeric 6A1	5.92×10^5	3.27×10^{-5}	55
	L1+A1	4.46×10^5	1.55×10^{-5}	35
	L2+A1	5.77×10^5	5.58×10^{-5}	97

112

40

Analysis 2:

Completed for human IL-13 (*E.coli*-expressed protein) binding to L1+A1. See Table 5.

Table 5

IL-13 sample	mAb	On rate ka (Ms-1)	Off rate kd (s-1)	Affinity constant KD (pM)
Human IL-13	L1+A1	4.66 x 105	6.95 x 10^{-5}	149

Analysis 3:

Completed for the 16mer biotinylated human IL-13 peptide number 24 (identified as the linear binding epitope for parental mAb 6A1, see section 6.7). Note that the absolute KD values obtained for binding to peptide ligands are often quite different to those seen for binding to whole protein targets. However, it is believed that this data is consistent with the whole protein data and the IL-13 neutralisation data (in the TF-1 bioassay) in that they indicate a reduction in affinity of about 3-fold between the chimaeric 6A1 and L1+A1. See Table 6.

Table 6

IL-13 sample	mAb	On rate ka (Ms^{-1})	Off rate kd (s^{-1})	Affinity constant KD (nM)
Peptide 24	6A1 parental mAb	2.95×10^{5}	9.15×10^{-4}	3.11
	chimaeric 6A1	2.57×10^{5}	9.19×10^{-4}	3.58
	L1+A1	1.95×10^{5}	1.7×10^{-3}	9.03
	L2+A1	1.79×10^{5}	1.67×10^{-3}	9.35

Analysis 4:

Completed for both human and cynomolgus IL-13 (*E.coli*-expressed protein). The quoted KD values are the average from 5 different IL-13 concentration curves (done in triplicate). Note that no mass transfer issues were apparent for this data set. See Table 7.

Table 7

IL-13 sample	mAb	On rate ka (Ms^{-1})	Off rate kd (s^{-1})	Affinity constant KD (pM)
Human IL-13	chimaeric 6A1	1.05×10^{6}	4×10^{-5}	38
	L1+A1	8.24×10^{5}	1.4×10^{-4}	170
	L2+A1	9.07×10^{5}	1.39×10^{-4}	153
Cynomolgus IL-13	chimaeric 6A1	8.85×10^{5}	2.65×10^{-5}	30
	L1+A1	7.3×10^{5}	5.86×10^{-5}	80
	L2+A1	7.72×10^{5}	4.25×10^{-5}	55

114
112

The results indicate no significant difference between the humanised constructs L1+A1 and L2+A1.

L1+A1 shows an affinity for human IL-13 of approximately 168pM. The kinetics are dominated by a exceptionally slow off-rate, as would be predicted from the significant neutralising activity of the antibody. Data for the association constant k_{on} are consistently around 6×10^5 $M^{-1}s^{-1}$. Estimates of the dissociation constant k_{off} are more variable, covering the range 1.4×10^{-4} to 8.22×10^{-5} s^{-1}, reflecting the technical challenge of obtaining precise quantification for slow off-rates.

6.5 Activity of L1+A1 and L2+A1 in IL-13 neutralisation bioassays

6A1 parental mouse mAb, chimaeric 6A1, L1+A1 and L2+A1 were assessed for IL-13 neutralisation activity in an *in vitro* TF-1 cell bioassay (this bioassay is the industry standard for assessment of IL-13 bioactivity and for assessment of the neutralization capacity of commercially supplied anti-IL-13 antibodies). A number of IL-13 variants were assessed in this assay, including *E.coli*-expressed human IL-13, *E.coli*-expressed cynomolgus IL-13, *E.coli*-expressed Q130 human IL-13 (the asthma-associated variant), and mammalian CHO cell–expressed human IL-13 (note: native human IL-13 in the Th2 cell supernatant sample could not be used in this bioassay, as this supernatant also contains other cytokines that are able to proliferate TF-1 cells). See figures 13a, 13b, 13c and 13d.

All antibodies tested neutralised the bioactivity of all IL-13 variants in this bioassay system; the neutralisation capacity of each antibody for each IL-13 variant was determined and expressed as an ND_{50} value. See Table 8

115

113

Table 8

IL-13 variant	mAb	Mean ND_{50} for 2 assays (µg/ml)
E.coli-expressed human IL-13	chimaeric 6A1	0.119
	L1+A1	0.428
	L2+A1	0.608
	6A1 parental mAb	0.193
E.coli-expressed cynomolgus IL-13	chimaeric 6A1	0.059
	L1+A1	0.078
	L2+A1	0.120
	6A1 parental mAb	0.078
E.coli-expressed Q130 human IL-13	chimaeric 6A1	0.128
	L1+A1	0.438
	L2+A1	0.705
	6A1 parental mAb	0.213
CHO-expressed human IL-13	chimaeric 6A1	0.285
	L1+A1	0.975
	L2+A1	1.200
	6A1 parental mAb	0.440

Note: as different amounts of each IL-13 variant are required to proliferate the TF-1 cells to the same extent in this bioassay, it may not be desirable to compare the ND_{50} values generated by one particular antibody across each IL-13 variant used. However, it is appropriate to compare the ND_{50} values generated by each antibody for a single IL-13 variant.

116

In general, the level of neutralisation achieved by the parental 6A1 mAb and chimaeric 6A1 was similar, indicating no detectable loss of potency between the parental mAb and the chimaera. However, the potencies of L1+A1 and L2+A1 were measurably reduced in comparison with both parental 6A1 mAb and chimaeric 6A1 by an average of approximately 3 to 4 fold for each individual IL-13 variant tested. These data are in close agreement with those obtained from the BIAcore™ assessment.

6.6 Specificity of L1+A1 and L2+A1 for binding to human IL-13

The specificities of L1+A1 and L2+A1 for human IL-13 were assessed by analysis of the cross-reactivity potential against human IL-4 and human GM-CSF in binding ELISAs. See figures 14a and 14b.

These mAbs were found to be specific for binding to IL-13, with no cross-reactivity for human IL-4 or human GM-CSF at mAb concentrations up to 30µg/ml. In addition, these mAbs did not cross-neutralise the bioactivity of human IL5 in an IL5 bioassay. See figure 14c.

6.7 Epitope Mapping of 6A1 using biotinylated peptides

Human IL-13 and cynomolgus IL-13 proteins were run on a denaturing SDS-PAGE gel. Western blotting with mouse mAb 6A1 detected bands of the expected size for both human (E.coli expressed, in house) and cynomolgus (E.coli expressed, in house) IL-13 proteins. 6A1 did not detect hIL-13 (E.Coli expressed, Cambridge Bioscience), due to a probable technical failure. This analysis suggested that mAb 6A1 recognised a linear peptide epitope within the human and cynomolgus IL-13 sequences (data not shown).

117

Biotinylated 16 mer peptides offset by 4 were synthesised to map the location of the B cell epitope recognised by mAb 6A1 on both human and cynomolgus IL-13. An ELISA method was used to detect binding of immobilised biotinylated peptide to the parental mAb 6A1.

Details of 16 mer custom designed Peptides: 88 x 16 mers, offset by 4 (supplied by Mimotopes, Australia).

Format: Peptides 25 & 44 = Biotin-SGSG-PEPTIDE-acid
Peptides 2-24 & 27-43 = Biotin-SGSG-PEPTIDE-amide

#	Hydro	MolWt	N-term	Sequence	C-term
2	0.42	2,311.66	Biotin-	SEQ.I.D.NO:38	-NH2
3	0.27	2,453.82	Biotin-	SEQ.I.D.NO:39	-NH2
4	0.38	2,326.70	Biotin-	SEQ.I.D.NO:40	-NH2
5	0.31	2,231.58	Biotin-	SEQ.I.D.NO:41	-NH2
6	0.43	2,289.66	Biotin-	SEQ.I.D.NO:42	-NH2
7	0.59	2,190.57	Biotin-	SEQ.I.D.NO:43	-NH2
8	0.57	2,260.64	Biotin-	SEQ.I.D.NO:44	-NH2
9	0.62*	2,255.64	Biotin-	SEQ.I.D.NO:45	-NH2
10	0.51	2,197.56	Biotin-	SEQ.I.D.NO:46	-NH2
11	0.56	2,144.52	Biotin-	SEQ.I.D.NO:47	-NH2
12	0.46	2,090.38	Biotin-	SEQ.I.D.NO:48	-NH2
13	0.29	2,219.54	Biotin-	SEQ.I.D.NO:49	-NH2
14	0.29	2,180.53	Biotin-	SEQ.I.D.NO:50	-NH2
15	0.36	2,318.70	Biotin-	SEQ.I.D.NO:51	-NH2
16	0.32	2,303.73	Biotin-	SEQ.I.D.NO:52	-NH2
17	0.47	2,209.57	Biotin-	SEQ.I.D.NO:53	-NH2
18	0.48	2,257.60	Biotin-	SEQ.I.D.NO:54	-NH2

	19	0.17	2,273.57	Biotin-	SEQ.I.D.NO:55-NH2
	20	0.27	2,300.60	Biotin-	SEQ.I.D.NO:56-NH2
	21	0.29	2,383.77	Biotin-	SEQ.I.D.NO:57-NH2
	22	0.35	2,401.83	Biotin-	SEQ.I.D.NO:58-NH2
5	23	0.45	2,407.92	Biotin-	SEQ.I.D.NO:59-NH2
	24	0.42	2,541.08	Biotin-	SEQ.I.D.NO:60-NH2
	25	0.33	2,513.97	Biotin-	SEQ.I.D.NO:61-OH
	27	0.42	2,283.64	Biotin-	SEQ.I.D.NO:62-NH2
	28	0.27	2,425.81	Biotin-	SEQ.I.D.NO:63-NH2
10	29	0.57	2,228.57	Biotin-	SEQ.I.D.NO:64-NH2
	30	0.62*	2,223.57	Biotin-	SEQ.I.D.NO:65-NH2
	31	0.51	2,165.49	Biotin-	SEQ.I.D.NO:66-NH2
	32	0.56	2,112.45	Biotin-	SEQ.I.D.NO:67-NH2
	33	0.27	2,207.56	Biotin-	SEQ.I.D.NO:68-NH2
15	34	0.33	2,345.73	Biotin-	SEQ.I.D.NO:69-NH2
	35	0.29	2,330.76	Biotin-	SEQ.I.D.NO:70-NH2
	36	0.45	2,236.60	Biotin-	SEQ.I.D.NO:71-NH2
	37	0.43	2,276.64	Biotin-	SEQ.I.D.NO:72-NH2
	38	0.12	2,292.62	Biotin-	SEQ.I.D.NO:73-NH2
20	39	0.22	2,319.64	Biotin-	SEQ.I.D.NO:74-NH2
	40	0.24	2,402.82	Biotin-	SEQ.I.D.NO:75-NH2
	41	0.33	2,387.80	Biotin-	SEQ.I.D.NO:76-NH2
	42	0.43	2,393.90	Biotin-	SEQ.I.D.NO:77-NH2
	43	0.39	2,527.05	Biotin-	SEQ.I.D.NO:78-NH2
25	44	0.35	2,471.88	Biotin-	SEQ.I.D.NO:79-OH

(* indicates a high hydrophobicity value)

30

Example: a typical 96 well plate set-up for this assay.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
B	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
C	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
D	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
E	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
F	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
G	39	39	40	40	41	41	42	42	43	43	44	44
H	+VE (4)	+VE (16)	+VE (32)	+VE (4)	+VE (16)	+VE (32)	–VE (4)	–VE (16)	–VE (32)	–VE (4)	–VE (16)	–VE (32)

NB: Numbers indicate the peptide in each well

Numbers in brackets indicate the dilution factor of the control antibody

Absorbencies at 490nm of the 96-wells

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.057	0.067	0.079	0.063	0.072	0.061	0.084	0.061	0.075	0.064	0.075	0.066
B	0.068	0.070	0.105	0.065	0.075	0.072	0.071	0.070	0.064	0.061	0.062	0.063
C	0.119	0.081	0.099	0.064	0.073	0.077	0.060	0.061	0.090	0.144	2.109	2.200
D	0.115	0.129	0.141	0.060	0.090	0.063	0.104	0.078	0.076	0.135	2.148	2.210
E	0.060	0.074	0.098	0.062	0.064	0.071	0.088	0.082	0.089	0.073	0.068	0.067
F	0.082	0.078	0.071	0.062	0.056	0.057	0.084	0.067	0.090	0.074	0.063	0.056
G	0.057	0.055	0.060	0.060	0.058	0.058	0.104	0.108	2.236	2.237	2.229	2.229
H	1.499	1.197	0.739	1.548	1.209	0.976	0.077	0.080	0.072	0.072	0.082	0.103

This result (one of a number of attempts) correlates to a positive result for peptides 24, 25, 43 and 44 as shown below (as well as the positive control peptides). See figure 15. All attempts demonstrated that peptides 24,25,43 and 44 were positive.

Peptide 24: QFVKDLLLHLKKLFRE (SEQ.I.D.NO:80)
Peptide 25: DLLLHLKKLFREGRFN (SEQ.I.D.NO:81)
Peptide 43: QFVKDLLVHLKKLFRE (SEQ.I.D.NO:82)
Peptide 44: DLLVHLKKLFREGQFN (SEQ.I.D.NO:83)

Peptides 24 and 25 are derived from hIL-13. Peptides 43 and 44 are derived from cynoIL-13.

In addition, chimaeric 6A1, L1+A1 and L2+A1 mAbs all bound to the same linear epitope at the C-terminal region in both human and cynomolgus IL-13 (data for chimaeric 6A1, L1+A1 and L2+A1 mAbs are not shown).

In summary, ELISA results indicated that parental mouse mAb 6A1, chimaeric 6A1, L1+A1 and L2+A1 mAbs all bound within the following sequence from the human IL-13 protein:

DLLLHLKKLFRE (SEQ.I.D.NO:84)

And within the following sequence from the cynomolgus IL-13 protein:

DLLVHLKKLFRE (SEQ.I.D.NO:85)

NB: **BOLD** indicates residue differences between human IL-13 and the cynomolgus IL-13 orthologue.

Accordingly it has been determined that parental mouse mAb 6A1, chimaeric 6A1, L1+A1 and L2+A1 mAbs immunospecifically bind human IL-13 between residues 97 to 108 of SEQ.I.D.NO:9.

6.8 Epitope fine-mapping of 6A1 using biotinylated peptides

A binding epitope for mAb 6A1 was determined using a peptide set based around KDLLLHLKKLFREG for binding to human IL-13 and KDLLVHLKKLFREG for binding to cynomolgus IL-13. Peptides were ordered with 1 amino acid sequentially removed from either the N or C-terminus of these parental peptide sequences (ie. KDLLLHLKKLFREG or KDLLVHLKKLFREG), in order to define the precise linear binding epitope for mAb 6A1.

An ELISA method was used to detect binding of immobilised biotinylated peptide to the parental mAb 6A1.

The peptide identification number (413 to 447) and corresponding sequences are shown below.

Peptide Sequences:

Peptide #	N-Term	Sequence	C-Term
413	Biotin-	SEQ.I.D.NO:94	-NH2
414	Biotin-	SEQ.I.D.NO:95	-NH2
415	Biotin-	SEQ.I.D.NO:96	-NH2
416	Biotin-	SEQ.I.D.NO:97	-NH2
417	Biotin-	SEQ.I.D.NO:98	-NH2
418	Biotin-	SEQ.I.D.NO:99	-NH2
419	Biotin-	SEQ.I.D.NO:100	-NH2
420	Biotin-	SEQ.I.D.NO:101	-NH2
421	Biotin-	SEQ.I.D.NO:102	-NH2
422	Biotin-	SEQ.I.D.NO:103	-NH2
423	Biotin-	SEQ.I.D.NO:104	-NH2
424	Biotin-	SEQ.I.D.NO:105	-NH2
425	Biotin-	SEQ.I.D.NO:106	-NH2
426	Biotin-	SEQ.I.D.NO:107	-NH2
427	Biotin-	SEQ.I.D.NO:108	-NH2
428	Biotin-	SEQ.I.D.NO:109	-NH2
429	Biotin-	SEQ.I.D.NO:110	-NH2
430	Biotin-	SEQ.I.D.NO:111	-NH2
431	Biotin-	SEQ.I.D.NO:112	-NH2
432	Biotin-	SEQ.I.D.NO:113	-NH2
433	Biotin-	SEQ.I.D.NO:114	-NH2

	434	Biotin-	SEQ.I.D.NO:115	-NH2
	435	Biotin-	SEQ.I.D.NO:116	-NH2
	436	Biotin-	SEQ.I.D.NO:117	-NH2
	437	Biotin-	SEQ.I.D.NO:118	-NH2
	438	Biotin-	SEQ.I.D.NO:119	-NH2
	439	Biotin-	SEQ.I.D.NO:120	-NH2
	440	Biotin-	SEQ.I.D.NO:121	-NH2
	441	Biotin-	SEQ.I.D.NO:122	-NH2
	442	Biotin-	SEQ.I.D.NO:123	-NH2
	443	Biotin-	SEQ.I.D.NO:124	-NH2
	444	Biotin-	SEQ.I.D.NO:125	-NH2
	445	Biotin-	SEQ.I.D.NO:126	-NH2
	446	Biotin-	SEQ.I.D.NO:127	-NH2
	447	Biotin-	SEQ.I.D.NO:128	-NH2
	44 (Control)	Biotin-	SEQ.I.D.NO:79	-OH

124

Example: a 96 well plate set-up for this assay

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424
B	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424
C	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436
D	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436
E	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	44
F	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	44
G	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK
H	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK

NB: Numbers indicate the peptide in each well

Absorbencies at 490nm of the 96-wells

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.456	2.501	2.434	2.419	2.746	2.661	2.224	2.407	0.059	0.052	0.052	2.527
B	2.480	2.452	2.444	2.624	2.639	3.106	2.188	2.473	0.059	0.055	0.052	2.568
C	2.472	0.099	0.065	0.059	0.070	0.058	0.053	0.054	0.162	2.479	2.389	2.883
D	2.399	0.100	0.067	0.053	0.049	0.051	0.052	0.047	0.485	2.838	2.783	2.640
E	2.582	2.359	2.585	2.512	0.096	0.052	0.054	0.048	0.049	0.183	0.051	2.424
F	2.431	2.872	2.522	2.243	0.097	0.059	0.052	0.049	0.057	0.047	0.050	2.342
G	0.056	0.051	0.058	0.065	0.056	0.067	0.049	0.047	0.053	0.057	0.052	0.056
H	0.047	0.052	0.050	0.070	0.054	0.047	0.056	0.053	0.049	0.050	0.052	0.049

See figures 16a and 16b. The results indicate that parental mAb 6A1 binds to the linear amino acid epitope KKLFR in the C-terminal region of both human IL-13 and the cynomolgus IL-13 orthologue.

In addition chimaeric 6A1, L1+A1 and L2+A1 mAbs all bound to the same linear epitope (ie. KKLFR) at the C-terminal region in human IL-13 (data for chimaeric 6A1, L1+A1 and L2+A1 mAbs are not shown). Subsequently it was shown that parental mAb 6A1 bound the same epitope in cynomolgus IL-13.

In summary, ELISA results indicated that parental mouse mAb 6A1; chimaeric 6A1, L1+A1 and L2+A1 mAbs all bound within the following sequence from the human IL-13 protein: **KKLFR**

6.9 Alanine scanning of the 6A1 binding epitope using biotinylated peptides

In order to identify certain key residues involved in the interaction of IL-13 with mAb 6A1, an alanine scanning approach was adopted using a parental peptide sequence containing the KKLFR binding epitope (ie. QFVKDLLLHLKKLFREGRFN). For this analysis, peptides were generated (supplied by AnaSpec Inc) where one amino acid was sequentially substituted for an alanine residue at each amino acid position in the KKLFR epitope (and also for each of the amino acids directly bordering this epitope).

An ELISA method was used to detect binding of immobilised biotinylated peptide to the parental mAb 6A1 and L1+A1.

The peptides generated for this analysis and a corresponding peptide identification number are shown below:

Peptide #	N-Term	Sequence

1	Biotin	SEQ.I.D.NO:129
62	Biotin	SEQ.I.D.NO:130
63	Biotin	SEQ.I.D.NO:131
64	Biotin	SEQ.I.D.NO:132
65	Biotin	SEQ.I.D.NO:133
66	Biotin	SEQ.I.D.NO:134
67	Biotin	SEQ.I.D.NO:135
68	Biotin	SEQ.I.D.NO:136

Results: Absorbencies at 490nm

Average test results (n=2).

For parental (murine) 6A1 mAb:

Peptide number	1	62	63	64	65	66	67	68
Average A_{490}	3.543	3.489	3.2795	1.468	3.8495	3.5995	0.595	3.581

For L1+A1:

Peptide number	1	62	63	64	65	66	67	68
Average A_{490}	2.8535	2.832	2.8535	1.8175	3.0165	2.84	0.816	2.8085

See figures 17a and 17b.

These data suggest that the key amino acid residues involved in the interaction of mAb 6A1 or L1+A1 with human IL-13 are arginine (R) at position 107, and lysine (K) at position 103.

This analysis was repeated, but using 6A1 and L1+A1 mAbs at a range of concentrations in order to confirm this effect over a mAb dilution range.

The parental mouse mAb 6A1 (figure 17c) and the humanised candidate L1+A1 (figure 17d) were assayed for binding to the alanine scanning peptides (SEQ I.Ds 129, 131-135) at varying concentrations. As the peptides had to be split across two 96 well plates, the parental sequence peptide containing no alanine substitutions (SED I.D: 129) was assayed on both plates - hence two results per graph. This was to determine if there was any major plate-to-plate variation and in both cases, there was no apparent variation.

The peptides containing the substitutions K103A, L105A and F106A (SEQ I.Ds 131, 133 and 134 respectively, residue numbering as set forth in SEQ ID 9) showed very similar binding to the mAbs as the parental peptide (SEQ ID 129) - therefore these residues are not critical for 6A1/L1+A1 binding to IL-13. Peptides containing the substitutions K104A and R107A (SEQ I.Ds 132 and 135 respectively, residue numbering as set forth in SEQ ID 9) however, show reduced binding of 6A1/L1+A1 compared to the parental peptide (SEQ ID 129), particularly at the lower concentrations, indicating that these residues are critical for optimal binding of 6A1/L1+A1 to IL-13.

See figures 17c and 17d.

These data indicate that the key amino acid residues involved in the interaction of parental (i.e. murine) 6A1 or L1+A1 with human IL-13 are arginine (R) at position 107, and lysine (K) at position 103 of SEQ.I.D.NO:9.

SECTION 7. - MATERIALS AND METHODS

In the following section the following materials and methods were used where appropriate. These are representative material and methods. Minor changes in materials and methods may have occurred in repeat experiments.

MATERIALS

SV Total RNA Isolation System: Promega Z3100
Access RT-PCR System: Promega A1250
QIAquick Gel Extraction kit: Qiagen 28704
Gel loading solution: Sigma G7654
Agarose: Invitrogen 15510-019
Ethidium bromide: Sigma E1510
TAE buffer: In-house
100bp DNA ladder: New England BioLabs N3231S
TA cloning kit: Invitrogen 45-0046
TOP10F' cells: Invitrogen 44-0300
L-agar + 100µg/ml ampicillin: in-house
X-Gal, 50mg/ml in DMF: Promega V394A
AmpliTaq DNA Polymerase: Applied Biosystems
10x PCR buffer: Applied Biosystems
E-Gel 1.2% agarose: Invitrogen G501801
LB medium + 100µg/ml ampicillin: in-house
QIAprep Spin Miniprep kit: Qiagen 27106
MinElute PCR Purification kit: Qiagen 28004

NEBuffer2 10x conc: New England Biolabs B7002S
Purified BSA 100x conc: New England Biolabs B9001S
BsiW I: New England Biolabs R0553L
Hind III: Promega R604A
Spe I: New England Biolabs R0133S
LigaFast Rapid DNA Ligation System: Promega M8225
MAX Efficiency DH5α Chemically Competent cells: Invitrogen 18258-012
SOC media: in-house
QIAfilter Plasmid Maxi kit: Qiagen 12263
Dulbecco's MEM with Glutamax-1: Invitrogen 31966-021
Optimem 1 with Glutamax-1: Invitrogen 51985-026
TransFast Transfection Reagent: Promega E2431
1ml HiTrap rProtein A Sepharose FF: Amersham Biosciences 17-5079-01
Dulbecco's PBS: Sigma D8537
ImmunoPure IgG Elution Buffer: Pierce 21009
1M Trizma-HCl pH8.0: Sigma T2694
ProofStart DNA Polymerase: Qiagen 1016816
ProofStart PCR buffer: Qiagen 1016961

7.1. Human or cynomolgus IL-13 binding ELISA

This assay describes an ELISA that detects binding of an antibody to human or cynomolgus IL-13. It is a sandwich ELISA format.

7.1.1 Materials

1. Nunc Immunoplate 1 F96 Maxisorp (Life Technologies, 4-39454A)
2. Human IL-13 (Cambridge Biosciences, cat. no. CH1-013)
3. Cynomolgus IL-13 (made by GlaxoSmithkline)
4. Goat anti-human IL-13 polyclonal antibody (R+D Systems, cat. no. AF-213-NA)

5. Anti-human IgG-HRP (Sigma, Cat No. A-6029)
6. Anti-mouse IgG-HRP (Sigma, Cat No. A-9309)
7. Carbonate/bicarbonate buffer (Sigma; cat. no. C-3041)
8. TBST [Tris buffered saline (6.06g Tris + 8.06g NaCl + 0.2g KCl + H20 to 1L) + 0.05% Tween 20]
9. BSA (Sigma A-7030)
10. OPD (Sigma, Cat. No. P-9187)
11. Sulphuric acid

7.1.2 Method

1. Blocking solution is 3% BSA+TBST
2. Washing solution is TBST
3. Coat 'Nunc Maxisorp' ELISA plates with 50ul of 5ug/ml goat anti-human IL-13 polyclonal antibody (R+D Systems, cat. no. AF-213-NA. Made up at a stock concentration of 500ug/ml according to maufacturers instructions, and stored in aliquots at –20C) in carbonate/bicarbonate buffer (Sigma; cat. no. C-3041, made up as per maufacturers instructions), cover with a plate sealer and incubate O/N at 4°C.
4. Block with 100ul of 3% BSA/TBST incubate at rtp for 1hr.
5. Wash X3 in TBST (at least 200ul wash solution per well per wash).
6. Add 20ng per well (in a 50ul volume) human IL-13 (Cambridge Bioscience, cat. no. CH1-013. Made up at a stock concentration of 100ng/ul according to maufacturers instructions, and stored in aliquots at –20C) or 20ng per well cynomolgus IL-13, in block solution and incubate at room temperature for 1hr.
7. Wash X3 in TBST.
8. Add 50ul antibody sample (titrate out to obtain end-point titre data, if required) in block solution, incubate at rtp for 1hr.
9. Wash X3 in TBST.

10. For 6A1 chimaeric antibody or humanised antibody, detect binding using 50ul per well anti-human IgG-HRP (Sigma, Cat No. A-6029) at a 1/2000 dilution in block solution for 1hr at rtp. For 6A1 mouse monoclonal antibody, detect binding using 50ul per well anti-mouse IgG-HRP (Sigma, Cat No. A-9309) at a 1/1000 dilution in block solution for 1hr at rtp.
11. Wash X3 in TBST.
12. Develop with 100ul OPD (Sigma, Cat. No. P-9187. Made up as per maufacturers instructions), stop with 50ul 3M H_2SO_4, read at an absorbance of 490nm. Development time is ~ 12 minutes.

7.2. Human IL-13 binding to the human IL-13Rα1 chain ELISA

This ELISA determines whether an antibody can inhibit human IL-13 binding to the human IL-13Rα1 chain.

7.2.1 Materials

1. Nunc Immunoplate 1 F96 Maxisorp (Life Technologies, 4-39454A)
2. Human IL-13Rα1-Fc (R&D Systems, cat.no. 146-IR)
3. Det-1 tagged human IL-13 (made in-house)
4. Biotinylated anti-human IL-13 (R&D Systems, cat. no. BAF213)
5. Streptavidin-HRP
6. Carbonate/bicarbonate buffer (Sigma; cat. no. C-3041)
7. TBST [Tris buffered saline (6.06g Tris + 8.06g NaCl + 0.2g KCl + H20 to 1L) + 0.05% Tween 20]
8. BSA (Sigma A-7030)
9. OPD (Sigma, Cat. No. P-9187)
10. Sulphuric acid

130

7.2.2 Method

1. Blocking solution is 3% BSA+TBST
2. Washing solution is TBST
3. Coat 'Nunc Maxisorp' ELISA plates with 50ul of 5ng/ul human IL-13Rα1-Fc in carbonate/bicarbonate buffer. Cover with a plate sealer and incubate overnight at 4°C.
4. Block with 100ul of 3% BSA/TBST incubate at rtp for 1hr.
5. Wash X3 TBST (at least 200ul wash solution per well per wash).
6. In a total volume of 50ul, pre-incubate 0.04ng/ul det-1 tagged human IL-13 with antibody sample (titrated) in block solution for 30 minutes. Add the pre-incubated sample to the receptor-coated ELISA plate and incubate at room temperature for 1hr.
7. Wash x3 in TBST
8. Detect any bound human IL-13 using 50ul per well biotinylated anti-human IL-13 diluted at 1ug/ml. Incubate for 1 hour at room temperature
9. Wash x3 in TBST
10. Add 50ul per well streptavidin-HRP conjugate at 1/1000 dilution. Incubate for 1hour at room temperature.
11. Wash x3 in TBST
12. Develop with 100ul per well OPD (Sigma, Cat. No. P-9187. Made up as per maufacturers instructions), stop with 50ul per well 3M H_2SO_4, read at an absorbance of 490nm. Development time is ~ 2 minutes.

7.3. Human IL-13 binding to the human IL-13Rα2 chain ELISA

This ELISA determines whether an antibody can inhibit human IL-13 binding to the human IL-13Rα2 chain.

137

7.3.1 Materials

1. Nunc Immunoplate 1 F96 Maxisorp (Life Technologies, 4-39454A)
2. Anti-human IgG (Sigma, cat. no. I-3382)
3. Human IL-13Rα2-Fc (R&D Systems, cat.no. 614-IR)
4. Det-1 tagged human IL-13 (made in-house)
5. Biotinylated anti-human IL-13 (R&D Systems, cat. no. BAF213)
6. Streptavidin-HRP
7. Carbonate/bicarbonate buffer (Sigma; cat. no. C-3041)
8. TBST [Tris buffered saline (6.06g Tris + 8.06g NaCl + 0.2g KCl + H20 to 1L) + 0.05% Tween 20]
9. BSA (Sigma A-7030)
10. OPD (Sigma, Cat. No. P-9187)
11. Sulphuric acid

7.3.2 Method

1. Blocking solution is 3% BSA+TBST
2. Washing solution is TBST
3. Coat 'Nunc Maxisorp' ELISA plates with 50ul of anti-human IgG diluted to 1/1000 in carbonate/bicarbonate buffer. Cover with a plate sealer and incubate overnight at 4°C.
4. Block with 100ul of 3% BSA/TBST incubate at rtp for 1hr.
5. Wash X3 TBST (at least 200ul wash solution per well per wash).
6. Add 50ul per well of 1ug/ml human IL-13Rα2-Fc in block solution. Cover with a plate sealer and incubate at room temperature for 1hr.
7. Wash x3 in TBST
8. In a total volume of 50ul, pre-incubate 0.004ng/ul det-1 tagged human IL-13 with antibody sample (titrated) in block solution for 30 minutes.

Add the pre-incubated sample to the receptor-coated ELISA plate and incubate at room temperature for 1hr.

9. Wash x3 in TBST
10. Detect any bound human IL-13 using 50ul per well biotinylated anti-human IL-13 diluted at 1ug/ml. Incubate for 1 hour at room temperature.
11. Wash x3 in TBST
12. Add 50ul per well streptavidin-HRP conjugate at 1/1000 dilution. Incubate for 1hour at room temperature.
13. Wash x3 in TBST
14. Develop with 100ul per well OPD (Sigma, Cat. No. P-9187. Made up as per maufacturers instructions), stop with 50ul per well 3M H_2SO_4, read at an absorbance of 490nm. Development time is ~ 2 minutes.

7.4. IL-13 neutralisation bioassay (TF-1 cell proliferation assay)

This is an IL-13 bioassay that can be used to determine the neutralisation capacity of an anti-IL-13 antibody. The method described below uses recombinant human or cynomolgus IL-13. Mammalian-expressed human IL-13 or the Q130 human IL-13 variant can also be used in this assay too. (TF-1 cells also proliferate in response to human IL5. This assay was also used to assess the neutralisation capacity of 6A1 on human IL5 bioactivity).

7.4.1 Materials

1. TF-1 cell line (obtained in-house)
2. 96 well tissue culture plates (Invitrogen)
3. Human IL-13 (Cambridge Bioscience, cat. no. CH1-013)

4. CellTiter 96 non-radioactive cell proliferation assay (Promega, Cat. No. G4000)

7.4.2 Method

1. Method to measure the ability of an anti-human IL-13 mAb to neutralise the bioactivity of recombinant human or cynomolgus IL-13 in a TF-1 cell bioassay (TF-1 cell line obtained in-house, not the ATCC version).
2. This assay is performed in sterile 96 well tissue culture plates (Invitrogen), under sterile conditions. All tests are performed in triplicate.
3. Pre-incubate 10ng/ml human IL-13 (Cambridge Bioscience, cat. no. CH1-013. Make up at a stock concentration of 100ng/ul according to maufacturers instructions using sterile technique in a class 2 tissue culture hood, store in small aliquots at –20C) or 10ng/ml cyno IL-13 (obtained in-house from CA) with various dilutions of the anti-human IL-13 mAb (diluted from 6ug/ml in 3 fold dilutions down to 0.025ug/ml) in a total volume of 50ul for 1 hour at 37C. Also included will be positive control wells, having IL-13 present but no anti-human IL-13 mAb. In addition, negative control wells will have no IL-13 and no anti-human IL-13 mAb present. Use a sterile, low protein binding, round bottom 96 well plate for this pre-incubation. (Note that the concentration of IL-13 and anti-human IL-13 mAb will be halved at a later stage when cells are added).
4. Plate out 50ul of TF-1 cells at $2x10^5$ per ml in a sterile 96 well tissue culture plate. After the 1 hour pre-incubation, add the IL-13 and anti-human IL-13 mAb sample to the cells. The final 100ul assay volume, containing various anti-human IL-13 mAb dilutions, recombinant IL-13

and TF-1 cells, is incubated at 37°C for ~70 hours in a humidified CO_2 incubator.

5. At ~ 66hrs, scan the wells to confirm that they are sterile and that no bacterial contamination has occurred.
6. Add 15ul of filter sterilised MTT substrate per well (Cat. No. G4000, Promega. Made up as per maufacturers instructions) for the final 4 hours of incubation.
7. Stop the reaction with 100ul of stop solution (provided in the MTT kit) to solubilise the metabolised blue formazan product. Leave for at least 2 hours, then pipette up and down to help dissolve the crystals. Alternatively, cover with a plate sealer and leave at 4C O/N, then pipette up and down the next day (this is easier in terms of pipetting)
8. Read the absorbance of the solution in each well in a 96-well plate reader at 570nm wavelength.
9. The capacity of the anti-human IL-13 mAb to neutralise human or cynomolgus IL-13 bioactivity is expressed as, that concentration of anti-human IL-13 mAb required to neutralise the bioactivity of a defined amount of human or cynomolgus IL-13 (5ng/ml) by 50% (= ND_{50}). The lower the concentration required, the more potent the neutralisation capacity.

Example: A 96 well plate set-up for this assay.

Sample 1 Antibody positive

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3 ug/ml anti-hIL-13 mAb + IL-13 + TF-1			mAb sample 2			mAb sample 3			3 ug/ml anti-hIL-13 poly + IL-13 + TF-1		
B	1 ug/ml anti-hIL-13 mAb + IL-13 + TF-1									1 ug/ml anti-hIL-13 poly + IL-13 + TF-1		
C	0.33 ug/ml anti-hIL-13 mAb + IL-13 + TF-1									0.33 ug/ml anti-hIL-13 poly + IL-13 + TF-1		
D	0.11 ug/ml anti-hIL-13 mAb + IL-13 + TF-1									0.11 ug/ml anti-hIL-13 poly + IL-13 + TF-1		
E	0.037 ug/ml anti-hIL-13 mAb + IL-13 + TF-1									0.037 ug/ml anti-hIL-13 poly + IL-13 + TF-1		
F	0.0123 ug/ml anti-hIL-13 mAb + IL-13 + TF-1									0.0123 ug/ml anti-hIL-13 poly + IL-13 + TF-1		
G	Positive control for TF-1 cell proliferation = TF-1 cells + IL-13 (no mAb, 12 wells)											
H	Control for background = Just TF-1 cells present (no IL-13, no mAb sample, 12 wells)											

5

7.5. Human IL-4 binding ELISA

This assay describes an ELISA that detects binding of an antibody to human IL-4. It is a sandwich ELISA format.

7.5.1 Materials

1. Nunc Immunoplate 1 F96 Maxisorp (Life Technologies, 4-39454A)
2. Human IL-4 (R+D Systems, cat. no.)
3. Goat anti-human IL-4 polyclonal antibody (R+D Systems, Cat. No. AF-204-NA)
4. Biotinylated rat anti-human IL-4 monoclonal antibody (BD / Pharmingen, Cat. No.)
5. Anti-mouse IgG-HRP (Dako, Cat No. P0260)
6. Anti-mouse IgG-HRP (Sigma, Cat No. A-9309)
7. Carbonate/bicarbonate buffer (Sigma; cat. no. C-3041)
8. PBST (PBS + 0.05% Tween 20)
9. BSA (Sigma A-7030)
10. OPD (Sigma, Cat. No. P-9187)
11. Sulphuric acid

7.5.2 Method

1. Blocking solution is 3% BSA in PBST
2. Washing solution is PBST
3. Coat 'Nunc Maxisorp' ELISA plates with 50ul of 5ug/ml goat anti-human IL-4 polyclonal antibody (R+D Systems, cat. no. AF-204-NA. Made up at a stock concentration of 500ug/ml according to maufacturers instructions, and stored in allquots at –20C) in carbonate/bicarbonate buffer (Sigma; cat. no. C-3041, made up as per manufacturers instructions), cover with a plate sealer and incubate O/N at 4°C.

4. Block with 100ul of 3% BSA/PBST incubate at room temperature pressure (rtp) for 1hr.
5. Wash X3 in PBST (at least 200ul wash solution per well per wash).
6. Add 1ng/ml (in a 50ul volume) human IL-4 in block solution and incubate at room temperature for 1hr.
7. Wash X3 in PBST.
8. Add 50ul antibody sample (titrate out to obtain end-point titre data, if required) in block solution, incubate at rtp for 1hr. As a positive control for binding to human IL-4, use a biotinylated anti-human IL-4 monoclonal antibody (titrated out).
9. Wash X3 in PBST.
10. For 6A1 mouse monoclonal antibody, detect binding using 50ul per well anti-mouse IgG-HRP (Sigma, Cat No. A-9309) at a 1/1000 dilution in block solution for 1hr at rtp. For 6A1 chimaeric antibody or humanised antibody, detect binding using 50ul per well anti-human IgG-HRP (Sigma, Cat No. A-6029) at a 1/2000 dilution in block solution for 1hr at rtp. For the positive control biotinylated rat anti-human IL-4 monoclonal antibody, detect using a streptavidin-HRP conjugated antibody. (Alternatively, the anti-mouse HRP antibody, P0260, will detect both 6A1 and the biotinylated rat anti-human IL-4 monoclonal antibody).
11. Wash X3 in PBST.
12. Develop with 100ul OPD (Sigma, Cat. No. P-9187. Made up as per maufacturers instructions), stop with 50ul 3M H_2SO_4, read at an absorbance of 490nm.

7.6. Epitope mapping ELISA

This assay describes an ELISA that detects binding of mouse mAb 6A1 to human or cynomolgus IL-13 peptides.

7.6.1 Materials

1. Nunc Immunoplate 1 F96 Maxisorp (Life Technologies, 4-39454A)
2. ImmunoPure© Streptavidin (Pierce, cat. no. 21125)
3. PBST (Phosphate buffered saline + 0.05% Tween 20)
4. BSA (Sigma A-7030)
5. Human and cynomolgus IL-13 16 mer peptides, offset = 4 (Mimotopes custom order)
6. Positive and negative control 20 mer peptides (Supplied with Mimotopes custom order)
7. 6A1 MAb
8. Control Ab (Supplied with Mimotopes custom order)
9. Rabbit anti-mouse Ig HRP conjugated (DAKO, code no. P0260)
10. OPD (Sigma, Cat. No. P-9187)
11. 3M Sulphuric acid

7.6.2 Method

1. Blocking solution is 3% BSA+PBST.
2. Washing solution is PBST.
3. Coat 'Nunc Maxisorp' ELISA plates with 100µl of 5µg/ml ImmunoPure© Streptavidin (Pierce, cat. no. 21125 made up at a stock concentration of 1mg/ml according to manufacturers instructions, and stored in aliquots at +4°C) using PBST as a diluent. Incubate O/N at 37°C to allow solution to dry.
4. Block with 200µl of 3% BSA/PBST. Add plate sealer and incubate at rtp for 1hr.
5. Wash X3 in PBST (at least 200µl wash solution per well per wash).
6. In duplicate and using PBST as a diluent, add 100µl per well (except control wells) of 1,000-fold dilutions of each peptide (dissolved as per manufacturers instructions in 200µl 40% Acetonitrile 60% Water, then aliquoted in 10-fold dilutions in the same solvent and stored at –20°C).
7. In the control wells, in duplicate and using PBST as a diluent add 100µl per well of 10-fold dilutions of control peptides (dissolved as per manufacturers instructions in 1ml 40% Acetonitrile 60% Water and stored

at –20°C). Add plate sealer and incubate at rtp for 1 hr on a shaking table.

8. Wash X3 in PBST (at least 200µl wash solution per well per wash).
9. Add 100µl per well (except control wells) of 1.506µg/ml mouse mAb in PBST.
10. Add 100µl per well to control wells only, 4, 16 and 32-fold dilutions of control antibody (used as supplied by the manufacturer and stored at –20°C) using PBST as a diluent. Add plate sealer and incubate at rtp (room temperature and pressure) for 1 hr on a shaking table.
11. Wash X3 in PBST (at least 200µl wash solution per well per wash).
12. Add 100µl per well of 2,000-fold dilution of rabbit anti-mouse Ig HRP-conjugated (DAKO, code no. P0260 used as supplied, stored at +4°C) using PBST as a diluent. Add plate sealer and incubate at rtp for 1 hr on a shaking table.
13. Wash X3 in PBST (at least 200µl wash solution per well per wash).
14. Develop with 100µl OPD (Sigma, Cat. No. P-9187. Made up as per manufacturers instructions), stop with 50µl 3M H_2SO_4, read at an absorbency of 490nm. Development time is ~ 10 minutes.

7.7. Epitope fine mapping ELISA

This assay describes an ELISA that detects binding of mAb 6A1 to human or cynomolgus IL-13 peptides.

7.7.1 Materials

1. Nunc Immunoplate 1 F96 Maxisorp (Life Technologies, 4-39454A)
2. ImmunoPure© Streptavidin (Pierce, cat. no. 21125)
3. PBST (Phosphate buffered saline + 0.05% Tween 20)
4. BSA (Sigma A-7030)
5. Human and cynomolgus IL-13 partial window net peptides (14-mer truncated by one amino acid at a time from both the N- and C-terminal ends; Mimotopes custom order)

142

140

6. Positive control 16 mer peptide (Supplied with previous Mimotopes custom order)
7. 6A1 mAb (made in-house)
8. Goat anti-mouse IgG (F_C specific) HRP conjugated antibody (Sigma A-9309)
9. OPD (Sigma, Cat. No. P-9187)
10. 3M Sulphuric acid

7.7.2 Method

1. Blocking solution is 3% BSA+PBST.
2. Washing solution is PBST.
3. Coat 'Nunc Maxisorp' ELISA plates with 100µl of 5µg/ml ImmunoPure© Streptavidin in ultra pure water (Pierce, cat. no. 21125 made up at a stock concentration of 1mg/ml according to manufacturer's instructions, and stored at +4°C). Incubate overnight at +37°C.
4. Block with 200µl of 3% BSA in PBST. Add plate sealer and incubate overnight at +4°C.
5. Wash X3 in PBST (at least 200µl wash solution per well per wash).
6. In duplicate and using 3% BSA in PBST as a dilutent, add 100µl per well of 1,000-fold dilutions of each peptide (dissolved as per manufacturers instructions in 200µl of 40% Acetonitrile 60% Water and stored at –20°C). Add plate sealer and incubate at room temperature for 1 hour on a shaking table.
7. Wash X3 in PBST (at least 200µl wash solution per well per wash).
8. Add 100µl per well of 3µg/ml 6A1 diluted in 3% BSA in PBST. Add plate sealer and incubate at room temperature for 1 hour on a shaking table.
9. Wash X3 in PBST (at least 200µl wash solution per well per wash).

10. Add 100µl per well of 1,000-fold dilution of goat anti-mouse IgG HRP-conjugated antibody (Sigma A-9309 used as supplied, stored at +4°C) using 3% BSA in PBST as a dilutent. Add plate sealer and incubate at room temperature for 1 hour on a shaking table.
11. Wash X3 in PBST (at least 200µl wash solution per well per wash).
12. Develop with 100µl OPD (Sigma, Cat. No. P-9187. Made up as per manufacturers instructions), stop with 50µl 3M H_2SO_4, read at an absorbency of 490nm. Development time is ~ 10 minutes.

7.8 Biacore™ Method Humanised Constructs for IL13 Antibody vs Full Length IL13

The kinetics analysis was performed on a Biacore 3000 machine, using an antibody capture method. Briefly, for the chimeric 6A1 and humanised antibody constructs Protein A capture was used, whilst for the parental murine 6A1 antibody, capture was by a anti-mouse Fc antibody supplied by Biacore.

Briefly, the method is as follows, the capture ligand was immobilised to a CM5 Biosensor chip by primary amine coupling in accordance with Biacore standard protocols and using the reagents supplied in Biacores' primary amine coupling kit. The method involves activation CM5 sensor surface by passing a solution of 50mM N-hydroxy-succinimide (NHS) and 200mM N-ethyl-N'-dimethylaminopropyl carbonide (EDC) over the surface. Then, the capture ligand (dissolved in acetate buffer pH5 or pH4.5) was coupled to the activated sensor surface after which any still activated esters were blocked by an injection of 1M ethanolamine.hydrochloride, pH8.5.

The candidate antibody was then passed over the Protein A or anti-mouse Fc antibody surface, depending on whether it was human or mouse in origin and captured. Once a stable binding signal was seen IL13 was passed over the captured antibody surface at various defined

concentrations. The subsequent binding curves were analysed with Biacore analysis software BIAeval v4.1 to determine kinetics. The experiments were carried out using Biacore HBS-EP buffer.

7.8.1 Biacore™ Method for IL-13 Antibody vs Peptide

The kinetics analysis was performed on a Biacore 3000 machine using direct binding of antibody to immobilised IL-13 peptide. Briefly, IL-13 biotinylated peptide was captured using a Biacore SA (strepavidin) Biosensor chip. The antibodies were then passed over the sensor surface at various concentrations. The subsequent binding curves were analysed with Biacore analysis software BIAeval 4.1 to determine kinetics. The experiment was carried out using Biacore HBS-EP buffer

8. Efficacy of L1+A1 humanised anti-IL-13 mAb in cynomolgus asthma model.

This section is prophetic.

The model of Ascaris suum-induced (A.suum) pulmonary bronchoconstriction in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) is recognised as a non-clinical model of or related to asthma in humans (Patterson R, *et al* Trans. Assoc. Am. Physicians 1980 93:317-325; Patterson R, *et al* J. Lab. Clin. Med. 1983 101:864-872).

In this model, animals having an innate pulmonary sensitivity to A.suum are exposed to nebulised A.suum to induce an asthmatic response. This

asthmatic response can be characterised by measuring airways hyper-responsiveness (AHR), cellular infiltration as measured in broncho alveolar lavage (BAL) fluid and serum IgE levels. Experimental methods are similar to those previously described by Mauser P, *et al* in Am. J. Resp. Crit. Care Med. 1995 204:467-472 and by Evanoff H, *et al* in Immunologic Investigation 1992 21:39.

This study uses 30 animals, preselected for entry having demonstrated a positive bronchoconstrictor response to a specific dose of A.suum antigen. A.suum is administered at the optimal response dose (ORD) for each animal. It is a pre-determined dose of A.suum that produces an increase in R_L (lung resistance) of at least 40% and a decrease in C_{DYN} (dynamic compliance) of at least 35%, by aerosol inhalation (for a single dose given over 15 breaths using a neublizer).

The study takes place in 2 phases. During phase 1, AHR is assessed in response to intravenous (I/v) histamine challenge (that is a dose of histamine sufficient to induce an increase in R_L of at least 30% above baseline (PC_{30})) both before (the baseline pulmonary function assessment on day 1) and after (on day 11) administering A.suum antigen (on days 9 and 10, when A.suum is administered at an optimal pre-determined dose for each animal by aerosol inhalation).

Phase 2 is identical to phase 1 except that animals receive treatment with antibody (see below), each antibody is given as 3 doses of approximately 30mg/kg administered by I/v infusion on days 1, 5 and 9.

Group 1 (n=12): L1+A1 (humanised anti-IL-13 mAb, SEQ.I.D.NO:18 and SEQ.I.D.NO:22)

Group 2 (n=12): L1+A1 (humanised anti-IL-13 mAb, 30mg/kg) and Pascolizumab (humanised anti-IL4 mAb, 30mg/kg)

Group 3 (n=6): vehicle alone negative control treatment

The AHR readouts from phases 1 and 2 are calculated by taking pressure and airflow readings - lung resistance (R_L) and dynamic compliance (C_{DYN}) – in response to histamine, using the Buxco pulmonary mechanics system. The maximum percentage change from the baseline compared to post A.suum antigen challenge [for lung resistance (R_L) and dynamic compliance (C_{DYN})] is compared for phases 1 and 2 i.e. with or without antibody treatment, and these data are used to assess the AHR phenotype.

In addition BAL samples are taken at days 1 and 11 in phases 1 and 2, to measure cellular infiltration and in particular eosinophilia. Serum samples are also taken to monitor IgE levels.

Table A

Protein or polynucleotide (PN) description	Sequence identifier (SEQ.I.D.NO:)
6A1, CDRH1	1
6A1, CDRH2	2
6A1, CDRH3	3
6A1, CDRL1	4
6A1, CDRL2	5
6A1, CDRL3	6
6A1, VH (murine)	7
6A1, VL (murine)	8
hIL-13	9
hIL-13 (PN)	10
6A1, VH, humanised construct A1	11
6A1, VH, humanised construct A2	12
6A1, VH, humanised construct A3	13
6A1, VH, humanised construct A4	14
6A1, VL, humanised construct L1	15
6A1, VL, humanised construct L2	16
6A1, heavy chain, humanised construct A1	18
6A1, heavy chain, humanised construct A2	19
6A1, heavy chain, humanised construct A3	20
6A1, heavy chain, humanised construct A4	21

6A1, light chain, humanised construct L1	22
6A1, light chain, humanised construct L2	23
6A1, PN encoding SEQ.I.D.NO:7	24
6A1, PN encoding SEQ.I.D.NO:8	25
6A1, PN encoding SEQ.I.D.NO:11	26
6A1, PN encoding SEQ.I.D.NO:12	27
6A1, PN encoding SEQ.I.D.NO:13	28
6A1, PN encoding SEQ.I.D.NO:14	29
6A1, PN encoding SEQ.I.D.NO:15	30
6A1, PN encoding SEQ.I.D.NO:16	31
6A1, PN encoding SEQ.I.D.NO:18	32
6A1, PN encoding SEQ.I.D.NO:19	33
6A1, PN encoding SEQ.I.D.NO:20	34
6A1, PN encoding SEQ.I.D.NO:21	35
6A1, PN encoding SEQ.I.D.NO:22	36
6A1, PN encoding SEQ.I.D.NO:23	37

Claims

1. A therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof which specifically binds hIL-13 and neutralises the activity thereof.

2. A therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof which specifically binds hIL-13 and modulates (e.g. inhibits or blocks) the interaction between hIL-13 and hIL-13R.

3. A therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof which specifically binds hIL-13 and modulates (e.g. inhibits or blocks) the interaction between hIL-13 and hIL-13R and comprises the following CDRH3: SEQ.I.D.NO:3.

4. A therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof which specifically binds hIL-13 and modulates the interaction between hIL-13 and hIL-13R which antibody or fragment thereof comprises the following CDRs:

CDRH1: SEQ.I.D.NO:1
CDRH2: SEQ.I.D.NO:2
CDRH3: SEQ.I.D.NO:3
CDRL1: SEQ.I.D.NO:4
CDRL2: SEQ.I.D.NO:5
CDRL3: SEQ.I.D.NO:6

5. A therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof which specifically binds the epitope set forth in SEQ.I.D.NO:84 of

SEQ.I.D.NO:9 and modulates the interaction between hIL-13 and hIL-13R.

6. A therapeutic antibody or antigen binding fragment of claim 5 wherein the antibody binds between residues 103 to 107 inclusively of SEQ.I.D.NO:9.
7. A therapeutic antibody or antigen binding fragment of claim 6 wherein the binding of the antibody with hIL-13 depends upon the presence of an arginine residue at position 107 of SEQ.I.D.NO:9.
8. A therapeutic antibody or antigen binding fragment of claim 7 wherein substitution of the arginine residue at position 107 of SEQ.I.D.NO:9 with an alanine residue leads to a loss of binding between said antibody and hIL-13 compared to the binding between said antibody and antigen binding fragment thereof and SEQ.I.D.NO:9 without said substitution at position 107 of SEQ.I.D.NO:9.
9. A therapeutic antibody or antigen binding fragment of any preceding claim wherein the antibody is an intact antibody.
10. A therapeutic antibody or antigen binding fragment of claim 9 wherein the antibody is a rat, mouse, primate (e.g. cynomolgus, Old World monkey or Great Ape) or human.
11. A therapeutic antibody of any one of claims 1 to 8 wherein the antibody is humanised or chimaeric antibody.
12. The antibody of any one of claims 9 to 11 wherein the antibody comprises a human constant region.
13. The antibody of claim 12 wherein the antibody comprises a constant region of IgG isotype.
14. The antibody of claim 13 wherein the antibody is IgG1 or IgG4.
15. A murine antibody of claim 10 comprising a VH domain of SEQ.I.D.NO:7 and a VL domain of SEQ.I.D.NO:8.

16. A humanised antibody of claim 11 comprising a VH domain of SEQ.I.D.NO:11 and a VL domain of SEQ.I.D.NO:15.
17. A humanised antibody of claim 11 comprising a VH domain of SEQ.I.D.NO:12 and a VL domain of SEQ.I.D.NO:15.
18. A humanised antibody of claim 11 comprising a VH domain of SEQ.I.D.NO:13 and a VL domain of SEQ.I.D.NO:15.
19. A humanised antibody of claim 11 comprising a VH domain of SEQ.I.D.NO:14 and a VL domain of SEQ.I.D.NO:15.
20. A humanised antibody of claim 11 comprising a VH domain of SEQ.I.D.NO:11 and a VL domain of SEQ.I.D.NO:16.
21. A humanised antibody of claim 11 comprising a VH domain of SEQ.I.D.NO:12 and a VL domain of SEQ.I.D.NO:16.
22. A humanised antibody of claim 11 comprising a VH domain of SEQ.I.D.NO:13 and a VL domain of SEQ.I.D.NO:16.
23. A humanised antibody of claim 11 comprising a VH domain of SEQ.I.D.NO:14 and a VL domain of SEQ.I.D.NO:16.
24. A humanised antibody of any one of claims 16 to 23 further comprising a human constant region of a IgG isotype (e.g. IgG1 or IgG4).
25. A humanised antibody comprising a heavy chain of SEQ.I.D.NO:18 and a light chain of SEQ.I.D.NO:22.
26. A humanised antibody comprising a heavy chain of SEQ.I.D.NO:19 and a light chain of SEQ.I.D.NO:22.
27. A humanised antibody comprising a heavy chain of SEQ.I.D.NO:20 and a light chain of SEQ.I.D.NO:22.
28. A humanised antibody comprising a heavy chain of SEQ.I.D.NO:21 and a light chain of SEQ.I.D.NO:22.
29. A humanised antibody comprising a heavy chain of SEQ.I.D.NO:18 and a light chain of SEQ.I.D.NO:23.

30. A humanised antibody comprising a heavy chain of SEQ.I.D.NO:19 and a light chain of SEQ.I.D.NO:23.

31. A humanised antibody comprising a heavy chain of SEQ.I.D.NO:20 and a light chain of SEQ.I.D.NO:23.

32. A humanised antibody comprising a heavy chain of SEQ.I.D.NO:21 and a light chain of SEQ.I.D.NO:23.

33. A humanised therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof which specifically binds hIL-13 wherein said antibody or fragment thereof comprises CDRH3 (SEQ.I.D.NO:3) optionally further comprising CDRs of SEQ.I.D.NO:1,2,4,5 and 6 wherein the residues selected from the group consisting of 19,38,73 and 81 of the human acceptor heavy chain framework region and the residue at position 85 of the human acceptor light chain framework are substituted by the corresponding residues found in the donor antibody framework from which CDRH3 is derived.

34. A humanised therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof which specifically binds hIL-13 wherein said antibody or fragment thereof comprises CDRH3 (SEQ.I.D.NO:3) optionally further comprising CDRs of SEQ.I.D.NO:1, 2, 4, 5 and 6 wherein the human heavy chain framework comprises one or more (e.g. all) of the following residues (or a conservative substitute thereof):

Position	**Residue**
39	I
20	R
74	T
81	R

and the human light chain comprises

Position	**Residue**

85 V

35. An antigen binding fragment of any of the preceding claims wherein the fragment is a Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, diabody, triabody, tetrabody, miniantibody, minibody, isolated VH, isolated VL.

36. An antibody according to any one of claims 12 to 14 comprising a mutated Fc region such that said antibody has reduced ADCC and/or complement activation.

37. A therapeutic antibody that competitively inhibits the binding of an antibody of any preceding claim to hIL-13.

38. A recombinant transformed or transfected host cell comprising a first and second vector, said first vector comprising a polynucleotide encoding a heavy chain of an antibody according to any preceding claim and said second vector comprising a polynucleotide encoding a light chain of any preceding claim.

39. The host cell of claim 38 wherein the first vector comprises a polynucleotide of SEQ.I.D.NO:7 and a second vector comprises a polynucleotide of SEQ.I.D.NO:8.

40. The host cell of claim 38 wherein the first vector comprises a polynucleotide selected from the group consisting of SEQ.I.D.NO: 26, SEQ.I.D.NO:27, SEQ.I.D.NO:28, SEQ.I.D.NO:29, SEQ.I.D.NO:32, SEQ.I.D.NO:33, SEQ.I.D.NO:34, SEQ.I.D.NO:35 and a second vector comprising a polynucleotide selected from the group consisting of; SEQ.I.D.NO:15, SEQ.I.D.NO:16. SEQ.I.D.NO:36, SEQ.I.D.NO:37.

41. The host cell of any one of claims 38 to 40 wherein the cell is eukaryotic.

42. The host cell of claim 41 wherein the cell is mammalian.

43. The host cell of claim 41 or 42 wherein the cell is CHO or NS0.

44. A method for the production of a therapeutic antibody of any one of claims 1 to 37 which method comprises the step of culturing a host cell of any one of claims 38 to 43 in a serum-free culture media.
45. The method of claim 44 wherein said antibody is secreted by said host cell into said culture media.
46. The method of claim 45 wherein said antibody is further purified to at least 95% or greater (e.g. 98% or greater) with respect to said antibody containing culture media.
47. A pharmaceutical composition comprising a therapeutic antibody or antigen fragment binding thereof of any one of claims 1 to 37 and a pharmaceutically acceptable carrier.
48. A kit-of-parts comprising the composition of claim 47 together with instructions for use.
49. A method of treating a human patient afflicted with asthma which method comprises the step of administering a therapeutically effective amount of therapeutic antibody of 1 to 37.
50. The method of claim 49 wherein said patient is afflicted with allergic asthma.
51. The method of claim 49 wherein the patient is afflicted with severe asthma.
52. The method of claim 49 wherein the patient is afflicted with difficult asthma.
53. The method of claim 49 wherein the patient is afflicted with brittle asthma.
54. The method of claim 49 wherein the patient is afflicted with nocturnal asthma, premenstrual asthma, steroid resistant asthma, steroid dependent asthma, aspirin induced asthma, adult-onset asthma, paediatric asthma.
55. A method of treating a human patient afflicted with an asthmatic condition which is refractory to treatment with corticosteroids which method comprises the step of administering to said patient a

therapeutically effective amount of the antibody or antigen binding fragment of any one of claims 1 to 37.

56. A method of preventing acute asthmatic attacks in a human patient which method comprises the step of administering to said patient a therapeutically effective amount of an antibody of claims 1 to 37.

57. A method of reducing the frequency of and/or mitigating the effects of acute asthmatic attacks in a human patient which method comprises the step of administering to said patient a therapeutically effective amount of an antibody of any one of claims 1 to 37.

58. A method of treating a human patient afflicted with a disease or disorder selected from the group consisting of atopic dermatitis, allergic rhinitis, Crohn's disease, COPD, fibrotic diseases or disorders such as idiopathic pulmonary fibrosis, progressive systemic sclerosis, hepatic fibrosis, hepatic granulomas, schistosomiasis, leishmaniasis, diseases of cell cycle regulation such as Hodgkins disease, B cell chronic lymphocytic leukaemia.

59. Use of a therapeutic antibody or antigen binding fragment thereof of any one of claims 1 to 37 in the manufacture of a medicament for the treatment of a disease or disorder selected from the group consisting of;

Allergic asthma, severe asthma, difficult asthma, brittle asthma, nocturnal asthma, premenstrual asthma, steroid resistant asthma, steroid dependent asthma, aspirin induced asthma, adult-onset asthma, paediatric asthma, atopic dermatitis, allergic rhinitis, Crohn's disease, COPD, fibrotic diseases or disorders such as idiopathic pulmonary fibrosis, progressive systemic sclerosis, hepatic fibrosis, hepatic granulomas, schistosomiasis, leishmaniasis, diseases of cell cycle regulation such as Hodgkins disease, B cell chronic lymphocytic leukaemia.

60. The antibody or antigen binding fragment thereof of any one of claims 1 to 37 wherein the antibody inhibits the binding between hIL-13 and hIL-13R.

61. The antibody or antigen binding fragment thereof of claim 60 wherein the antibody blocks the binding between hIL-13 and hIL-13R.

62. A therapeutic antibody that specifically binds hIL-13 and modulates (e.g. inhibits or blocks) the interaction between hIL-13 and hIL-13R which antibody binds the KKLFR epitope of SEQ.I.D.NO:9.

63. A therapeutic antibody that specifically binds hIL-13 and modulates (e.g. inhibits or blocks) the interaction between hIL-13 and hIL-13R and has a dissociation constant k_{off} in the range 1.4×10^{-4} to 8.22×10^{-5} s^{-1} (for example as measured by Biacore™).

64. The therapeutic antibody of claim 63 comprising a CDRH3 of SEQ.I.D.NO:3.

65. The therapeutic antibody of claim 64 further comprising CDRH1 of SEQ.I.D.NO:1, CDRH2 of SEQ.I.D.NO:2, CDRL1 of SEQ.I.D.NO:4, CDRL2 of SEQ.I.D.NO:5 and CDRL3 of SEQ.I.D.NO:6.

66. The therapeutic antibody of claim 65 wherein the antibody is humanised.

67. A method of treating a human patient afflicted with a disease or disorder selected from the group consisting of; Allergic asthma, severe asthma, difficult asthma, brittle asthma, nocturnal asthma, premenstrual asthma, steroid resistant asthma, steroid dependent asthma, aspirin induced asthma, adult-onset asthma, paediatric asthma, atopic dermatitis, allergic rhinitis, Crohn's disease, COPD, fibrotic diseases or disorders such as idiopathic pulmonary fibrosis, progressive systemic sclerosis, hepatic fibrosis, hepatic granulomas, schistosomiasis, leishmaniasis, diseases of cell cycle regulation

such as Hodgkins disease, B cell chronic lymphocytic leukaemia; which method comprises administering a therapeutically effective amount of an antibody of any one of claims 1 to 37 and a therapeutically effective amount of an anti-IL-4 monoclonal antibody.

68. The method of claim 67 wherein the anti-IL-4 monoclonal antibody is administered simultaneously, sequentially or separately with the antibody of any one of claims 1 to 37.

69. The method of claim 67 or 68 wherein the anti-IL-4 antibody is pascolizumab.

70. Use of an antibody of any one of claims 1 to 37 and an anti-IL-4 monoclonal antibody such as pascolizumab in the manufacture of a medicament for the treatment of a disease or disorder selected from the group consisting of; Allergic asthma, severe asthma, difficult asthma, brittle asthma, nocturnal asthma, premenstrual asthma, steroid resistant asthma, steroid dependent asthma, aspirin induced asthma, adult-onset asthma, paediatric asthma, atopic dermatitis, allergic rhinitis, Crohn's disease, COPD, fibrotic diseases or disorders such as Idiopathic pulmonary fibrosis, progressive systemic sclerosis, hepatic fibrosis, hepatic granulomas, schistosomiasis, leishmaniasis, diseases of cell cycle regulation such as Hodgkins disease, B cell chronic lymphocytic leukaemia.

71. Use of an antibody of any one of claims 1 to 37 and an anti-IL-4 monoclonal antibody such as pascolizumab in the manufacture of a kit-of-parts for the treatment of a disease or disorder selected from the group consisting of; Allergic asthma, severe asthma, difficult asthma, brittle asthma, nocturnal asthma, premenstrual asthma, steroid resistant asthma, steroid dependent asthma, aspirin induced asthma, adult-onset asthma, paediatric

asthma, atopic dermatitis, allergic rhinitis, Crohn's disease, COPD, fibrotic diseases or disorders such as idiopathic pulmonary fibrosis, progressive systemic sclerosis, hepatic fibrosis, hepatic granulomas, schistosomiasis, leishmaniasis, diseases of cell cycle regulation such as Hodgkins disease, B cell chronic lymphocytic leukaemia.

72. A kit-of-parts comprising a first pharmaceutical composition comprising an antibody of any one of claims 1 to 37 and a pharmaceutically acceptable carrier and a second pharmaceutical composition comprising an anti-IL-4 monoclonal antibody such as pascolizumab and a pharmaceutically acceptable carrier optionally together with instructions for use.

73. A pharmaceutical composition comprising a first antibody of any one of claims 1 to 37 and a second antibody wherein said second antibody is an anti-IL-4 antibody such as pascolizumab and a pharmaceutically acceptable carrier.

159

Figure 1

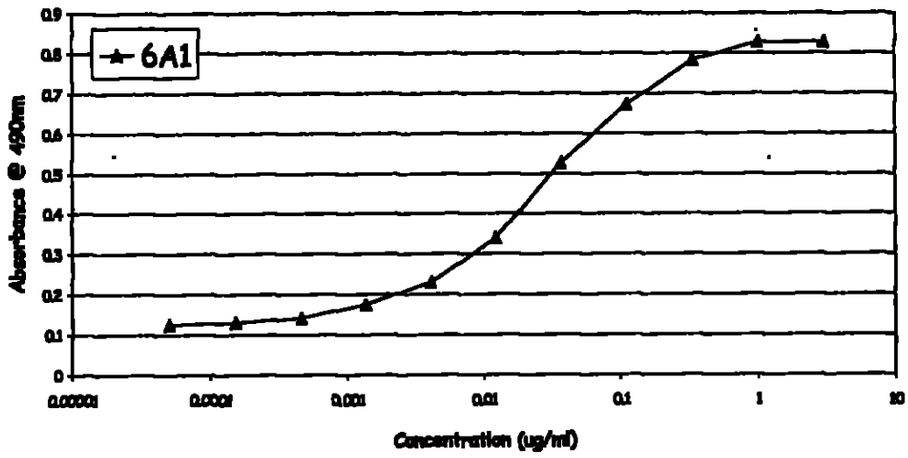

6A1
Absorbance @ 490nm
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
Concentration (ug/ml)

Figure 2a

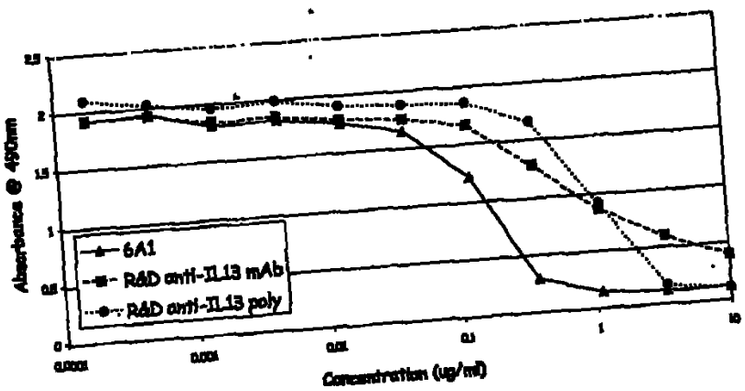

Absorbance @ 490nm
2.5
2
1.5
1
0.5
0
6A1
R&D anti-IL13 mAb
R&D anti-IL13 poly
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
Concentration (ug/ml)

Figure 2b

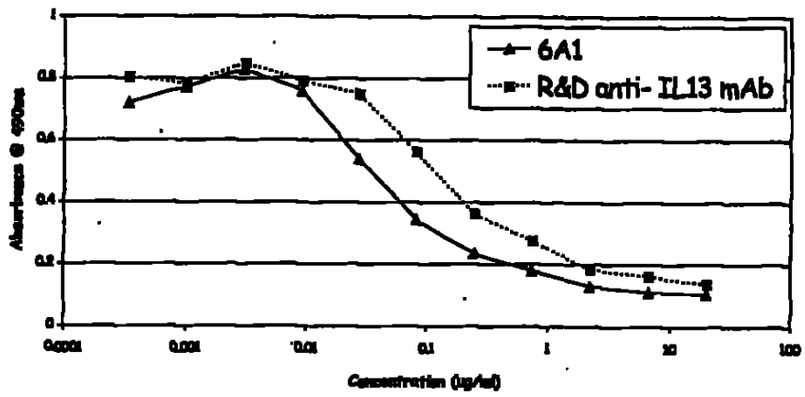


Figure 3

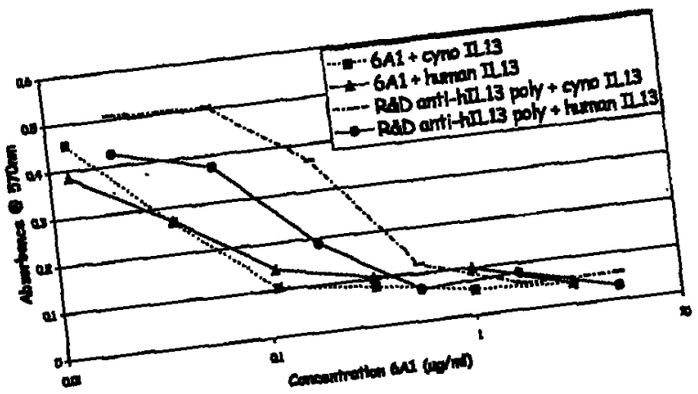

6A1 + cyno IL13
6A1 + human IL13
R&D anti-hIL13 poly + cyno IL13
R&D anti-hIL13 poly + human IL13
Absorbance @ 570nm
Concentration 6A1 (µg/ml)

Figure 4

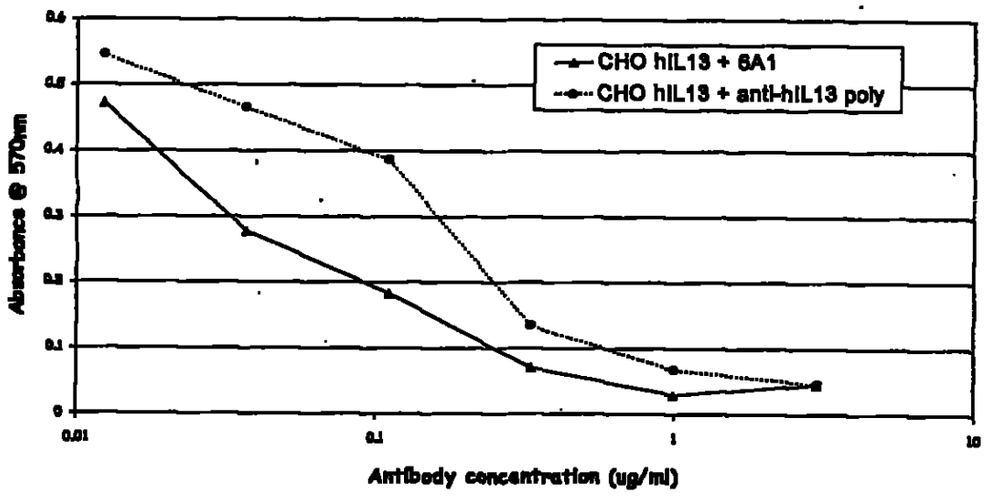

CHO hIL13 + 6A1
CHO hIL13 + anti-hIL13 poly
Absorbance @ 570nm
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0.01
0.1
1
10
Antibody concentration (ug/ml)

Figure 5

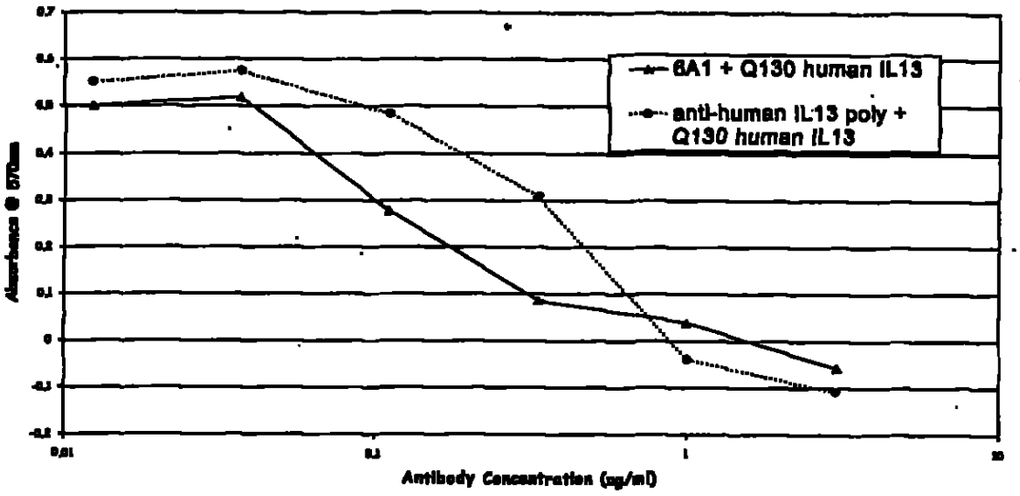

6A1 + Q130 human IL13
anti-human IL13 poly + Q130 human IL13
Antibody Concentration (ng/ml)

Figure 6

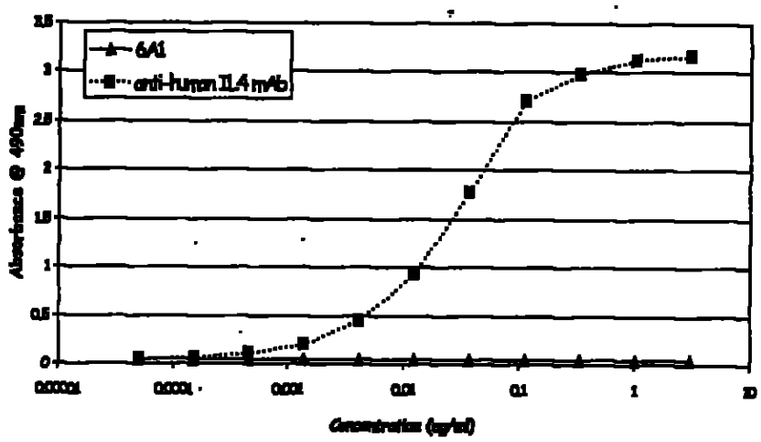

6A1
anti-human IL4 mAb
Absorbance @ 490nm
Concentration (ng/ml)

Figure 7

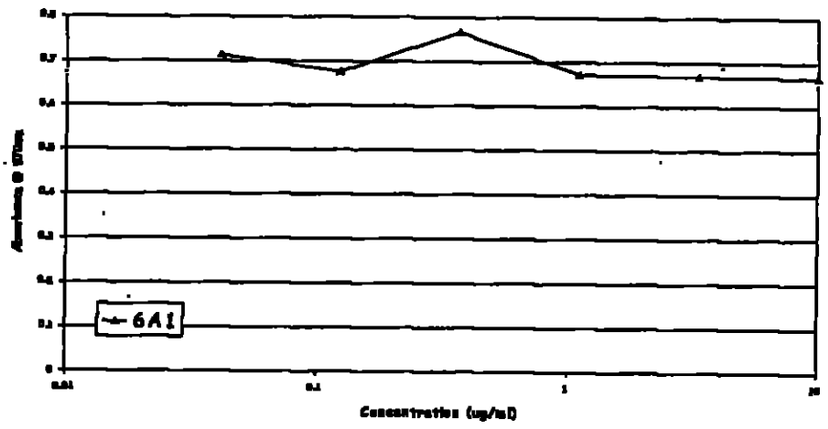


Figure 8

Figure 9

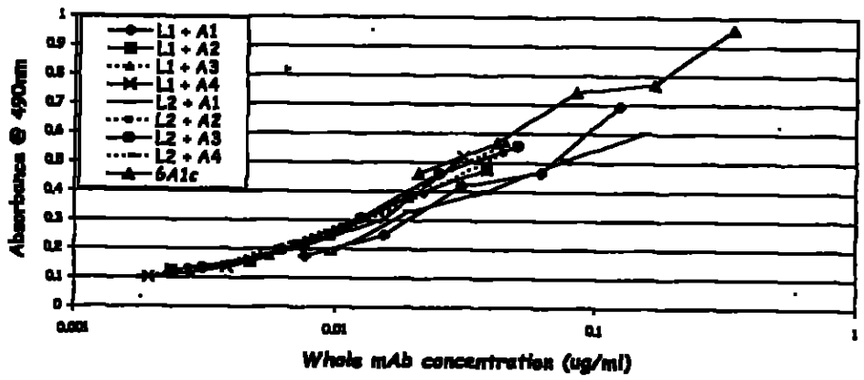

L1 + A1
L1 + A2
L1 + A3
L1 + A4
L2 + A1
L2 + A2
L2 + A3
L2 + A4
6A1c
Absorbance @ 490nm
Whole mAb concentration (ug/ml)

Figure 10a.

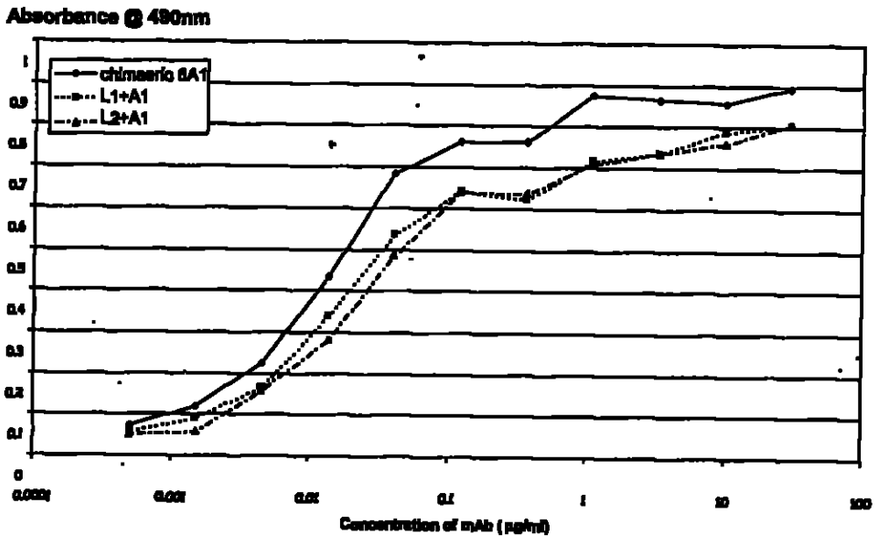
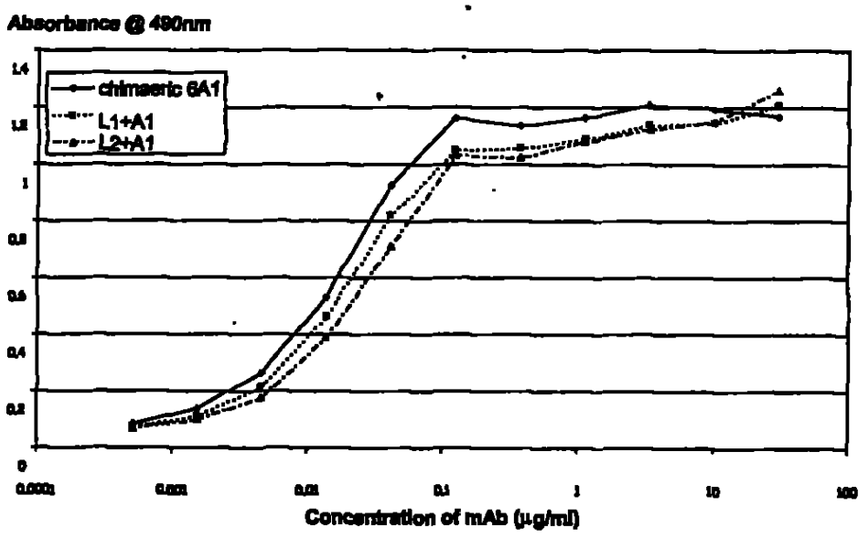

Absorbance @ 490nm
chimaeric 8A1
L1+A1
L2+A1
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Concentration of mAb (µg/ml)

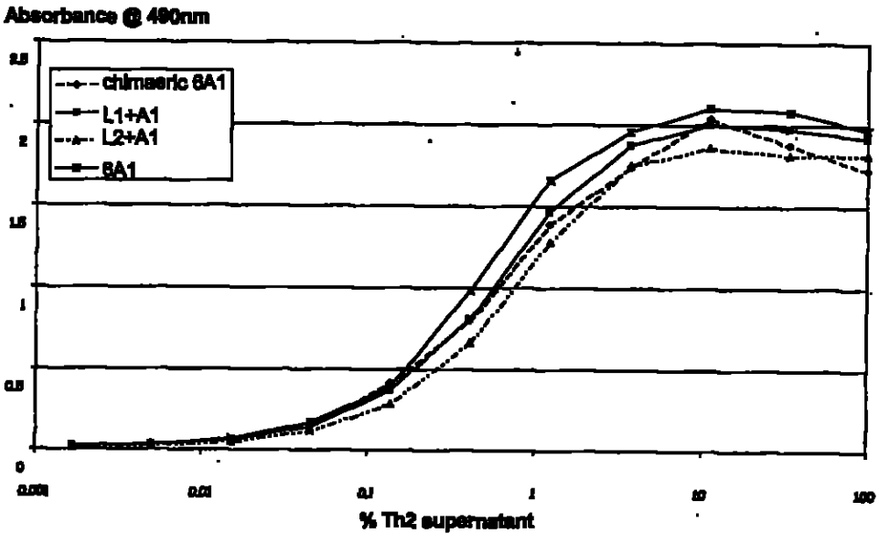
Figure 10b.


Absorbance @ 490nm
chimaeric 6A1
L1+A1
L2+A1
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Concentration of mAb (µg/ml)

171

169

Figure 11.



172

~~170~~

Figure 12a.

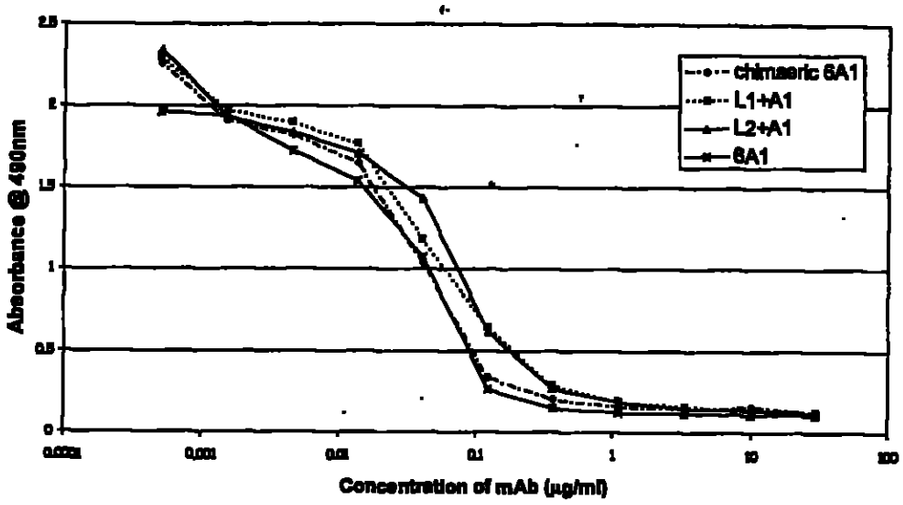
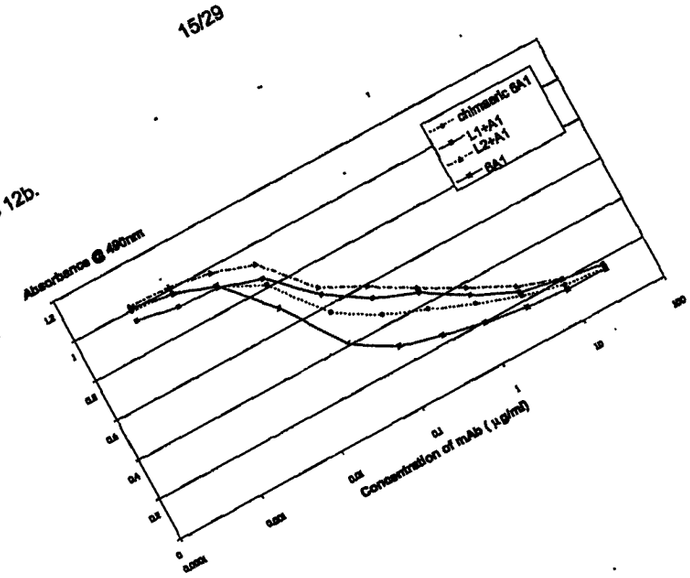


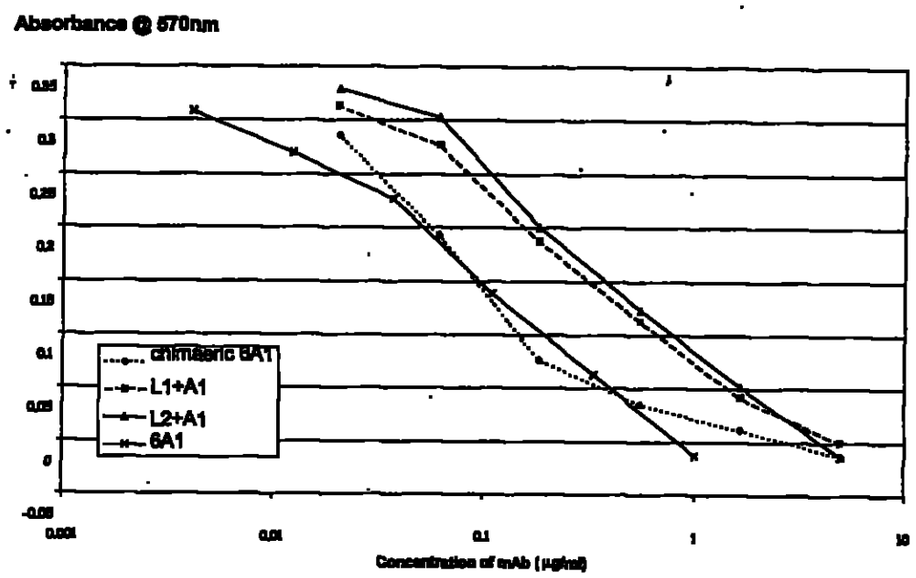
Figure 12b.


chimeric 6A1
L1+A1
L2+A1
6A1
Absorbance @ 490nm
Concentration of mAb (µg/ml)

194

172

Figure 13a.



175

Figure 13b.

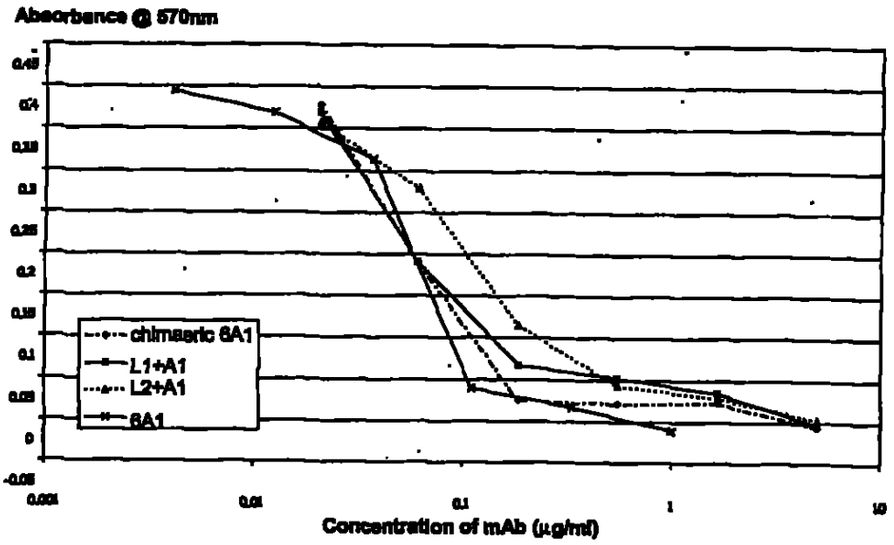


Figure 13c.

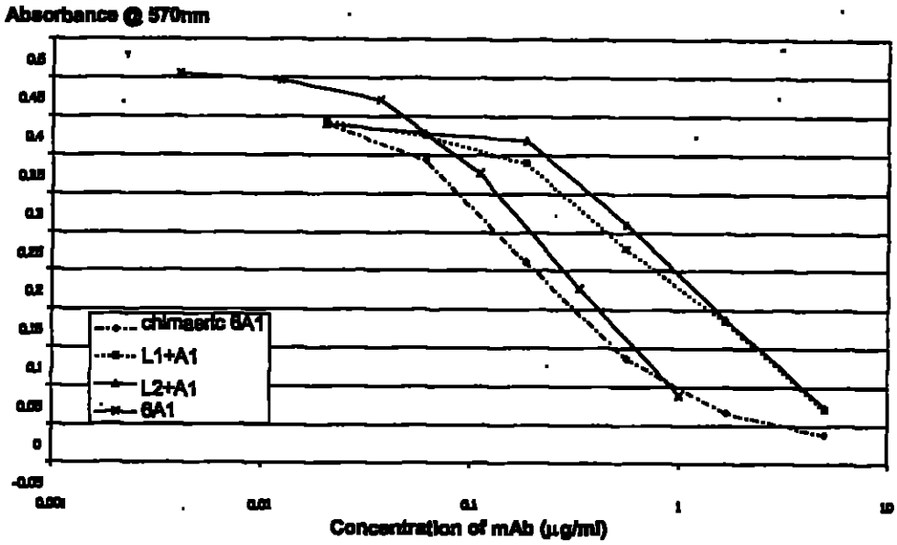

Absorbance @ 570nm
chimaeric 6A1
L1+A1
L2+A1
6A1
Concentration of mAb (µg/ml)

Figure 13d.

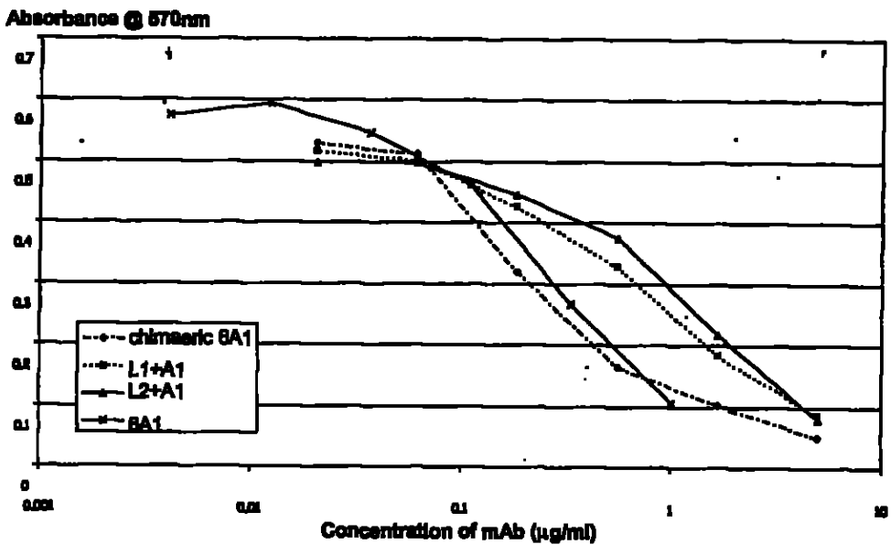

Absorbance @ 570nm
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
chimaeric 8A1
L1+A1
L2+A1
8A1
0.001
0.01
0.1
1
10
Concentration of mAb (µg/ml)

Figure 14a.

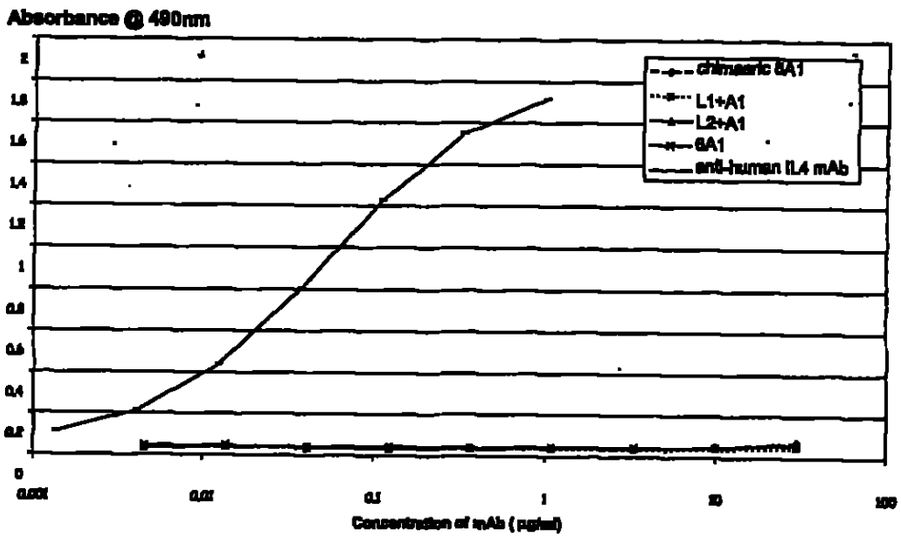

Absorbance @ 490nm
chimaeric 6A1
L1+A1
L2+A1
6A1
anti-human IL4 mAb
Concentration of mAb (ng/ml)

Figure 14b.

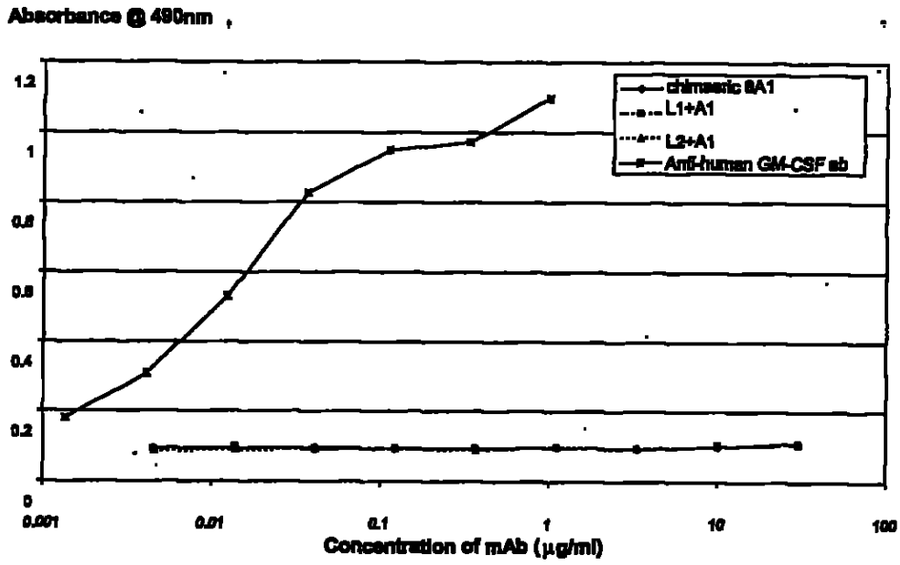

Absorbance @ 490nm
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Concentration of mAb (µg/ml)
chimeric 8A1
L1+A1
L2+A1
Anti-human GM-CSF ab

Figure 14c.

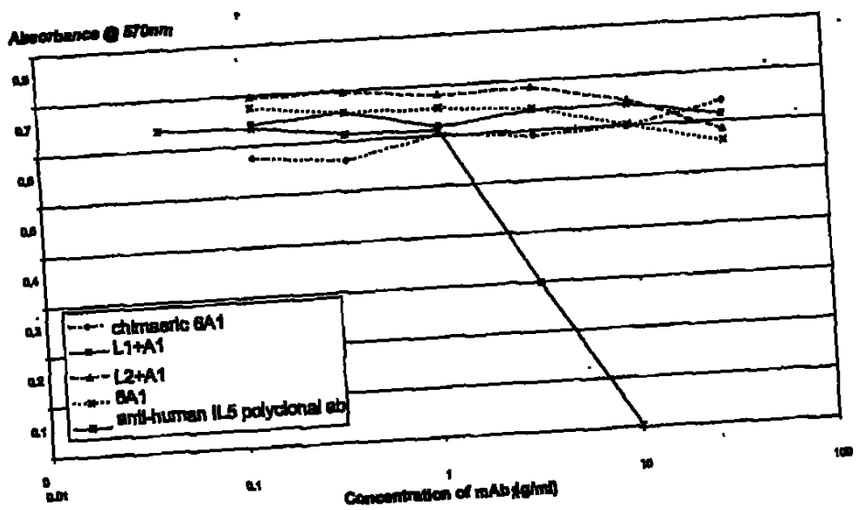

Absorbance @ 570nm
chimaeric 6A1
L1+A1
L2+A1
6A1
anti-human IL5 polyclonal ab
Concentration of mAb (g/ml)

Figure 15.

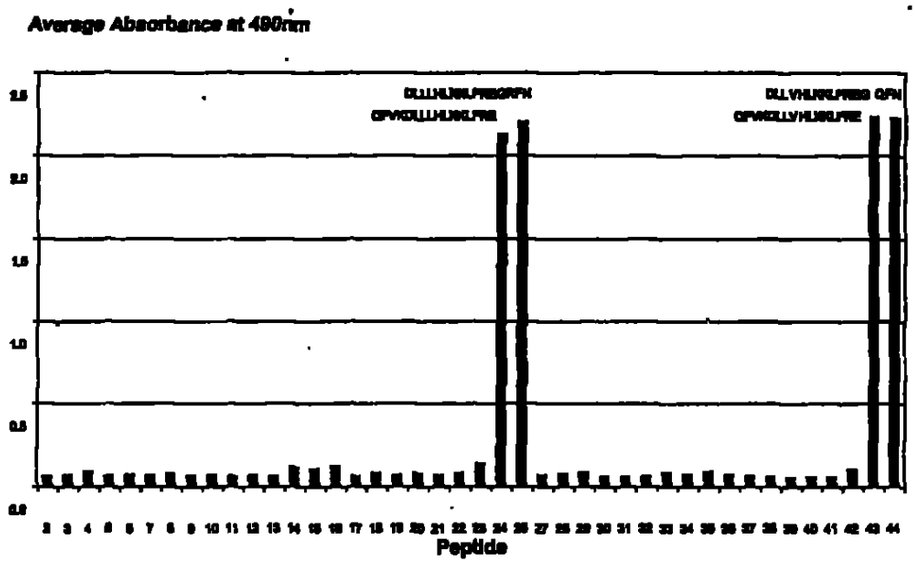


Figure 16a.

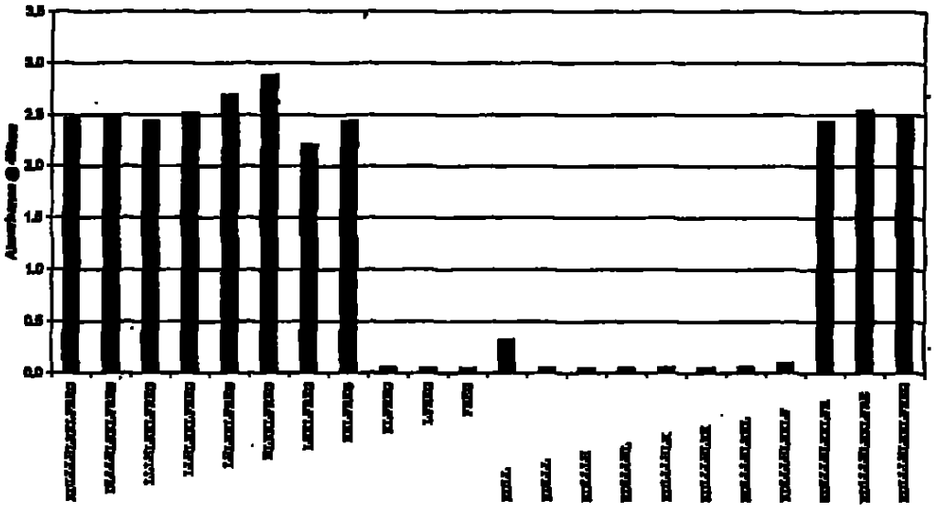


Figure 16b.

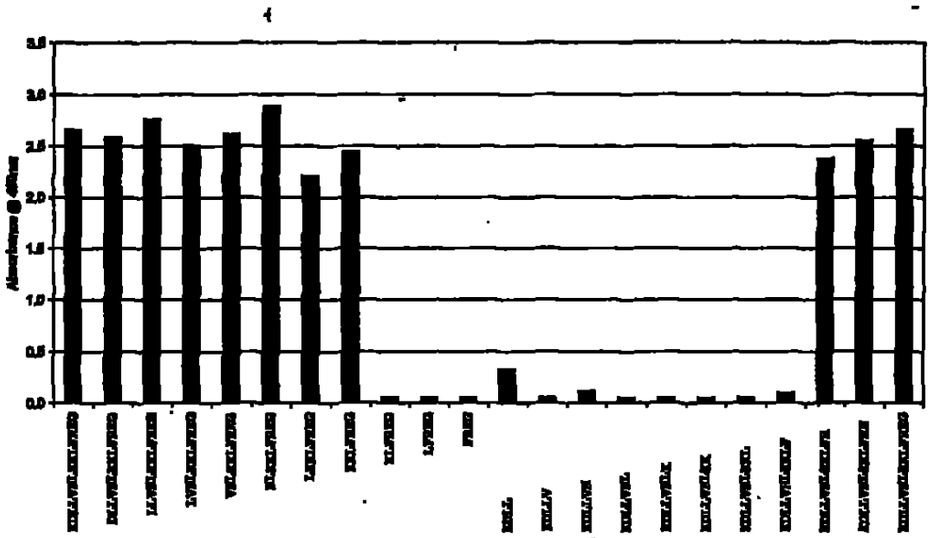
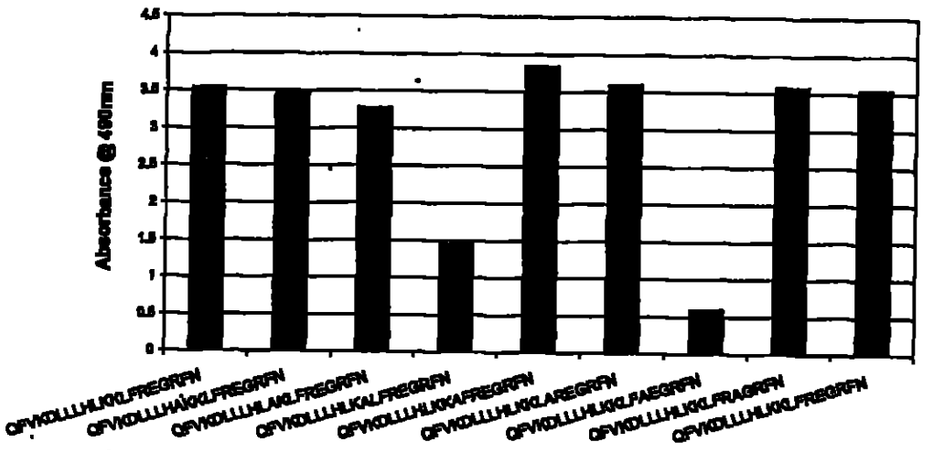


Figure 17a


Absorbance @ 490nm
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
QFVKDLLLHLKKLFREGRFN
QFVKDLLLHAKKLFREGRFN
QFVKDLLLHLAKLFREGRFN
QFVKDLLLHLKALFREGRFN
QFVKDLLLHLKKAFREGRFN
QFVKDLLLHLKKLAREGRFN
QFVKDLLLHLKKLFAEGRFN
QFVKDLLLHLKKLFRAGRFN
QFVKDLLLHLKKLFREGRFN

185
183

Figure 17b



Figure 17c

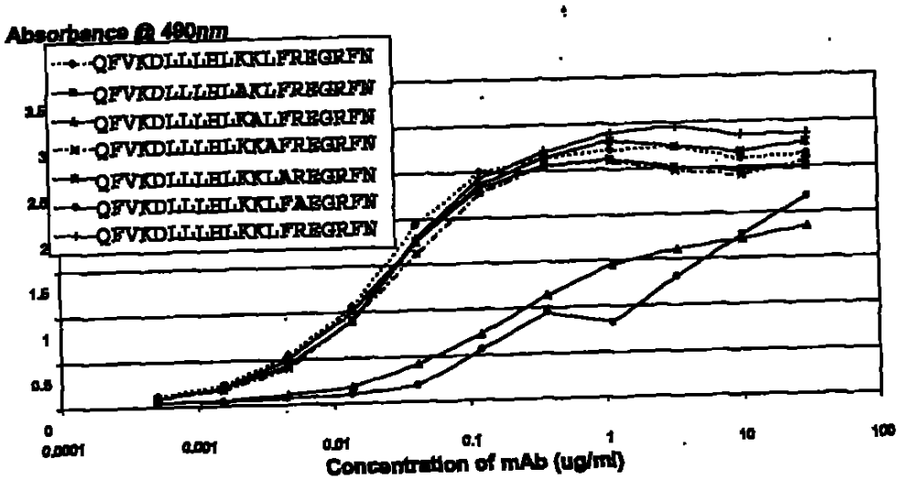
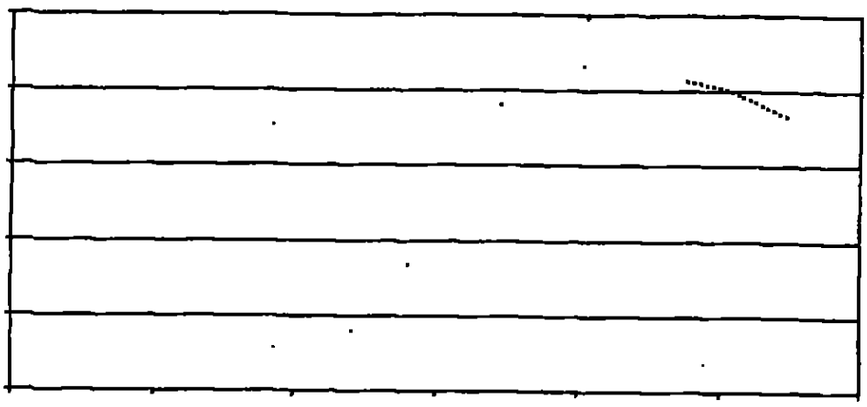

Absorbance @ 490nm
QFVKDLLLHLKKLFREGRFN
QFVKDLLLHLAKLFREGRFN
QFVKDLLLHLKALFREGRFN
QFVKDLLLHLKKAFREGRFN
QFVKDLLLHLKKLAREGRFN
QFVKDLLLHLKKLFAEGRFN
QFVKDLLLHLKKLFREGRFN
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Concentration of mAb (ug/ml)

Figure 17d



SEQUENCE LISTING

SEQ.I.D.NO:1

FYIKDTYMH

SEQ.I.D.NO:2

TIDPANGNTKYVPKFQG

SEQ.I.D.NO:3

SIYDDYHYDDYYAMDY

SEQ.I.D.NO:4

RSSQNIVHINGNTYLE

SEQ.I.D.NO:5

KISDRFS

SEQ.I.D.NO:6

FQGSHVPWT

SEQ.I.D.NO:7

EIQLQQSVAELVRPGASVRLSCTASGFYIKDTYMHWVIQRPEQGLEWIGTIDPAN
GNTKYVPKFQGKATITADTSSNTAYLRLSSLTSEDTAIYYCARSIYDDYHYDDYY
AMDYWGQGTSVTVSS.

SEQ.I.D.NO:8

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQNIVHINGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYK
ISDRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPWTFGGGTKLE
IK.

SEQ.I.D.NO:9

GPVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALESLINVSG
CSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLLHLKKLFREGR
FN

SEQ.I.D.NO:10

GGCCCTGTGCCTCCCTCTACAGCCCTCAGGGAGCTCATTGAGGAGCTGGTCAACA
TCACCCAGAACCAGAAGGCTCCGCTCTGCAATGGCAGCATGGTATGGAGCATCAA
CCTGACAGCTGGCATGTACTGTGCAGCCCTGGAATCCCTGATCAACGTGTCAGGC
TGCAGTGCCATCGAGAAGACCCAGAGGATGCTGAGCGGATTCTGCCCGCACAAGG
TCTCAGCTGGGCAGTTTTCCAGCTTGCATGTCCGAGACACCAAAATCGAGGTGGC
CCAGTTTGTAAAGGACCTGCTCTTACATTTAAAGAAACTTTTTCGCGAGGGACGG
TTCAACTGA

SEQ.I.D.NO:11

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWVRQAPGQGLEWMGTIDPAN
GNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSIYDDYHYDDYY
AMDYWGQGTLVTVSS

SEQ.I.D.NO:12

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWVIQAPGQGLEWMGTIDPAN
GNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSIYDDYHYDDYY
AMDYWGQGTLVTVSS

SEQ.I.D.NO:13

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWVIQAPGQGLEWMGTIDPAN
GNTKYVPKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSIYDDYHYDDYY
AMDYWGQGTLVTVSS

SEQ.I.D.NO:14

QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGFYIKDTYMHWVIQAPGQGLEWMGTIDPAN
GNTKYVPKFQGRVTITADTSTSTAYMRLSSLRSEDTAVYYCARSIYDDYHYDDYY
AMDYWGQGTLVTVSS

SEQ.I.D.NO:15

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQNIVHINGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYK
ISDRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADDVGIYYCFQGSHVPWTFGQGTKLE
IK

SEQ.I.D.NO:16

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQNIVHINGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYK
ISDRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADDVGVYYCFQGSHVPWTFGQGTKLE
IK

SEQ.I.D.NO:17

MGWSCIILFLVATATGVHS

SEQ.I.D.NO:18

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWVRQAPGQGLEWMGTIDPAN
GNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSIYDDYHYDDYY
AMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

SEQ.I.D.NO:19

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWVIQAPGQGLEWMGTIDPAN
GNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSIYDDYHYDDYY
AMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS

192
190

WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

SEQ.I.D.NO:20

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWVIQAPGQGLEWMGTIDPAN
GNTKYVPKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSIYDDYHYDDYY
AMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

SEQ.I.D.NO:21

QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGFYIKDTYMHWVIQAPGQGLEWMGTIDPAN
GNTKYVPKFQGRVTITADTSTSTAYMRLSSLRSEDTAVYYCARSIYDDYHYDDYY
AMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

194
193

SEQ.I.D.NO:22

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQNIVHINGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYK
ISDRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADDVGIYYCFQGSHVPWTFGQGTKLE
IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKQSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ.I.D.NO:23

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQNIVHINGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYK
ISDRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADDVGVYYCFQGSHVPWTFGQGTKLE
IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ.I.D.NO:24

GAAATTCAGCTGCAGCAGTCTGTGGCAGAACTTGTGAGGCCAGGGGCCTCAGTCA
GGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCTACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGT
GATTCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAACGATTGATCCTGCGAAT
GGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAACTGCAGACA
CATCCTCCAACACAGCCTACCTGCGGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGC
CATCTATTACTGTGCTAGAAGCATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTAT
GCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

SEQ.I.D.NO:25

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAG
CCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAACATTGTACATATTAATGGAAACACCTA
TTTAGAATGGTACCTTCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAA

ATTTCCGACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGA
CAGATTTCACGCTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTA
CTGCTTTCAAGGTTCACATGTTCCGTGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAA
ATCAAA

SEQ.I.D.NO:26

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGA
AGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATTCTACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGT
GCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAACGATTGATCCTGCGAAT
GGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACG
AATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGC
CGTGTATTACTGTGCGAGAAGCATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTAT
GCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAGTCTCCTCA

SEQ.I.D.NO:27

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGA
AGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATTCTACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGT
GATACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAACGATTGATCCTGCGAAT
GGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACG
AATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGC
CGTGTATTACTGTGCGAGAAGCATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTAT
GCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAGTCTCCTCA

SEQ.I.D.NO:28

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGA
AGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATTCTACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGT
GATACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAACGATTGATCCTGCGAAT
GGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACA

CATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGC
CGTGTATTACTGTGCGAGAAGCATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTAT
GCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAGTCTCCTCA

SEQ.I.D.NO:29

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGA
GGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATTCTACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGT
GATACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAACGATTGATCCTGCGAAT
GGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACA
CATCCACGAGCACAGCCTACATGAGGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGC
CGTGTATTACTGTGCGAGAAGCATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTAT
GCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAGTCTCCTCA

SEQ.I.D.NO:30

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGG
CCTCCATCTCCTGCAGATCTAGTCAGAACATTGTACATATTAATGGAAACACCTA
TTTAGAATGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACGGCTCTTGATCTATAAA
ATTTCCGACCGATTTTCTGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCA
CAGATTTTACATTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGACGATGTTGGAATTTATTA
CTGCTTTCAAGGTTCACATGTTCCGTGGACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAG
ATCAAG

SEQ.I.D.NO:31

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGG
CCTCCATCTCCTGCAGATCTAGTCAGAACATTGTACATATTAATGGAAACACCTA
TTTAGAATGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACGGCTCTTGATCTATAAA
ATTTCCGACCGATTTTCTGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCA
CAGATTTTACATTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGACGATGTTGGAGTTTATTA
CTGCTTTCAAGGTTCACATGTTCCGTGGACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAG
ATCAAG.

SEQ.I.D.NO:32

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGA
AGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATTCTACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGT
GCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAACGATTGATCCTGCGAAT
GGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACG
AATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGC
CGTGTATTACTGTGCGAGAAGCATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTAT
GCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCA
AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCAC
AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCG
TGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGT
CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG
CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC
AAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAG
CACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGA
CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA
ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG
CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG
GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG
GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAC
CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC
GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTC
CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA
GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG
CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

SEQ.I.D.NO:33

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGA
AGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATTCTACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGT
GATACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAACGATTGATCCTGCGAAT
GGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACG
AATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGC
CGTGTATTACTGTGCGAGAAGCATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTAT
GCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCA
AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCAC
AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCG
TGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGT
CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG
CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC
AAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAG
CACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGA
CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA
ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG
CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG
GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG
GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAC
CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC
GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTC
CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA
GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG
CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

SEQ.I.D.NO:34

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGA
AGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATTCTACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGT
GATACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAACGATTGATCCTGCGAAT
GGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACA
CATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGC
CGTGTATTACTGTGCGAGAAGCATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTAT
GCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCA
AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCAC
AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCG
TGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGT
CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG
CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC
AAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAG
CACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGA
CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA
ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG
CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG
GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG
GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAC
CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC
GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTC
CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA
GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG
CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

199

SEQ.I.D:NO:35

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGA
GGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATTCTACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGT
GATACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAACGATTGATCCTGCGAAT
GGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACA
CATCCACGAGCACAGCCTACATGAGGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGC
CGTGTATTACTGTGCGAGAAGCATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTAT
GCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCA
AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCAC
AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCG
TGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGT
CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG
CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC
AAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAG
CACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGA
CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA
ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG
CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG
GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG
GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAC
CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC
GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTC
CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA
GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG
CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

200

199

SEQ.I.D.NO:36

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGG
CCTCCATCTCCTGCAGATCTAGTCAGAACATTGTACATATTAATGGAAACACCTA
TTTAGAATGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACGGCTCTTGATCTATAAA
ATTTCCGACCGATTTTCTGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCA
CAGATTTTACATTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGACGATGTTGGAATTTATTA
CTGCTTTCAAGGTTCACATGTTCCGTGGACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAG
ATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGC
AGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAG
AGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAG
GAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCC
TGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAC
CCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

SEQ.I.D.NO:37

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGG
CCTCCATCTCCTGCAGATCTAGTCAGAACATTGTACATATTAATGGAAACACCTA
TTTAGAATGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACGGCTCTTGATCTATAAA
ATTTCCGACCGATTTTCTGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCA
CAGATTTTACATTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGACGATGTTGGAGTTTATTA
CTGCTTTCAAGGTTCACATGTTCCGTGGACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAG
ATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGC
AGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAG
AGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAG
GAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCC
TGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAC
CCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

201

SEQ.I.D.NO:38

SGSGPSTALRELIEELVNIT

SEQ.I.D.NO:39

SGSGLRELIEELVNITQNQK

SEQ.I.D.NO:40

SGSGIEELVNITQNQKAPLC

SEQ.I.D.NO:41

SGSGVNITQNQKAPLCNGSM

SEQ.I.D.NO:42

SGSGQNQKAPLCNGSMVWSI

SEQ.I.D.NO:43

SGSGAPLCNGSMVWSINLTA

SEQ.I.D.NO:44

SGSGNGSMVWSINLTAGMYC

SEQ.I.D.NO:45

SGSGVWSINLTAGMYCAALE

202

SEQ.I.D.NO:46

SGSGNLTAGMYCAALESLIN

SEQ.I.D.NO:47

SGSGGMYCAALESLINVSGC

SEQ.I.D.NO:48

SGSGAALESLINVSGCSAIE

SEQ.I.D.NO:49

SGSGSLINVSGCSAIEKTQR

SEQ.I.D.NO:50

SGSGVSGCSAIEKTQRMLSG

SEQ.I.D.NO:51

SGSGSAIEKTQRMLSGFCPH

SEQ.I.D.NO:52

SGSGKTQRMLSGFCPHKVSA

SEQ.I.D.NO:53

203

SGSGMLSGFCPHKVSAGQFS

SEQ.I.D.NO:54

SGSGFCPHKVSAGQFSSLHV

SEQ.I.D.NO:55

SGSGKVSAGQFSSLHVRDTK

SEQ.I.D.NO:56

SGSGGQFSSLHVRDTKIEVA

SEQ.I.D.NO:57

SGSGSLHVRDTKIEVAQFVK

SEQ.I.D.NO:58

SGSGRDTKIEVAQFVKDLLL

SEQ.I.D.NO:59

SGSGIEVAQFVKDLLLHLKK

SEQ.I.D.NO:60

SGSGQFVKDLLLHLKKLFRE

SEQ.I.D.NO:61

204

SGSGDLLLHLKKLFREGRFN

SEQ.I.D.NO:62

SGSGPSTALKELIEELVNIT

SEQ.I.D.NO:63

SGSGLKELIEELVNITQNQK

SEQ.I.D.NO:64

SGSGNGSMVWSINLTAGVYC

SEQ.I.D.NO:65

SGSGVWSINLTAGVYCAALE

SEQ.I.D.NO:66

SGSGNLTAGVYCAALESLIN

SEQ.I.D.NO:67

SGSGGVYCAALESLINVSGC

SEQ.I.D.NO:68

205

203

SGSGVSGCSAIEKTQRMLNG

SEQ.I.D.NO:69

SGSGSAIEKTQRMLNGFCPH

SEQ.I.D.NO:70

SGSGKTQRMLNGFCPHKVSA

SEQ.I.D.NO:71

SGSGMLNGFCPHKVSAGQFS

SEQ.I.D.NO:72

SGSGFCPHKVSAGQFSSLRV

SEQ.I.D.NO:73

SGSGKVSAGQFSSLRVRDTK

SEQ.I.D.NO:74

SGSGGQFSSLRVRDTKIEVA

SEQ.I.D.NO:75

SGSGSLRVRDTKIEVAQFVK

206

SEQ.I.D.NO:76

SGSGRDTKIEVAQFVKDLLV

SEQ.I.D.NO:77

SGSGIEVAQFVKDLLVHLKK

SEQ.I.D.NO:78

SGSGQFVKDLLVHLKKLFRE

SEQ.I.D.NO:79

SGSGDLLVHLKKLFREGQFN

SEQ.I.D.NO:80

QFVKDLLLHLKKLFRE

SEQ.I.D.NO:81

DLLLHLKKLFREGRFN

SEQ.I.D.NO:82

QFVKDLLVHLKKLFRE

SEQ.I.D.NO:83

207

DLLVHLKKLFREGQFN

SEQ.I.D.NO:84

DLLLHLKKLFRE

SEQ.I.D.NO:85

DLLVHLKKLFRE

SEQ.I.D.NO:86

GATGAAGCTTGCCACCATGAAATGCAGCTGGGTCATC

SEQ.I.D.NO:87

GATGGACTAGTGTTCCTTGACCCCAGTA

SEQ.I.D.NO:88

GATGAAGCTTGCCACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTG

SEQ.I.D.NO:89

GATGCGTACGTTTGATTTCCAGCTTGGTGCC

SEQ.I.D.NO:90

SPVPPSTALKELIEELVNITQNQKAPLCN
GSMVWSINLTAGVYCAALESLINVSGCSA
IEKTQRMLNGFCPHKVSAGQFSSLRVRDT
KIEVAQFVKDLLVHLKKLFREGQFN

208

SEQ.I.D.NO:91

AGCCCTGTGCCTCCCTCTACAGCCCTCAAGGAGCTCATTGAGGAGCTGGTCAACA
TCACCCAGAACCAGAAGGCCCCGCTCTGCAATGGCAGCATGGTGTGGAGCATCAA
CCTGACAGCTGGCGTGTACTGTGCAGCCCTGGAATCCCTGATCAACGTGTCAGGC
TGCAGTGCCATCGAGAAGACCCAGAGGATGCTGAACGGATTCTGCCCGCACAAGG
TCTCAGCTGGGCAGTTTTCCAGCTTGCGTGTCCGAGACACCAAAATCGAGGTGGC
CCAGTTTGTAAAGGACCTGCTCGTACATTTAAAGAAACTTTTTCGCGAGGGACAG
TTCAACTGA

SEQ.I.D.NO:92

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWVRQAPGQGLEWMGTIDPAN
GNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSIYDDYHYDDYY
AMDYWGQGTLVTVSSG

SEQ.I.D.NO:93

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQNIVHINGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYK
ISDRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADDVGIYYCFQGSHVPWTFGQGTKLE
IK

SEQ.I.D.NO:94

SGSGKDLLLHLKKLFREG

SEQ.I.D.NO:95

SGSGDLLLHLKKLFREG

209

SEQ.I.D.NO:96

SGSGLLLHLKKLFREG

SEQ.I.D.NO:97

SGSGLLHLKKLFREG

SEQ.I.D.NO:98

SGSGLHLKKLFREG

SEQ.I.D.NO:99

SGSGHLKKLFREG

SEQ.I.D.NO:100

SGSGLKKLFREG

SEQ.I.D.NO:101

SGSGKKLFREG

SEQ.I.D.NO:102

SGSGKLFREG

SEQ.I.D.NO:103

SGSGLFREG

210

SEQ.I.D.NO:104

SGSGFREG

SEQ.I.D.NO:105

SGSGKDLLLHLKKLFRE

SEQ.I.D.NO:106

SGSGKDLLLHLKKLFR

SEQ.I.D.NO:107

SGSGKDLLLHLKKLF

SEQ.I.D.NO:108

SGSGKDLLLHLKKL

SEQ.I.D.NO:109

SGSGKDLLLHLKK

SEQ.I.D.NO:110

SGSGKDLLLHLK

SEQ.I.D.NO:111

211

SGSGKDLLLLHL

SEQ.I.D.NO:112

SGSGKDLLLLH

SEQ.I.D.NO:113

SGSGKDLLL

SEQ.I.D.NO:114

SGSGKDLL

SEQ.I.D.NO:115

SGSGKDLLVHLKKLFREG

SEQ.I.D.NO:116

SGSGDLLVHLKKLFREG

SEQ.I.D.NO:117

SGSGLLVHLKKLFREG

SEQ.I.D.NO:118

SGSGLVHLKKLFREG

SEQ.I.D.NO:119

212

SGSGVHLKKLFREG

SEQ.I.D.NO:120

SGSGKDLLVHLKKLFRE

SEQ.I.D.NO:121

SGSGKDLLVHLKKLFR

SEQ.I.D.NO:122

SGSGKDLLVHLKKLF

SEQ.I.D.NO:123

SGSGKDLLVHLKKL

SEQ.I.D.NO:124

SGSGKDLLVHLKK

SEQ.I.D.NO:125

SGSGKDLLVHLK

SEQ.I.D.NO:126

SGSGKDLLVHL

213

SEQ.I.D.NO:127

SGSGKDLLVH

SEQ.I.D.NO:128

SGSGKDLLV

SEQ.I.D.NO:129

QFVKDLLLHLKKLFREGRFN

SEQ.I.D.NO:130

QFVKDLLLHAKKLFREGRFN

SEQ.I.D.NO:131

QFVKDLLLHLAKLFREGRFN

SEQ.I.D.NO:132

QFVKDLLLHLKALFREGRFN

SEQ.I.D.NO:133

QFVKDLLLHLKKAFREGRFN

SEQ.I.D.NO:134

QFVKDLLLHLKKLAREGRFN

214

SEQ.I.D.NO:135

QFVKDLLLHLKKLFAEGRFN

SEQ.I.D.NO:136

QFVKDLLLHLKKLFRAGRFN

INMUNOGLOBULINAS

Campo de la invención

La presente invención se refiere a inmunoglobulinas que se unen específicamente a interleuquina 13 (IL-13) y en particular a IL-13 humana (hIL-13). Más particularmente, la presente invención se refiere a anticuerpos que se unen específicamente a hIL-13. La presente invención también se refiere a procedimientos para el tratamiento de trastornos o enfermedades con dichas inmunoglobulinas, a composiciones farmacéuticas que comprenden dichas inmunoglobulinas y a procedimientos de fabricación. Otros aspectos de la presente invención serán evidentes de la descripción siguiente.

Antecedentes de la invención

Asma

El asma es una enfermedad pulmonar crónica, provocada por la inflamación de las vías respiratorias inferiores y caracterizada por problemas respiratorios recurrentes. Las vías respiratorias de los pacientes son sensibles y se dilatan o inflaman en algún grado todo el tiempo, incluso cuando no hay síntomas. La inflamación provoca el estrechamiento de las vías respiratorias y reduce el flujo de aire hacia dentro y hacia fuera de los pulmones, haciendo difícil la respiración y dando como resultado respiración sibilante, constricción en el pecho y tos. El asma se desencadena por una sensibilidad inapropiada a alérgenos (por ejemplo, ácaros del polvo, pólenes, mohos), agentes irritantes (por ejemplo, humo, gases, olores

fuertes), infecciones respiratorias, ejercicio y clima seco. Los desencadenantes irritan las vías respiratorias y el recubrimiento de las vías respiratorias se dilata para inflamarse aún más, el moco atasca las vías respiratorias y los músculos que rodean las vías respiratorias se tensan hasta que la respiración se vuelve difícil y estresante y aparecen los síntomas del asma.

Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)

EPOC es un término amplio usado para describir enfermedades del tracto respiratorio, que presentan síntomas similares al asma y se tratan con los mismos fármacos. La EPOC se caracteriza por una obstrucción crónica, progresiva y en gran parte irreversible, del flujo de aire. La contribución individual al curso de la enfermedad es desconocida, pero se piensa que fumar cigarrillos provoca el 90% de los casos. Los síntomas incluyen tos, bronquitis crónica, disnea e infecciones respiratorias. En última instancia la enfermedad conducirá a una incapacidad grave y a la muerte.

Trastornos atópicos

Trastornos atópicos se refiere a un grupo de enfermedades que son hereditarias y a menudo se producen conjuntamente, incluyendo asma, alergias tales como alergia al polen, y dermatitis atópica. La dermatitis atópica es una enfermedad crónica que afecta a la piel. En la dermatitis atópica, la piel se vuelve extremadamente irritada y se inflama, provocando rojez, dilatación, agrietamiento, supuración, formación de costras y descamación. La dermatitis atópica afecta la mayoría de las veces a bebés y a niños jóvenes, pero puede continuar en la edad adulta o aparecer por primera vez en la vida más tarde. En la mayoría de los casos, hay periodos

de tiempo en los que la enfermedad empeora, denominados agravamientos o brotes, seguidos de períodos en los que la piel mejora o se cura completamente, denominados remisiones. Muchos niños con dermatitis atópica experimentarán una remisión permanente de la enfermedad cuando se hacen mayores, aunque su piel a menudo permanezca seca y se irrite fácilmente. Los factores medioambientales pueden favorecer los síntomas de la dermatitis atópica en cualquier momento de la vida de los individuos que hayan heredado el rasgo de la enfermedad atópica. La dermatitis atópica a menudo se denomina "eccema", que es un término general para muchos tipos de dermatitis. La dermatitis atópica es el más frecuente de los numerosos tipos de eccema. Varios tienen síntomas muy similares. La forma en que la piel se ve afectada por la dermatitis atópica puede cambiar por los patrones de rascadura e infecciones de la piel resultantes. Algunas personas con la enfermedad desarrollan piel descamada y roja en la que el sistema inmunitario en la piel se vuelve muy activo. Otros desarrollan piel gruesa y curtida como resultado de una fricción y rascadura constantes. Esta afección se denomina liquenificación. Aún otros desarrollan pápulas, o pequeñas hinchazones elevadas, sobre su piel. Cuando se rascan las pápulas, se pueden abrir (excoriaciones) y volverse crujientes e infectarse.

Muchos factores o dolencias pueden hacer empeorar los síntomas de la dermatitis atópica, haciendo funcionar adicionalmente al sistema inmunitario ya sobreactivado en la piel, agravando el ciclo de picor-rascadura, e incrementando el daño a la piel. Estos factores agravantes se pueden desglosar en dos categorías principales: agentes irritantes (tales como la lana o fibras sintéticas, ropa poco adecuada o áspera, jabones y

detergentes, algunos perfumes y cosméticos, cloro, aceite mineral, algunos disolventes, polvo o arena) y alérgenos (tales como el polen, pelo de gato o perro, y alérgenos de ácaros del polvo). Los factores emocionales y algunas infecciones también pueden influir en la dermatitis atópica.

Si se produce un brote de dermatitis atópica, se pueden usar diversos procedimientos para tratar los síntomas. Los corticoesteroides en forma de cremas tópicas son el tratamiento más frecuentemente usado, aunque también se usa la administración sistémica en algunos casos graves. Algunas veces se usan preparaciones sin receta, pero en muchos casos el facultativo prescribirá un ungüento o crema de corticoesteroides más fuerte. Un ejemplo de un corticoesteroide prescrito frecuentemente es la prednisona. Los efectos secundarios del uso prolongado o repetido de corticoesteroides tópicos pueden incluir el adelgazamiento de la piel, infecciones, supresión del crecimiento (en niños), y estrías en la piel. Los antibióticos para tratar las infecciones de la piel se pueden aplicar directamente sobre la piel en un ungüento, pero habitualmente son más efectivos cuando se toman por vía oral. La fototerapia (tratamiento con luz) que usa ondas de luz ultravioleta A o B, o las dos juntas, puede ser un tratamiento eficaz para la dermatitis leve a moderada en niños más mayores (por encima de los 12 años de edad) y adultos. En adultos, los fármacos inmunosupresores, tales como la ciclosporina, también se usan para tratar casos graves de dermatitis atópica que no responden a cualquier otra forma de terapia. Los efectos secundarios de la ciclosporina pueden incluir presión sanguínea elevada, náuseas, vómitos, problemas renales, dolores de cabeza, hormigueo o atontamiento, y un posible incremento del riesgo de

cáncer e infecciones.

Debido a la consiguiente necesidad médica insatisfecha y a los efectos secundarios de las terapias existentes hay una necesidad de tratamientos alternativos para las enfermedades atópicas en general, y en particular para los tratamientos de la dermatitis atópica.

Interleuquina 13 (IL-13)

La IL-13 es una citoquina secretada de 12 kDa descrita originalmente como una citoquina derivada de las células T que inhibe la producción de citoquinas inflamatorias. Los estudios estructurales indican que tiene una disposición de cuatro hélices agrupadas sujetas por dos enlaces disulfuro. Aunque IL-13 tiene cuatro sitios de glicosilación potenciales, el análisis de IL-13 de pulmón de rata nativa ha indicado que se produce como una molécula no glicosilada. La expresión de IL-13 a partir de células COS-7 y NSO confirma esta observación (Eisenmesser y colaboradores (2001) *J. Mol. Biol.* 310 (1): 231-241, Moy F y colaboradores (2001) *J. Mol. Biol.* 310(1):219-230, Cannon-Carlson (1998) *Prot. Express. Purif.* 12(2): 239-248.

La IL-13 es una citoquina pleiotrópica producida por una variedad de tipos celulares incluyendo células Th2 activadas, mastocitos, basófilos, células dendríticas, queratinocitos y células T NK. También se puede producir por células Th0, Th1, CD8 y células T $CD45RA^+$ naif. La IL-13 tiene actividades inmunorreguladoras que se superponen parcialmente con aquellas de IL-4, esta redundancia se puede explicar por los componentes compartidos en los receptores para IL-4 y IL-13. La IL-13 se señaliza a través del receptor para IL-4 de tipo II que es un heterodímero compuesto de las cadenas IL-4Rα e IL-13Rα1. La IL-13Rα1 se une a IL-13 con baja

afinidad (Kd = 2-10 nM), pero cuando está emparejado con IL-4Rα se une con una afinidad elevada (Kd = 400 pM) y forma un receptor funcional para IL-13 (el receptor humano se denomina en el presente documento "hIL-13R") que señaliza, produciendo la activación de las vías de JAK/STAT e IRS-1/IRS-2. También se ha caracterizado una cadena adicional del receptor para IL-13 (IL-13Rα2) que se une a IL-13 con una afinidad elevada (Kd = 250 pM) pero no señaliza, en su lugar se cree que actúa como un receptor señuelo. Los receptores funcionales para IL-13 se expresan en un amplio intervalo de células incluyendo células del epitelio de las vías aéreas, músculo liso, mastocitos, eosinófilos, basófilos, células B, fibroblastos, monocitos y macrófagos. Las células T no tienen receptores funcionales para IL-13 (Hilton y colaboradores, (1996) *Jan* 9; 93(1): p497-501; Caput y colaboradores, (1996); *J. Biol. Chem* 271(28):16921-6 Hershey GK, (2003); *Clin. Immunol.* 2003 111(4):677-690).

Ambas IL-13 e IL-4 actúan para modificar las respuestas inflamatorias e inmunitarias promoviendo la inflamación asociada a la alergia y suprimiendo la inflamación debida a bacterias, virus y patógenos intracelulares. Los efectos biológicos principales de IL-13 incluyen; inducción de la proliferación de células B y regulación del isotipo cambiando a IgE; inducción del MHC II y expresión de CD23 en células B y monocitos; regulación vía arriba de VCAM-1 en células endoteliales; regulación de la producción de quimioquinas; activación de la función de mastocitos, eosinófilos y neutrófilos así como la inhibición de la expresión de genes pro-inflamatorios en poblaciones de monocitos y macrófagos. La IL-13 no tiene ningún efecto proliferativo sobre las células T. Así, a diferencia de IL-4, IL-13

nó parece ser importante en la diferenciación inicial de las células T CD4 a células del tipo Th-2, pero parece ser bastante importante en la fase efectora de la inflamación alérgica (McKenzie y colaboradores, (1993); *PNAS* 90(8):3735-9, Wynn TA, (2003), *Annu. Rev. Immunol.* (2003); 21:425-56).

IL-13 y asma

Hay evidencias sólidas de modelos animales y pacientes de que la inflamación asmática y otras patologías se producen por la respuesta de Th2 desrreguladas a aeroalérgenos y otros estímulos (Busse y colaboradores, (1995); *Am. J. Respir. Crit. care Med.* 152(1):388-93). En particular, se cree que IL-13 es la citoquina efectora principal que conduce a una variedad de respuestas celulares en el pulmón, incluyendo hiperreactividad de las vías aéreas, eosinofilia, metaplasia de las células de Globet e hipersecreción de moco.

Evidencias clínicas del papel de IL-13 en el asma

El gen que codifica para IL-13 está localizado en el cromosoma 5q31.. Esta región también contiene genes que codifican para la IL3, IL-4, IL5, IL9 y el GM-CSF, y se ha relacionado con el asma. Las variantes genéticas de IL-13 que se asocian al asma y la atopia se han encontrado tanto en el promotor como en las regiones codificantes (Vercelli D, (2002) *Curr. Opin. Aller. Clin. Immuno.* 2(5):389-393). Están disponibles los datos del estudio funcional para la variante codificante, IL-13 Q130 (denominada en el presente documento "IL-13 Q130"). El polimorfismo de un único nucleótido (SNP) +2044 G a A encontrado en el cuarto exón, produce la sustitución de una arginina por una glutamina en la posición 130 (IL-13 Q130). Nótese

también que en la ID SEC Nº: 9, esto es equivalente a la posición 110, en la que el primer residuo aminoácido 'G' al comienzo de la secuencia de aminoácidos de IL-13 humana madura es la posición 1. Se ha encontrado que esta variante está asociada al asma, niveles incrementados de IgE y dermatitis atópica en poblaciones europeas y japonesas. Se cree que IL-13 Q130 tiene una estabilidad mejorada comparada con el tipo silvestre de IL-13. También tiene una afinidad ligeramente inferior por el receptor señuelo de IL-13Rα2 y consistente con estas observaciones, se han encontrado niveles séricos medios de IL-13 superiores en pacientes homocigóticos para la variante IL-13 Q130 comparados con pacientes no homocigóticos. Estos resultados indican que IL-13 Q130 podría influir en las concentraciones local y sistémica de IL-13 (Kazuhiko y colaboradores, (2002), *J. Allergy. Clin. Immuno.* 109(6):980-987).

Se han medido niveles elevados de IL-13 en ambos asmáticos atópicos y no atópicos. En un estudio, se midieron niveles séricos medios de IL-13 de 50 pg/ml en pacientes asmáticos comparados con 8 pg/ml en pacientes control normales (Lee y colaboradores, (2001); *J. Asthma* 38(8):665-671). También se han medido niveles incrementados de IL-13 en plasma, fluido de lavado bronco-alveolar, muestras de biopsia de pulmón y esputos (Berry y colaboradores, (2004) *J. Allergy Clin. Immunol.* 114(5):1106-9; Kroegel y colaboradores, (1996); *Eur. J. Respir* 9(5):899-904; Huang y colaboradores, (1995); *J. Immunol.* 155(5):2688-94; Humbert y colaboradores, (1997); *J.Allergy Clin Immunol.* 99(5):657-65).

Evidencias *in vivo* de la implicación de IL-13 en el asma

Una serie de estudios han definido un papel efector crítico para IL-13

en la conducción a la patología en cualquiera de los dos modelos murinos crónico y agudo de asma alérgica. Se han usado receptores para IL-13 de alta afinidad (IL-13Rα2) o anticuerpos policlonales anti-IL-13 para neutralizar la bioactividad de IL-13 de ratón en estos modelos. El bloqueo de IL-13 en el momento de la exposición al alérgeno inhibe completamente la hiper-respuesta de las vías aéreas inducidas por OVA, la eosinofilia y la metaplasia de las células de Globet. En contraste, la administración de anticuerpos para IL-4 después de la sensibilización y durante la fase de exposición al alérgeno sólo reduce parcialmente el fenotipo del asma. Así, aunque ambas IL-4 e IL-13 exógenas son capaces de inducir un fenotipo similar al asma, la actividad efectora para IL-13 parece ser superior que para IL-4. Estos datos sugieren un papel principal para IL-4 en la inducción inmunitaria (particularmente para el reclutamiento y el desarrollo de las células Th2 en las vías aéreas, y en la producción de IgE), mientras que IL-13 se cree que está ligada principalmente a diversas respuestas efectoras, incluyendo la hiper-respuesta de las vías aéreas, la superproducción de moco y la inflamación celular (Wills-Karp y colaboradores, 1998; *Science*, 282(5397):2258-61; Grunig y colaboradores, 1998; *Science* 282(5397):2261-3; Taube y colaboradores, 2002; *J. Immunol.* 169:6482-89; Blease y colaboradores, 2001, *J. Immunol* 166(8):5219-24).

En experimentos complementarios, los niveles de IL-13 pulmonar han sido incrementados por sobre-expresión en ratones transgénicos o por instilación de la proteína IL-13 en la tráquea de ratones de tipo silvestre. En ambos grupos, se indujeron las características similares al asma: hiper-respuesta no específica de las vías aéreas a estimulación colinérgica,

eosinofilia pulmonar, hiperplasia de las células epiteliales, metaplasia de las células mucosas, fibrosis sub-epitelial, obstrucción de las vías aéreas y cristales de tipo Charcot-Leyden. Además, se encontró que IL-13 es un potente estimulador de las metaloproteinasas de la matriz y las protestas catepsina en el pulmón, dando como resultado cambios enfisematosos y metaplasia de la mucosa. Por tanto, IL-13 puede ser una molécula efectora importante tanto en el asma como en los fenotipos de la enfermedad EPOC (Zhu y colaboradores, 1999; *J. Clinical Investigation* 103(6):779-88, Zheng y colaboradores, 2000, *J. Clinical Investigation* 106(9):1081-93).

Estos datos indican que la actividad de IL-13 es necesaria y suficiente para producir varias de las características patológicas y clínicas principales del asma alérgica en modelos animales bien validados.

IL-13 y fibrosis pulmonar

Antecedentes de la enfermedad

La fibrosis pulmonar es una afección por la cicatrización perjudicial e inapropiada de los pulmones, que conduce a una incapacidad y a menudo a la muerte. El término engloba una variedad de dolencias diferentes con distintas etiologías, patologías y respuestas al tratamiento. En algunos casos la causa de la fibrosis está identificada. Las causas incluyen: (1) material profibrótico inhalado tal como asbesto o silicio, o polvo de metales duros (2) material orgánico inhalado al que el paciente tiene una respuesta inmunológica idiosincrásica que conduce a la fibrosis (por ejemplo, pulmón del granjero) (3) fármacos, tales como nitrofurantoína, amiodarona y metotrexato (4) en asociación con una enfermedad inflamatoria sistémica, tal como esclerosis sistémica o artritis reumatoide.

No obstante, en muchos casos la causa o circunstancia subyacente no está identificada. Se han diagnosticado muchos de tales pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (IPF). Esta es una afección relativamente rara (prevalencia 20/100.000). El diagnóstico se basa en la ausencia de una causa identificada combinada con ciertas características patológicas y radiológicas, particularmente el apanelado en el CT o en la biopsia pulmonar. La enfermedad se observa habitualmente en pacientes mayores (>50) y a menudo se sigue de un curso incesante de empeoramiento pulmonar progresivo que conduce a la muerte, con una supervivencia media estimada en 2-5 años. Además, los pacientes tienen la sensación de disnea más desagradable que progresa durante meses o años. Esto restringe inicialmente la actividad física, pero en la fase terminal -que puede durar varios meses- el paciente está sin aliento incluso durante el descanso y además es dependiente de oxígeno.

En el presente no hay tratamiento satisfactorio para esta enfermedad. Los tratamientos actuales generalmente consisten en corticoesteroides e inmunosupresores tales como azatioprina. No obstante, los corticoesteroides pueden ser ineficaces en muchos de los pacientes y sus efectos secundarios pueden empeorar la situación. Hay muchos tratamientos potenciales en investigación incluyendo el interferón gamma, que ha demostrado una tendencia a mejorar la supervivencia en un estudio importante reciente, y la perfinidona.

IL-13 y fibrosis

La mayoría de la atención sobre IL-13 se ha centrado en su papel central potencial en la patogénesis del asma, y en las estrategias para

bloquear la actividad de IL-13 como una posible estrategia de tratamiento. Además, hay evidencias de que IL-13 y la citoquinas asociadas al fenotipo Th2 están involucradas en el proceso de fibrosis durante la reparación tisular. La IL-13 y IL-4 han sido implicadas en una variedad de dolencias fibróticas. La fibrosis hepática inducida por *Schistosoma* parece ser dependiente de IL-13 y hay evidencias limitadas de que IL-13 esté implicada en la patogénesis de la esclerodermia.

En términos de fibrosis pulmonar, los estudios *in vitro* han demostrado que IL-13 promueve el fenotipo fibrogénico. Los estudios con animales han mostrado niveles de expresión elevados de IL-13 en modelos de fibrosis inducidos artificialmente, y que la fibrosis se puede reducir mediante la eliminación de IL-13. Hay datos clínicos muy limitados.

Evidencias *in vitro* de la implicación de IL-13 en la fibrosis pulmonar

La IL-13 promueve un fenotipo profibrótico. A un nivel celular, hay varios mecanismos mediante los cuales IL-13 puede promover la fibrosis. Las vías de señalización y la importancia de estos diversos mecanismos no están bien definidas.

Hay evidencias de que IL-13 actúa sobre los fibroblastos tanto para promover la producción de colágeno, como para inhibir su ruptura, favoreciendo así un fenotipo fibrótico. Los fibroblastos de la piel poseen receptores para IL-13 (= al receptor para IL-4 de tipo II) y la exposición de fibroblastos de piel cultivados a IL-13 conduce a la regulación vía arriba de la generación del colágeno. La IL-4 también tiene un efecto similar, pero más transitorio. La exposición de estas células a IL-13 promueve la secreción de una variedad de mediadores profibróticos e inflamatorios: GM-

CSF, G-CSF, integrina VCAM beta1.

La IL-13 inhibe la producción por los fibroblastos de la piel de las proteínas metaloproteinasas de la matriz 1 y 3 inducidas por IL-1α que tendería a reducir la ruptura de la matriz EC. La IL-13 actúa sinérgicamente con el TGF-β en fibroblastos humanos obtenidos por biopsia de las vías aéreas asmáticas para promover la expresión del inhibidor tisular de la metaloproteinasa 1 (TIMP-1). La ruptura de la matriz extracelular se lleva a cabo por las metaloproteinasas de la matriz, que se inhiben por la TIMP-1. Esta acción de IL-13 tendería así a reducir la degradación de la matriz.

<u>Evidencias *In vivo* de la Implicación de IL-13 en la fibrosis pulmonar</u>

La sobre-expresión de IL-13 en ratones transgénicos conduce a fibrosis sub-epitelial, hipertrofia de las células epiteliales, hiperplasia de las células de Globet, deposición de cristales (quitinasa de mamífero ácida), hiper-respuesta de las vías aéreas, fibrosis intersticial, hipertrofia de las células de tipo 2 y acumulación de tensioactivos.

Las diferentes cepas de ratones tienen diferentes susceptibilidades a la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. Los ratones C57B1/6J, que son susceptibles, presentan una rápida regulación vía arriba de IL-13, IL-13Rα e IL-4 (así como el TGF-β, TNFR-β e IL1Rs) en respuesta a la bleomicina. Los ratones BALB/c, que no son susceptibles, no presentan regulación vía arriba de IL-13, etc.

Belperio y colaboradores han estudiado la expresión del papel de IL-13, IL-4 y la quimioquina CC C10 en un modelo de fibrosis por bleomicina en ratón. Los niveles tanto de IL-13 como de IL-4 se incrementan en el tejido pulmonar en respuesta a la bleomicina. La neutralización previa de IL-13

usando anticuerpos policlonales anti-IL-13 reduce significativamente la fibrosis pulmonar en respuesta a la bleomicina como se evalúa por los niveles de hidroxiprolina pulmonar. A pesar de la expresión incrementada de IL-4 en el mismo modelo, la neutralización de IL-4 no tuvo efecto sobre la fibrosis pulmonar.

En otro modelo de fibrosis pulmonar aguda inducida por FITC en ratón BALB/c, la ausencia de IL-13 (en *knockouts*), pero no de IL-4, protegió contra la fibrosis pulmonar. No hay protección añadida de *knockout* para IL-4 en *knockouts* para IL-13. El efecto protector de la ausencia de IL-13 no se debe a la diferencia en el reclutamiento celular en el pulmón: en todos los *knockouts* y BALB/c el número de células totales reclutadas es similar, de manera que el componente inflamatorio inicial parece no estar afectado. El reclutamiento de eosinófilos es inferior en *knockouts* de IL-13 e IL-4 comparado con BALAB/c, pero ya que los IL-4 -/- no estaban protegidos contra la fibrosis esto no puede explicar la diferencia en la fibrosis. Quizá sorprendentemente, no había diferencia en los niveles de citoquinas entre los IL-13 +/+ y -/-, incluyendo para IL-10, MCP-1, interferón gamma, TGF-β. Además, se aisló el mismo número de fibroblastos de los pulmones de animales diferentes después de la FICT, pero en los ratones IL-13 -/- se redujo la producción de colágeno. Esto indica que la pérdida de IL-13 no previene simplemente la respuesta inflamatoria, sino que tiene un papel anti-fibrótico algo más específico. Se ha sugerido que IL-13 puede ejercer su efecto fibrótico a través del TGF-β. No obstante en este modelo FICT, la expresión del TGF-β no se redujo en ratones *knockout* para IL-13.

Cabría esperar que la interleuquina 4 ejerciese un efecto similar a IL-

13 ya que ambas actúan a través del mismo receptor. La IL-4 se regula significativamente vía arriba en los pulmones de los ratones con fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. No obstante, comparando la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones C57BL6/J que sobreexpresan IL-4, *knockouts* para IL-4 y el tipo silvestre, no se han encontrado evidencias de que IL-4 esté implicada en la fibrosis pulmonar. La fibrosis no se redujo en *knockouts* para IL-4, y los ratones que sobreexpresan IL-4 presentaron niveles de fibrosis incrementados.

Evidencias clínicas del papel de IL-13 en la fibrosis pulmonar

Los niveles de citoquinas BAL de IL-13 son significativamente elevados en pacientes con una variedad de formas de fibrosis pulmonar, aunque con una variabilidad considerable. La expresión de IL-13 está regulada significativamente vía arriba en los macrófagos alveolares obtenidos de pacientes con fibrosis pulmonar.

La evidencia clínica más sólida proviene de las investigaciones en la universidad de Michigan. Jakubzick y sus colegas han estudiado la expresión génica de IL-13 y IL-4 y sus receptores en biopsias pulmonares quirúrgicas de pacientes con fibrosis pulmonar. La expresión génica de IL-13 es notablemente superior en especímenes con pulmones afectados por IPF que en pulmones con otras dolencias fibróticas pulmonares o normales. Los cultivos de fibroblastos de pacientes con IPF/UIP presentan una expresión aumentada del receptor para IL-13 y IL-4, comparado con el tejido y los fibroblastos obtenidos de biopsias de pacientes con pulmones normales u otras formas de fibrosis pulmonar. En particular, los focos fibroblásticos, que presumiblemente son el epicentro de la actividad de la enfermedad, se tiñen

de manera particularmente potente para estos receptores.

Hay buenas evidencias *in vitro* de que las citoquinas de Th2 en general y IL-13 en particular promueven un fenotipo profibrótico. En al menos dos modelos animales se ha demostrado que la fibrosis inducida químicamente se puede reducir por la eliminación de IL-13 (bien con genes *knockout* o mediante anticuerpos anti-IL-13). Algunas evidencias indican que IL-13 es más importante en la promoción de la fibrosis pulmonar que IL-4. Las evidencias clínicas del papel de IL-13 en la fibrosis pulmonar sugieren que IL-13 y sus receptores no están en los pulmones de los pacientes con IPF.

La secuencia de aminoácidos para la hIL-13 se indica como ID SEC Nº: 9. (Ésta es la secuencia de la proteína madura, esto es, no está presente la secuencia señal).

Un ADNc que codifica para la hIL-13 se indica en ID SEC Nº: 10. (Ésta es la secuencia de ADN para la proteína madura, esto es, no está presente la secuencia señal).

Toda la patente y referencias a la bibliografía descritas dentro de la presente descripción se incorporan en el presente documento expresa y completamente por referencia.

Recientemente se han descrito vacunas que incrementan la respuesta inmunitaria contra IL-13 para el tratamiento del asma (documento WO 02/07071). También se ha descrito recientemente un papel para IL-13 en la sensibilización de la piel a los alérgenos medioambientales (Herrick y colaboradores, *The Journal of Immunology*, 2003, 170:2488-2495).

La presente invención proporciona, entre otros, un anticuerpo

denominado 6A1. Como se demuestra a continuación, la unión del 6A1 a la hIL-13 parece depender de la presencia de arginina en la posición 107 de la ID SEC Nº: 9. El hecho de que la arginina sea un residuo clave necesario en la posición 107 de la ID SEC Nº: 9 para la unión del 6A1 es significativo ya que Thompson J.P y Debinski W (1999) *J. Biol. Chem.*, vol. 24, No: 42 pp29944-29950 identificaron que este residuo (denominado arginina 109 en este artículo debido a una aproximación de recuento diferente a la que han usado los presentes inventores) era uno de los residuos "importantes en la inducción de señalización biológica ya que su mutación específica produce la pérdida de y/o ganancia de fenómenos funcionales" (véase resumen y descripción). Así la unión del 6A1 a la hIL-13 implica uno de los residuos claves en la hIL-13 previamente identificado que es importante en la interacción hIL-13/hIL-13R y por tanto en la señalización biológica de la vía de IL-13.

Resumen de la invención

La presente invención por tanto proporciona un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a hIL-13 y neutraliza la actividad de la hIL-13. Véase Tabla A a continuación.

El término "une específicamente" y sus variaciones gramaticales como se usan a lo largo de la presente descripción en relación a los anticuerpos y a sus fragmentos de unión al antígeno de la invención significan que el anticuerpo se une a la hIL-13 sin unirse o uniéndose insignificantemente a otras proteínas humanas y en particular a IL-4. El término, no obstante, no excluye el hecho de que los anticuerpos de la

invención también pueden tener reactividad cruzada con IL-13 de macaco.

En otro aspecto de la presente invención se proporciona un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a hIL-13 y modula (por ejemplo, inhibe o bloquea) la interacción entre hIL-13 y hIL-13R. Tal inhibición típicamente es una inhibición competitiva. En las formas de realización típicas, los anticuerpos de la invención al menos inhiben la interacción entre hIL-13 y hIL-13R y más típicamente bloquean la interacción entre hIL-13 y hIL-13R desacoplando por tanto la vía de señalización hIL-13/hIL-13R.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a hIL-13, y comprende una CDRH3 que tiene la secuencia indicada en ID SEC Nº: 3.

En otro aspecto de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a hIL-13 y comprende una CDRH3 que es una variante de la secuencia indicada en ID SEC Nº: 3 en la que uno o dos residuos dentro de dicha CDRH3 de dicha variante difiere del residuo en la posición correspondiente en ID SEC Nº: 3.

En otro aspecto de la presente invención se proporciona un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a hIL-13, y comprende las siguientes CDR:

CDRH1: ID SEC Nº: 1

CDRH2: ID SEC Nº: 2

CDRH3: ID SEC Nº: 3

CDRL1: ID SEC Nº: 4

CDRL2: ID SEC Nº: 5

CDRL3: ID SEC Nº: 6

A lo largo de esta descripción, los residuos aminoácido en las secuencias de los anticuerpos se numeran según el esquema de Kabat. De manera similar, los términos "CDR", "CDRL1", "CDRL2", "CDRL3", "CDRH1", "CDRH2", "CDRH3" siguen el sistema de numeración de Kabat indicado en Kabat y colaboradores; *Sequences of proteins of Immunological Interest* NIH, 1987. "CDRH1" se toma por ser el trozo de secuencia que incluye tanto la definición de Kabat de CDRH1 (residuos 31-35B) como también la definición de Chotia de CDRH1 (Chothia y colaboradores (1989); *Conformations of immunoglobulins hypervariable regions*; Nature 342, p877-883) que comprende Kabat 26-32. Por tanto los siguientes definen las CDR según la invención:

CDR: Residuos

CDRH1: 26-35B

CDRH2: 50-65

CDRH3: 95-102

CDRL1: 24-34

CDRL2: 50-56

CDRL3: 89-97

En otro aspecto de la presente invención se proporciona un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende un dominio VH que tiene la secuencia indicada en ID SEC Nº: 7 y un dominio VL que tiene la secuencia indicada en ID SEC Nº: 8.

En otro aspecto de la invención se proporciona un dominio VH aislado de un anticuerpo que comprende (o consiste esencialmente en) ID SEC Nº: 7 ó 11, 12, 13, 14.

En otro aspecto de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende un dominio VH seleccionado del grupo constituido por; ID SEC Nº: 7 ó 11, 12, 13, 14.

En otro aspecto de la presente invención se proporciona un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo que inhibe competitivamente la unión del anticuerpo terapéutico que comprende la CDRH3 de ID SEC Nº: 3 a la hIL-13.

En otro aspecto de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo que inhibe competitivamente la unión del anticuerpo terapéutico que comprende las CDR de ID SEC Nº: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 a la hIL-13.

En otro aspecto de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo que inhibe competitivamente la unión del anticuerpo terapéutico que comprende una cadena pesada de ID SEC Nº: 18 y una cadena ligera de ID SEC Nº: 22 a la hIL-13.

De acuerdo con la presente invención se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado que comprende un dominio VH seleccionado del grupo constituido por: ID SEC Nº: 11, 12, 13, 14 y un dominio VL seleccionado del grupo constituido por: ID SEC Nº: 15, 16.

En otro aspecto de la invención se proporciona un procedimiento para

el tratamiento de un paciente humano afectado con una enfermedad o trastorno sensible a la modulación de la interacción entre hIL-13 y hIL-13R (tal como asma, EPOC, rinitis alérgica, dermatitis atópica) cuyo procedimiento comprende las etapas de administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo como se describe en el presente documento.

También se proporciona el uso de un anticuerpo de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno sensible a la modulación de la interacción entre hIL-13 y hIL-13R.

En otro aspecto de la presente invención se proporciona un anticuerpo terapéutico que se une específicamente a IL-13 humana, cuyo anticuerpo se une específicamente a IL-13 humana entre los residuos 97 y 108 de ID SEC Nº: 9. Como es evidente para aquellos expertos en la materia en base a los resultados descritos a continuación, "entre los residuos 97 y 108 de ID SEC Nº: 9" incluye las posiciones 97 y 108.

En otro aspecto de la presente invención se proporcioha un anticuerpo terapéutico que inhibe competitivamente la unión del anticuerpo terapéutico que tiene la CDRH3 de ID SEC Nº: 3 a IL-13 humana (tal como un anticuerpo terapéutico que comprende una cadena pesada de ID SEC Nº: 18 y una cadena ligera de ID SEC Nº: 22), cuyo anticuerpo competidor se une específicamente a IL-13 humana entre los residuos 97 y 108 de ID SEC Nº: 9.

En otro aspecto de la presente invención se proporciona un anticuerpo terapéutico que se une específicamente a IL-13 humana entre los

residuos 103 y 107, inclusive, de ID SEC Nº: 9 y modula (por ejemplo, inhibe o bloquea) la interacción entre hIL-13 y hIL-13R.

En una forma de realización de la invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende una pluralidad de anticuerpos terapéuticos monoclonales (que típicamente son humanos o humanizados) que se unen específicamente a hIL-13 entre los residuos 103 y 107, de ID SEC Nº: 9 y modula (por ejemplo, inhibe o bloquea) la interacción entre hIL-13 y hIL-13R y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra forma de realización de la invención se proporciona un procedimiento para la producción de un anticuerpo terapéutico que se une específicamente a hIL-13 entre los residuos 103 y 107, de ID SEC Nº: 9 y modula (por ejemplo, inhibe o bloquea) la interacción entre hIL-13 y hIL-13R cuyo procedimiento comprende la etapa de cultivo en un medio de cultivo sin suero, una célula hospedadora recombinante que comprende un primer y un segundo vector en el que dicho primer vector comprende un polinucleótido que codifica la cadena pesada de dicho anticuerpo y dicho segundo vector comprende un polinucleótido que codifica la cadena ligera de dicho anticuerpo. Como será evidente para aquella persona experta en base a los resultados a continuación "entre 103 y 107 de ID SEC Nº: 9" incluye las posiciones 103 y 107.

En otra forma de realización de la invención se proporciona un procedimiento para la producción de un anticuerpo terapéutico que se une específicamente a hIL-13 entre los residuos 97 y 108 de ID SEC Nº: 9 y modula (por ejemplo, inhibe o bloquea) la interacción entre hIL-13 y hIL-13R cuyo procedimiento comprende la etapa de cultivo en un medio de cultivo

sin suero, una célula hospedadora recombinante que comprende un primer y un segundo vector en el que dicho primer vector comprende un polinucleótido que codifica la cadena pesada de dicho anticuerpo y dicho segundo vector comprende un polinucleótido que codifica la cadena ligera de dicho anticuerpo.

En otra forma de realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico intacto que se une a la hIL-13 y modula (por ejemplo, inhibe o bloquea) la interacción entre hIL-13 y hIL-13R cuyo anticuerpo interacciona con el residuo 107 de ID SEC Nº: 9.

En otra forma de realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico intacto que se une a la hIL-13 y modula (por ejemplo, inhibe o bloquea) la interacción entre hIL-13 y hIL-13R en la que la unión entre dicho anticuerpo terapéutico y la hIL-13 depende de la presencia de un residuo arginina en la posición 107 de ID SEC Nº: 9.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1

ELISA en sandwich que ilustra la unión de el anticuerpo monoclonal 6A1 a IL-13 humana expresada en *E. coli* recombinante a concentraciones crecientes.

Figura 2A

ELISA que ilustra la capacidad del anticuerpo monoclonal 6A1 a concentraciones crecientes para inhibir la unión de IL-13 humana expresada en *E. coli* recombinante a la cadena α1 del receptor para IL-13 humana.

Figura 2B

ELISA que ilustra la capacidad del anticuerpo monoclonal 6A1 a

concentraciones crecientes para inhibir la unión de IL-13 humana expresada en *E. coli* recombinante a la cadena α2 del receptor para IL-13 humana.

Figura 3

Experimento de neutralización que ilustra la capacidad del 6A1 a concentraciones crecientes para inhibir la bioactividad de IL-13 de macaco y humana expresada en *E. coli* recombinante en un experimento de proliferación de células TF-1.

Figura 4

Experimento de neutralización que ilustra la capacidad del 6A1 a concentraciones crecientes para inhibir la bioactividad de IL-13 humana expresada en mamífero (células CHO) en un experimento de proliferación de células TF-1.

Figura 5

Experimento de neutralización que ilustra la capacidad del 6A1 a concentraciones crecientes para inhibir la bioactividad de IL-13 Q130 humana expresada en *E. coli* recombinante en un experimento de proliferación de células TF-1.

Figura 6

ELISA en sandwich que demuestra que el 6A1 no se une a IL-4 humana expresada en *E. coli* recombinante.

Figura 7

Un experimento de neutralización de IL-5, que demuestra que el 6A1 no inhibe la bioactividad de IL-5 humana expresada en *E. coli* recombinante en un experimento de proliferación de células TF-1.

Figura 8

ELISA en sandwich que ilustra la unión de Acm 6A1 quimérico a IL-13 de macaco y a IL-13 humana expresada en *E. coli* recombinante a concentraciones crecientes.

Figura 9

ELISA en sandwich que ilustra la unión de 8 Acsm anti-IL-13 humana humanizados a IL-13 humana expresada en *E. coli* recombinante a concentraciones crecientes.

Figura 10a

ELISA en sandwich que ilustra la unión de 6A1 quimérico, L1+A1 y L2+A1 a IL-13 humana expresada en *E. coli* recombinante a concentraciones crecientes.

Figura 10b

ELISA en sandwich que ilustra la unión de 6A1 quimérico, L1+A1 y L2+A1 a IL-13 de macaco expresada en *E. coli* recombinante a concentraciones crecientes.

Figura 11

ELISA en sandwich que ilustra la unión de 6A1 quimérico, L1+A1 y L2+A1 a IL-13 humana nativa a concentraciones crecientes.

Figura 12a

ELISA que ilustra la capacidad del anticuerpo monoclonal 6A1, 6A1 quimérico, L1+A1 y L2+A1 a concentraciones crecientes para inhibir la unión de IL-13 humana expresada en *E. coli* recombinante a la cadena α1 del receptor para IL-13 humana.

Figura 12b

ELISA que ilustra la capacidad del anticuerpo monoclonal 6A1, 6A1

quimérico, L1+A1 y L2+A1 a concentraciones crecientes para inhibir la unión de IL-13 humana expresada en *E. coli* recombinante a la cadena α2 del receptor para IL-13 humana.

Figura 13a

Experimento de neutralización que ilustra la capacidad del 6A1, 6A1 quimérico, L1+A1 y L2+A1 a concentraciones crecientes para inhibir la bioactividad de IL-13 humana expresada en *E. coli* recombinante en un experimento de proliferación de células TF-1.

Figura 13b

Experimento de neutralización que ilustra la capacidad del 6A1, 6A1 quimérico, L1+A1 y L2+A1 a concentraciones crecientes para inhibir la bioactividad de IL-13 de macaco expresada en *E. coli* recombinante en un experimento de proliferación de células TF-1.

Figura 13c

Experimento de neutralización que ilustra la capacidad del 6A1, 6A1 quimérico, L1+A1 y L2+A1 a concentraciones crecientes para inhibir la bioactividad de IL-13 Q130 humana expresada en *E. coli* recombinante en un experimento de proliferación de células TF-1.

Figura 13d

Experimento de neutralización que ilustra la capacidad del 6A1, 6A1 quimérico, L1+A1 y L2+A1 a concentraciones crecientes para inhibir la bioactividad de IL-13 humana expresada el mamífero (células CHO) en un experimento de proliferación de células TF-1.

Figura 14a

ELISA en sandwich que demuestra que 6A1, 6A1 quimérico, L1+A1 y

L2+A1 no se unen a IL-4 humana expresada en *E. coli* recombinante.

Figura 14b

ELISA en sandwich que demuestra que el 6A1, 6A1 quimérico, L1+A1 y L2+A1 no se unen al GM-CSF humano expresado en *E. coli* recombinante.

Figure 14c

Un experimento de neutralización de IL-5, que demuestra que el 6A1, 6A1 quimérico, L1+A1 y L2+A1 no inhiben la bioactividad de IL-5 humana expresada en *E. coli* recombinante en un experimento de proliferación de células TF-1.

Figura 15

Un ELISA del mapeo de epítopos para determinar el epítopo de unión para el 6A1 sobre IL-13 de macaco y humana.

Figura 16a

Un ELISA del mapeo de epítopos para identificar la especificidad de unión precisa del 6A1 sobre IL-13 humana.

Figura 16b

Un ELISA del mapeo de epítopos para identificar la especificidad de unión precisa del 6A1 sobre IL-13 de macaco.

Figura 17a

Un ELISA del mapeo de epítopos para determinar los residuos aminoácido claves necesarios para la unión del 6A1 sobre IL-13 humana.

Figura 17b

Un ELISA del mapeo de epítopos para determinar los residuos aminoácidos claves necesarios para la unión del L1+A1 sobre IL-13 humana.

Descripción detallada de la invención

1. Estructura de los anticuerpos

1.1 Anticuerpos intactos

Los anticuerpos intactos habitualmente son glicoproteínas heteromultiméricas que comprenden al menos dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Aparte de las IgM, los anticuerpos intactos habitualmente son glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150 kDa, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Normalmente, cada cadena ligera se une a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente mientras que el número de uniones disulfuro entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas varía. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de una serie de regiones constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (VL) y una región constante en su otro extremo; la región constante de la cadena ligera está alineada con la primera región constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Las cadenas ligeras de los anticuerpos de la mayoría de las especies de vertebrados se pueden asignar a uno de los dos tipos denominados Kappa y Lambda en relación a la secuencia de aminoácidos de la región constante. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos humanos se pueden asignar a cinco clases diferentes, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. IgG e IgA se pueden subdividir adicionalmente en subclases, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; e IgA1 e IgA2.

Existen variantes de especie en ratón y en rata que tienen al menos IgG2a, IgG2b. El dominio variable del anticuerpo confiere especificidad de unión al anticuerpo con ciertas regiones que presentan una variabilidad particular denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Las porciones más conservadas de la región variable se denominan regiones marco (FR). Los dominios variables de cada una de las cadenas ligera y pesada comprenden cuatro FR unidas por tres CDR. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en proximidad cercana mediante las regiones FR y con las CDR de la otra cadena contribuyendo a la formación del sitio de unión de los anticuerpos al antígeno. Las regiones constantes no están directamente involucradas en la unión del anticuerpo al antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras tales como la participación de la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), fagocitosis a través de la unión al receptor Fcγ, semi-vida/velocidad de aclaramiento a través del receptor Fc neonatal (FcRn) y citotoxicidad dependiente del complemento a través del componente C1q de la cascada del complemento.

En una forma de realización por tanto proporcionamos un anticuerpo terapéutico intacto que se une específicamente a hIL-13, cuyo anticuerpo modula (por ejemplo, inhibe o bloquea) la interacción entre hIL-13 y hIL-13R. El anticuerpo terapéutico intacto puede comprender una región constante de cualquier isotipo o sus subclases descritas anteriormente. En una forma de realización, el anticuerpo es del isotipo IgG, particularmente IgG1. El anticuerpo puede ser de rata, ratón, conejo, primate o humano. En una forma de realización típica, el anticuerpo es de primate (tal como macaco,

mono del viejo mundo o gran simio, véase por ejemplo los documentos WO 99/55369, WO 93/02108) o humano.

En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico intacto aislado que comprende una CDRH3 de ID SEC Nº: 3. En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico intacto que comprende una región variable que tiene CDR de ID SEC Nº: 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

En otra forma de realización, se proporciona un anticuerpo terapéutico intacto murino aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende un dominio VH que tiene la secuencia de ID SEC Nº: 7 y un dominio VL de la secuencia de ID SEC Nº: 8.

1.1.2 Anticuerpos humanos

Los anticuerpos humanos se pueden producir por una serie de procedimientos conocidos por aquellos expertos en la materia. Los anticuerpos humanos se pueden preparar por el procedimiento de hibridoma usando líneas celulares de mieloma humano o de heteromieloma ratón-humano véase Kozbor *J. Immunol* 133, 3001, (1984) y Brodeur, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp51-63 (Marcel Dekker Inc, 1987). Los procedimientos alternativos incluyen el uso de librerías de fagos o ratones transgénicos, de los cuales ambos utilizan repertorios de la región V humana (véase Winter G, (1994), *Annu. Rev. Immunol* 12, 433-455, Green LL (1999), *J. Immunol. Methods* 231, 11-23).

Ahora hay disponibles varias cepas de ratones transgénicos en las que sus *loci* para la inmunoglobulina de ratón han sido reemplazados con segmentos génicos de inmunoglobulina humana (véase Tomizuka K, (2000)

PNAS 97,722-727; Fishwild D.M (1996) *Nature Biotechnol.* 14,845-851, Mendez MJ, 1997, *Nature Genetics*, 15,146-156). Tras la exposición al antígeno tales ratones son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos a partir del cual se pueden seleccionar los anticuerpos de interés. De nota particular es el sistema Trimera™ (véase Eren R. y colaboradores, (1998) *Immunology* 93:154-161) en el que linfocitos humanos se trasplantan a ratones irradiados, el Selected Lymphocyte Antibody System (SLAM, véase Babcook y colaboradores, *PNAS* (1996) 93:7843-7848) en el que linfocitos humanos (o de otras especies) se pasan eficazmente por un procedimiento de generación de anticuerpos *in vitro* de reserva masiva seguido por un procedimiento de desconvulado, dilución limitante y selección y el Xenomouse II™ (Abgenix Inc). Una aproximación alternativa está disponible en Morphotek Inc usando la tecnología Morphodoma™.

Se puede usar la tecnología de exposición en fagos para producir anticuerpos humanos (y sus fragmentos), véase McCafferty; *Nature*, 348, 552-553 (1990) y Griffiths AD y colaboradores (1994) *EMBO* 13: 3245-3260. Según esta técnica los genes del dominio V del anticuerpo se clonan en los marcos de cualquiera de los dos genes de las proteínas de la cubierta mayores o menores de un bacteriófago tal como M13 o fd y se exponen (habitualmente con la ayuda de un fago ayudante) como fragmentos de anticuerpos funcionales en la superficie de la partícula fágica. Las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo producen la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta aquellas propiedades. La técnica de exposición en fagos se puede usar para seleccionar anticuerpos específicos para antígenos de librerías hechas a

partir de células B humanas tomadas de individuos afectados con una enfermedad o trastorno descrito anteriormente o alternativamente de donantes humanos no inmunizados (véase Marks; *J. Mol. Bio.* 222,581-597, 1991). Cuando se desea un anticuerpo humano intacto que comprenda un dominio Fc es necesario reclonar el fragmento derivado de la exposición al fago en vectores de expresión en mamíferos que comprendan las regiones constantes deseadas y establecer líneas celulares de expresión estables.

La técnica de maduración de afinidad (Marks; *Biotechnol* 10, 779-783 (1992)) se puede usar para mejorar la afinidad de la unión en la que la afinidad del anticuerpo humano primario se mejora sustituyendo secuencialmente las regiones V de las cadenas H y L con variantes de origen natural y seleccionando en relación a las afinidades de unión mejoradas. Ahora también están disponibles variantes de esta técnica tales como "impronta de epítopos", véase el documento WO 93/06213. Véase también Waterhouse; *Nucl. Acids Res* 21, 2265-2266 (1993).

Así, en otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico intacto humano aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a hIL-13 y modula (por ejemplo, inhibe o bloquea) la interacción entre hIL-13 y hIL-13R.

En otro aspecto se proporciona un anticuerpo terapéutico intacto humano aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende una CDRH3 de ID SEC Nº: 3 que se une específicamente a hIL-13 y modula (por ejemplo, inhibe o bloquea) la interacción entre hIL-13 y hIL-13R. En otro aspecto se proporciona un anticuerpo terapéutico intacto humano aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende una región

variable que tiene CDR de ID SEC Nº: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 como se ha definido anteriormente.

1.2 Anticuerpos humanizados y quiméricos

El uso de anticuerpos no humanos intactos en el tratamiento de enfermedades o trastornos humanos conlleva los problemas de inmunogenocidad ahora bien establecidos, esto es, el sistema inmunitario del paciente puede reconocer el anticuerpo intacto no humano como no propio y generar una respuesta de neutralización. Esto es particularmente evidente tras la administración múltiple del anticuerpo no humano a un paciente humano. Se han desarrollado varias técnicas a lo largo de los años para superar estos problemas y generalmente implican la reducción de las secuencias de aminoácidos no humanas en la composición del anticuerpo intacto mientras se conserva la relativa facilidad de la obtención de anticuerpos no humanos a partir de animales inmunizados, por ejemplo, ratón, rata o conejo. Para conseguir esto en líneas generales se han utilizado dos aproximaciones. La primera es con anticuerpos quiméricos, que generalmente comprende un dominio variable no humano (por ejemplo, de roedor tal como ratón) fusionado a una región constante humana. Debido a que el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo está localizado dentro de las regiones variables, el anticuerpo quimérico conserva su afinidad de unión por el antígeno pero adquiere las funciones efectoras de la región constante humana y por tanto son capaces de realizar funciones efectoras tales como las que se han descrito anteriormente. Los anticuerpos quiméricos típicamente se producen usando procedimientos con ADN recombinante. El ADN que codifica los anticuerpos (por ejemplo, ADNc) se aísla y se

secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas H y L del anticuerpo de la invención, por ejemplo ADNc que codifica ID SEC Nº 1, 2, 3, 4, 5 y 6 descrito anteriormente). Las células de hibridoma sirven como una fuente típica de tal ADN. Una vez aislado, el ADN se pone en vectores de expresión que a continuación se transfecta en células hospedadoras tales como *E. coli*, células COS, células CHO o células de mieloma que de otra manera no producirían la proteína inmunoglobulina para obtener la síntesis del anticuerpo. El ADN se puede modificar sustituyendo la secuencia codificante para las cadenas L y H humanas por las regiones constantes H y L no humanas (por ejemplo murino) correspondientes, véase por ejemplo, Morrison; *PNAS* 81, 6851 (1984).

La segunda aproximación implica la generación de anticuerpos humanizados en los que el contenido no humano del anticuerpo se reduce humanizando las regiones variables. Han adquirido popularidad dos técnicas de humanización. La primera es la humanización por injerto de CDR. Las CDR hacen bucles cerca del N-término del anticuerpo donde forman una superficie montada en un andamiaje proporcionado por las regiones marco. La especificidad de unión del anticuerpo al antígeno está definida principalmente por la topografía y por las características químicas de la superficie de sus CDR. Estas características en cambio están determinadas por la conformación de las CDR individuales, por la disposición relativa de las CDR, y por naturaleza y la disposición de las cadenas laterales de los residuos que comprenden las CDR. Se puede conseguir una gran

disminución en la inmunogenocidad injertando solamente las CDR de anticuerpos no humanos (por ejemplo murino) (anticuerpos "donadores" en el marco humano ("marco aceptor") y las regiones constantes (véase Jones y colaboradores (1986) *Nature* 321,522-525 y Verhoeyen M y colaboradores (1988) *Science* 239, 1534-1536). No obstante, el injerto de CDR *per se* puede no resultar en la retención completa de las propiedades de unión al antígeno y frecuentemente se encuentra que algunos residuos del marco (algunas veces denominadas "retromutaciones") del anticuerpo donador necesitan ser preservados en la molécula humanizada si se debe recuperar una afinidad de unión al antígeno importante (véase Queen C y colaboradores (1989) *PNAS* 86, 10,029-10,033, Co, M y colaboradores (1991) *Nature* 351, 501-502). En este caso, se eligen las regiones V humanas que presentan la mayor homología de secuencia al anticuerpo donador no humano de una base de datos para proporcionar el marco humano (FR). La selección de FRs humanas puede ser de cualquiera de los dos anticuerpos humanos individuales o consenso humanos. Cuando sea necesario los residuos clave del anticuerpo donador se sustituyen en el marco aceptor humano para preservar las conformaciones de las CDR. Se puede usar modelización del anticuerpo por ordenador para ayudar a identificar tales residuos estructuralmente importantes, véase el documento WO 99/48523.

Alternativamente, la humanización se puede consiguir mediante un procedimiento de "chapeado". Un análisis estadístico de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulinas murinas y humanas únicas reveló que los patrones precisos de residuos expuestos son

diferentes en anticuerpos murinos y humanos, y la mayoría de las posiciones superficiales individuales tienen una enorme preferencia por un pequeño número de residuos diferentes (véase Padlan E.A. y colaboradores; (1991) *Mol. Immunol.* 28, 489-498 y Pedersen J.T. y colaboradores (1994) J. *Mol. Biol.* 235; 959-973). Por tanto es posible reducir la inmunogenocidad de una Fv no humana reemplazando los residuos expuestos en sus regiones marco que difieren de aquellos encontrados habitualmente en anticuerpos humanos. Debido a que la antigenicidad de la proteína se puede correlacionar con la accesibilidad superficial, la sustitución de los residuos superficiales puede ser suficiente para producir una región variable de ratón "invisible" para el sistema inmunitario humano (véase también Mark G.E. y colaboradores (1994) en *Handbook of Experimental Pharmacology vol.113: The pharmacology of monoclonal Antibodies*, Springer-Verlag, pp105-134). Este procedimiento de humanización se denomina "chapeado" debido a que solamente se altera la superficie del anticuerpo, los residuos de soporte permanecen inalterados.

Así otra forma de realización de la invención proporciona un anticuerpo terapéutico quimérico que comprende un dominio variable no humano (por ejemplo, de roedor) fusionado a una región constante humana (que puede ser de un isotipo IgG, por ejemplo, IgG1) que se une específicamente a hIL-13 y modula (por ejemplo, inhibe o bloquea) la interacción entre hIL-13 y hIL-13R.

En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico quimérico que comprende una región variable no humana (por ejemplo, de roedor) y una región constante humana (que puede ser de un isotipo IgG,

por ejemplo, IgG1) que se une específicamente a hIL-13, cuyo anticuerpo comprende adicionalmente una CDRH3 de ID SEC Nº: 3. Tales anticuerpos pueden comprender adicionalmente una región constante humana del isotipo IgG, por ejemplo, IgG1.

En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico quimérico que comprende una región variable no humana (por ejemplo, de roedor) y una región constante humana (que puede ser de un isotipo IgG, por ejemplo, IgG1) que se une específicamente a hIL-13 que tiene las CDR de ID SEC Nº: 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico quimérico que comprende un dominio VH de ID SEC Nº: 7 y un dominio VL de ID SEC Nº: 8 y una región constante humana de un isotipo IgG, por ejemplo, IgG1 que se une específicamente a hIL-13 y modula (por ejemplo, inhibe o bloquea) la interacción entre hIL-13 y hIL-13R.

En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a hIL-13 y modula (por ejemplo, inhibe o bloquea) la interacción entre hIL-13 y hIL-13R.

En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a hIL-13 y comprende una CDRH3 de ID SEC Nº: 3. Tales anticuerpos pueden comprender una región constante humana del isotipo IgG, por ejemplo, IgG1.

En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une

específicamente a hIL-13 y comprende CDR de ID SEC Nº: 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Tales anticuerpos pueden comprender una región constante humana del isotipo IgG, por ejemplo, IgG1.

De acuerdo con la presente invención se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado cuyo anticuerpo comprende un dominio VH seleccionado del grupo constituido por: ID SEC Nº: 11, 12, 13, 14 y un dominio VL seleccionado del grupo constituido por ID SEC Nº: 15, 16. Tales anticuerpos pueden comprender una región constante humana del isotipo IgG, por ejemplo, IgG1.

En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado cuyo anticuerpo comprende un dominio VH de ID SEC Nº: 11 y un dominio VL de ID SEC Nº: 15.

En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado cuyo anticuerpo comprende un dominio VH de ID SEC Nº: 12 y un dominio VL de ID SEC Nº: 15.

En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado cuyo anticuerpo comprende un dominio VH de ID SEC Nº: 13 y un dominio VL de ID SEC Nº: 15.

En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado cuyo anticuerpo comprende un dominio VH de ID SEC Nº: 14 y un dominio VL de ID SEC Nº: 15.

En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado cuyo anticuerpo comprende un dominio VH de ID SEC Nº: 11 y un dominio VL de ID SEC Nº: 16.

En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico

humanizado cuyo anticuerpo comprende un dominio VH de ID SEC Nº: 12 y un dominio VL de ID SEC Nº: 16.

En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado cuyo anticuerpo comprende un dominio VH de ID SEC Nº: 13 y un dominio VL de ID SEC Nº: 16.

En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado cuyo anticuerpo comprende un dominio VH de ID SEC Nº: 14 y un dominio VL de ID SEC Nº: 16.

En otra forma de realización de la presente invención se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a hIL-13 en la que dicho anticuerpo o fragmento del mismo comprende una CDRH3 (ID SEC Nº: 3) que además comprende opcionalmente CDR de ID SEC Nº: 1, 2, 4, 5 y 6 en los que los residuos seleccionados del grupo constituido por 19, 38, 73 y 81 de la región marco de la cadena pesada aceptora humana y el residuo de la posición 85 del marco de la cadena ligera aceptora humana se sustituyen por los residuos correspondientes encontrados en el marco del anticuerpo donador de los cuales se deriva la CDRH3.

Será evidente para aquellos expertos en la materia que el término "deriva" está previsto que defina no sólo la fuente en el sentido de ser el origen *físico* del material sino también que defina el material que es estructuralmente idéntico al material, pero que no se origina a partir de la fuente de referencia. Así "residuos encontrados en el anticuerpo donador de los cuales se deriva la CDRH3" no necesariamente necesitan haber sido purificados del anticuerpo donador.

En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a hIL-13 en la que dicho anticuerpo o fragmento del mismo comprende la CDRH3 de ID SEC Nº: 3 que además comprende opcionalmente las CDR de ID SEC Nº: 1, 2, 4, 5 y 6 en los que el marco de la cadena pesada humana comprende uno o más (por ejemplo, todos) de los siguientes residuos (o uno de sus sustitutos conservativos):

Posición	Residuo
38	I
19	R
73	T
81	R

y la cadena ligera humana comprende

Posición	Residuo
85	I

Es muy admitido en la técnica que ciertas sustituciones de aminoácidos están consideradas como "conservativas". Los aminoácidos se dividen en dos grupos en relación a las propiedades comunes de las cadenas laterales y las sustituciones dentro de grupos que mantienen toda o sustancialmente toda la afinidad de unión del anticuerpo de la invención o de su fragmento de unión al antígeno se consideran sustituciones conservativas, véase la tabla siguiente:

Cadena lateral	Miembros
Hidrófoba	met, ala, val, leu, ile
Hidrófila neutra	cys, ser, thr
Ácida	asp, glu
Básica	asn, gln, his, lys, arg
Residuos que influyen en la orientación de la cadena	gly, pro
Aromáticos	trp, tyr, phe

De acuerdo con la presente invención se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado que comprende una cadena pesada seleccionada

del grupo constituido por: ID SEC Nº: 18, 19, 20, 21 y una cadena ligera seleccionada del grupo constituido por: ID SEC Nº: 22, 23.

En una forma de realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado que se une específicamente a hIL-13 que comprende una cadena pesada de ID SEC Nº: 18 y una cadena ligera de ID SEC Nº: 22.

En una forma de realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado que se une específicamente a hIL-13 que comprende una cadena pesada de ID SEC Nº: 19 y una cadena ligera de ID SEC Nº: 22.

En una forma de realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado que se une específicamente a hIL-13 que comprende una cadena pesada de ID SEC Nº: 20 y una cadena ligera de ID SEC Nº: 22.

En una forma de realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado que se une específicamente a hIL-13 que comprende una cadena pesada de ID SEC Nº: 21 y una cadena ligera de ID SEC Nº: 22.

En una forma de realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado que se une específicamente a hIL-13 que comprende una cadena pesada de ID SEC Nº: 18 y una cadena ligera de ID SEC Nº: 23.

En una forma de realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado que se une específicamente a hIL-13 que comprende una cadena pesada de ID SEC Nº: 19 y una cadena ligera

de ID SEC Nº: 23.

En una forma de realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado que se une específicamente a hIL-13 que comprende una cadena pesada de ID SEC Nº: 20 y una cadena ligera de ID SEC Nº: 23.

En una forma de realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado que se une específicamente a hIL-13 que comprende una cadena pesada de ID SEC Nº: 21 y una cadena ligera de ID SEC Nº: 23.

1.3 Anticuerpos biespecíficos

Un anticuerpo biespecífico es un anticuerpo que tiene especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes. Los procedimientos de preparación de dichos anticuerpos son conocidos en la materia. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares cadena H-cadena L de la inmunoglobulina, en la que las dos cadenas H tienen diferentes especificidades de unión, véase Millstein y colaboradores, *Nature* 305 537-539 (1983), el documento WO 93/08829 y Traunecker y colaboradores, *EMBO*, 10, 1991, 3655-3659. Debido al repertorio aleatorio de cadenas H y L, se produce una mezcla potencial de 10 estructuras de anticuerpos diferentes de las cuales solamente una tiene la especificidad de unión deseada. Una aproximación alternativa implica la fusión de los dominios variables con las especificidades de unión deseadas a la región constante de la cadena pesada que comprende al menos parte de la región bisagra, las regiones CH2 y CH3. Se prefiere tener presente la región CH1 que

contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera en al menos una de las fusiones. El ADN que codifica estas fusiones, y si se desea la cadena L, se inserta en vectores de expresión separados y a continuación se cotransfectan en un organismo hospedador adecuado. Es posible sin embargo insertar las secuencias codificantes para dos o para las tres cadenas en un vector de expresión. En una aproximación preferida, el anticuerpo biespecífico está compuesto de una cadena H con una primera especificidad de unión en un brazo y un par de cadena H-L, proporcionando una segunda especificidad de unión en el otro brazo, véase el documento WO 94/04690. Véase también Suresh y colaboradores, *Methods in Enzymology* 121, 210, 1986.

En una forma de realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico biespecífico en la que al menos una especificidad de unión de dicho anticuerpo es para la hIL-13, en la que dicho anticuerpo modula (por ejemplo, inhibe o bloquea) la interacción entre hIL-13 y hIL-13R. Tales anticuerpos pueden comprender adicionalmente una región constante humana del isotipo IgG, por ejemplo, IgG1.

En una forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico biespecífico en la que al menos una especificidad de unión de dicho anticuerpo es para la hIL-13, en la que dicho anticuerpo comprende una CDRH3 de ID SEC Nº: 3. Tales anticuerpos pueden comprender una región constante humana del isotipo IgG, por ejemplo, IgG1.

En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico biespecífico en la que al menos una especificidad de unión de dicho anticuerpo es para la hIL-13, en la que dicho anticuerpo comprende CDR de

ID SEC Nº: 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Tales anticuerpos pueden comprender una región constante humana del isotipo IgG, por ejemplo, IgG1.

1.4 Fragmentos de anticuerpos

En ciertas formas de realización de la invención se proporcionan fragmentos de anticuerpo terapéuticos que modulan la interacción entre hIL-13 y hIL-13R. Tales fragmentos pueden ser fragmentos de unión al antígeno funcionales de anticuerpos intactos y/o humanizados y/o quiméricos tales como fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, ScFv de los anticuerpos descritos anteriormente. Tradicionalmente tales fragmentos se producen mediante la digestión proteolítica de anticuerpos intactos mediante, por ejemplo, digestión con papaina (véase por ejemplo, el documento WO 94/29348) pero se pueden producir directamente a partir de células hospedadoras transformadas recombinantemente. Para la producción de ScFv, véase Bird. y colaboradores; (1988) *Science*, 242, 423-426. Además, los fragmentos de anticuerpo se pueden producir usando una variedad de técnicas de ingeniería genética como se describe a continuación.

Los fragmentos Fv parecen tener una energía interacción de sus dos cadenas inferior que los fragmentos Fab. Para establecer la asociación de los dominios VH y VL, se han unido con péptidos (Bird y colaboradores, (1988) *Science* 242, 423-426, Huston y colaboradores, *PNAS*, 85, 5879-5883), puentes disulfuro (Glockshuber y colaboradores, (1990) *Biochemistry*, 29, 1362-1367) y mutaciones por "inserción en el hueco" (Zhu y colaboradores (1997), *Protein Sci.*, 6, 781-788). Los fragmentos ScFv se pueden producir mediante procedimientos muy conocidos por aquellos expertos en la materia, véase Whitlow y colaboradores (1991) *Methods*

companion Methods Enzymol, 2, 97-105 y Huston y colaboradores (1993) *Int. Rev. Immunol* 10, 195-217. Los ScFv se pueden producir en células bacterianas tales como *E. coli* pero se producen más preferentemente en células eucariotas. Una desventaja de los SvFc es la monovalencia del producto, que impide una avidez incrementada debido a la unión polivalente, y a su corta semi-vida. Los intentos para superar estos problemas incluyen $(ScFv')_2$ bivalentes producidos a partir de ScFv que contienen una cisteína C-terminal adicional por acoplamiento químico (Adams y colaboradores (1993) *Can. Res* 53, 4026-4034 y McCartney y colaboradores (1995) *Protein Eng.* 8, 301-314) o por dimerización específica de sitio espontánea de ScFv que contiene un residuo cisteína C-terminal desapareado (véase Kipriyanov y colaboradores (1995) *Cell. Biophys* 26, 187-204). Alternativamente, se puede forzar a los ScFvI a formar multímeros acortando el conector peptídico de 3 a 12 residuos para formar "dianticuerpos", véase Holliger y colaboradores *PNAS* (1993), 90, 6444-6448. La reducción del conector aún puede dar como resultado trímeros de ScFv (trianticuerpos, véase Kortt y colaboradores (1997) *Protein Eng*, 10, 423-433) y tetrámeros (tetranticuerpos, véase Le Gall y colaboradores (1999) *FEBS Lett*, 453, 164-168). La construcción de moléculas de ScFv bivalentes también se puede conseguir por fusión genética con motivos de dimerización de proteínas para formar rninicuerpos (véase Pack y colaboradores (1992) *Biochemistry* 31, 1579-1584) y minicuerpos (véase Hu y colaboradores (1996), *Cancer Res.* 56, 3055-3061). También se pueden producir tándems de ScFv-Sc-Fv ((ScFV)2) uniendo dos unidades ScFv mediante un tercer conector peptídico, véase Kurucz y colaboradores (1995) *J. Immol.* 154, 4576-4582.

Los dianticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante la asociación no covalente de dos productos de fusión de cadenas individuales que consisten en el dominio VH de un anticuerpo conectado por un conector corto al dominio VL de otro anticuerpo, véase Kipriyanov y colaboradores (1998), *Int. J. Can* 77,763-772. La estabilidad de tales dianticuerpos biespecíficos se puede aumentar mediante la introducción de puentes disulfuro o mutaciones por "inserción en el hueco" como se ha descrito anteriormente y mediante la formación de dianticuerpos de cadena simple (ScDb) en la que dos fragmentos de ScFv híbridos se conectan a través de un conector peptídico, véase Kontermann y colaboradores (1999) *J. Immunol. Methods* 226 179-188. Las moléculas biespecíficas tetravalentes están disponibles, por ejemplo, fusionando un fragmento ScFv al dominio CH3 de una molécula IgG o a un fragmento Fab a través de la región bisagra, véase Coloma y colaboradores (1997) *Nature Biotechnol.* 15, 159-163. Alternativamente, se han creado moléculas biespecíficas tetravalentes mediante la fusión de dianticuerpos biespecíficos de cadena simple (véase Alt y colaboradores, (1999) *FEBS Lett* 454, 90-94). También se pueden formar moléculas biespecíficas tetravalentes más pequeñas mediante la dimerización de cualquiera de los dos tándems ScFv-ScFv con un conector que contiene un motivo hélice-giro-hélice (minianticuerpos DiBi, véase Muller y colaboradores (1998) *FEBS Lett* 432, 45-49) o una molécula de cadena simple que comprende cuatro dominios variables del anticuerpo (VH y VL) en una orientación que previene el apareamiento intramolecular (dianticuerpo en tándem, véase Kipriyanov y colaboradores, (1999) *J. Mol. Biol.* 293, 41-56). Los fragmentos $F(ab')_2$ biespecíficos se pueden crear por

acoplamiento químico de fragmentos Fab' o por heterodimerización a través de las cremalleras de leucina (véase Shalaby y colaboradores, (1992) *J. Exp. Med.* 175, 217-225 y Kostelny y colaboradores (1992), *J. Immunol.* 148, 1547-1553). También están disponibles dominios VH y VL aislados (Domantis plc), véase los documentos US 6.248.516; US 6.291.158; US 6.172.197.

En una forma de realización se proporciona un fragmento de anticuerpo terapéutico (por ejemplo ScFv, Fab, Fab', $F(ab')_2$) o un fragmento de anticuerpo por ingeniería genética como se ha descrito anteriormente que se une específicamente a hIL-13 y modula (por ejemplo, inhibe o bloquea) la interacción entre hIL-13 y hIL-13R. El fragmento de anticuerpo terapéutico típicamente comprende una CDRH3 que tiene la secuencia de ID SEC Nº: 3 opcionalmente junto con las CDR que tienen la secuencia indicada en ID SEC Nº: 1, 2, 4, 5 y 6.

1.5 Anticuerpos heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados también forman una forma de realización de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente formados usando cualquier procedimiento de entrecruzamiento conveniente. Véase el documento US 4.676.980.

1.6 Otras modificaciones

La interacción entre la región Fc de un anticuerpo y varios receptores de la Fc (FcγR) se cree que media las funciones efectoras del anticuerpo que incluyen citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), fijación del complemento, fagocitosis y semi-vida/aclaramiento del

anticuerpo. Se pueden llevar a cabo varias modificaciones de la región Fc de los anticuerpos de la invención dependiendo de la propiedad deseada. Por ejemplo, las mutaciones específicas en la región Fc para dar sino un anticuerpo lítico, no lítico se detallan en los documentos EP 0629 240B1 y EP 0307 434B2 o uno puede incorporar un epítopo de unión al receptor de reciclaje en el anticuerpo para incrementar su semi-vida en suero, véase el documento US 5,739,277. Actualmente hay cinco receptores Fcγ humanos reconocidos, FcγR (I), FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa y FcRn neonatal. Shields y colaboradores, (2001) *J. Biol. Chem* 276, 6591-6604 han demostrado que un grupo de residuos de la IgG1 frecuente está involucrado en la unión de todos los FcγRs, aunque FcγRII y FcγRIII utilizan sitios distintos fuera de este grupo frecuente. Un grupo de residuos de la IgG1 reduce la unión a todos los FcγRs cuando se alteran a alanina: Pro-238, Asp-265, Asp-270, Asn-297 y Pro-239. Todos están en el dominio CH2 de la IgG y agrupados cerca de la unión en bisagra CH1 y CH2. Aunque el FcγRI utilizar sólo el grupo de residuos de la IgG1 frecuente para la unión, FcγRII y FcγRIII interaccionan con distintos residuos además del grupo frecuente. La alteración de algunos residuos sólo reduce la unión a FcγRII (por ejemplo, Arg-292) o FcγRIII (por ejemplo, Glu-293). Algunas variantes presentan una unión mejorada a FcγRII o FcγRIII pero no afectan a la unión al otro receptor (por ejemplo, Ser-267Ala mejora la unión a FcγRII pero la unión a FcγRIII no está afectada). Otras variantes presentan una unión mejorada a FcγRII o FcγRIII con la reducción en la unión al otro receptor (por ejemplo, Ser-298Ala mejora la unión a FcγRIII y reduce la unión a FcγRII). Para FcγRIIIa, las mejores variantes para la unión de la IgG1 han combinado sustituciones de la

alanina en la Ser-298, Glu-333 y Lys-334. El receptor FcRn neonatal se cree que está involucrado tanto en el aclaramiento del anticuerpo como en la transcitosis a través de los tejidos (véase Junghans R.P (1997) *Immunol. Res* 16. 29-57 y Ghetie y colaboradores (2000) *Annu. Rev. Immunol.* 18, 739-766). Los residuos de IgG1 humana determinados a interaccionar directamente con el FcRn humano incluyen Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 e His435. Los cambios en cualquiera de estas posiciones descritos en esta sección pueden permitir el incremento de la semi-vida en suero y/o alterar las propiedades efectoras de los anticuerpos de la invención.

Otras modificaciones incluyen variantes de glicosilación de los anticuerpos de la invención. La glicosilación de anticuerpos en posiciones conservadas en sus regiones constantes es conocida por tener un efecto profundo sobre la función del anticuerpo, particularmente el funcionamiento efector tal como aquellos descritos anteriormente, véase por ejemplo, Boyd y colaboradores (1996), *Mol. Immunol.* 32, 1311-1318. Están contempladas las variantes de glicosilación de los anticuerpos terapéuticos o sus fragmentos de unión al antígeno de la presente invención en las que se añade, se sustituye, se elimina o se modifica una o más fracciones hidrocarbonadas. La introducción de un motivo asparragina-X-serina o asparragina-X-treonina crea un sitio potencial para la unión enzimática de fracciones hidrocarbonadas y por tanto se puede usar para manipular la glicosilación de un anticuerpo. En Raju y colaboradores (2001) *Biochemistry* 40, 8868-8876 se incrementa la sialilación terminal de una inmunoadhesina TNFR-IgG mediante un procedimiento de regalactosilación y/o resialilación

usando beta-1,4-galactosiltransferasa y/o alfa-2,3-sialiltransferasa. El incremento de la sialilación terminal se cree que incrementa la semi-vida de la inmunoglobulina. Los anticuerpos, en común con la mayoría de las proteínas, típicamente se producen como una mezcla de glicoformas. Esta mezcla es particularmente evidente cuando los anticuerpos se producen en células eucariotas, particularmente en células de mamífero. Se han desarrollado una variedad de procedimientos para fabricar glicoformas definidas, véase Zhang y colaboradores, *Science* (2004), 303, 371, Sears y colaboradores, *Science*, (2001) 291, 2344, Wacker y colaboradores (2002) *Science*, 298 1790, Davis y colaboradores (2002) *Chem. Rev.* 102, 579, Hang y colaboradores (2001) *Acc. Chem. Res* 34, 727. Así, la invención contempla una pluralidad de anticuerpos (monoclonales) terapéuticos (que pueden ser del isotipo IgG, por ejemplo, IgG1) como se ha descrito anteriormente que comprende un número definido (por ejemplo 7 o menos, por ejemplo 5 o menos tal como dos o una única) de glicoforma(s) de dichos anticuerpos o sus fragmentos de unión al antígeno.

Las formas de realización adicionales de la invención incluyen anticuerpos terapéuticos de la invención o sus fragmentos de unión al antígeno acoplados a un polímero no proteínico tal como polietilenglicol (PEG), polipropilen glicol o polioxialquileno. La conjugación de proteínas al PEG es una técnica establecida para incrementar la semi-vida de las proteínas, así como para reducir la antigenicidad e inmunogenocidad de las proteínas. Se ha investigado el uso de la polietilenglicolilación con diferentes pesos moleculares y formas (lineal o ramificado) con anticuerpos intactos así como con fragmentos Fab', véase Koumenis I.L. y colaboradores (2000) *Int.*

J. Pharmaceut. 198:83-95.

2. Anticuerpos competidores

La presente invención también contempla anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos que se unen específicamente a hIL-13 y que inhiben competitivamente la unión del anticuerpo terapéutico de la invención o de su fragmento de unión al antígeno que comprende una CDRH3 de ID SEC Nº: 3 a la hIL-13 y/o un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende CDR de ID SEC Nº: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 a la hIL-13. En algunas formas de realización, el anticuerpo terapéutico es el anticuerpo murino que comprende un dominio VL de ID SEC Nº: 7 y un dominio VL de ID SEC Nº: 8. Tales anticuerpos competidores se unen al mismo epítopo, se superponen o se unen al epítopo espacialmente adyacente a la hIL-13 de manera que se unen por el anticuerpo terapéutico que comprenden las CDR de ID SEC Nº: 1, 2, 3, 4, 5 y 6. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo competidores presentan, a concentraciones equimolares, al menos una inhibición del 25%, típicamente del 35% o superior, más típicamente una inhibición de al menos el 50%.

Así, en una forma de realización de la invención se proporciòna un procedimiento de examen de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo candidato para determinar si el anticuerpo o fragmento de anticuerpo candidato es un anticuerpo competidor como se ha descrito en el presente documento cuyo procedimiento comprende las etapas de:

(a) incubación del anticuerpo o fragmento de anticuerpo candidato con un anticuerpo terapéutico que comprende una CDRH3 de ID SEC Nº: 3, que además comprende adicionalmente las CDR de ID SEC Nº: 1, 2, 4, 5 y

6 (tal como un anticuerpo terapéutico murino que tiene un dominio VH de ID SEC Nº: 7 y un dominio VL de ID SEC Nº: 8 o un anticuerpo terapéutico humanizado que tiene una cadena pesada de ID SEC Nº: 18 y una cadena ligera de ID SEC Nº: 22 o un anticuerpo terapéutico humanizado que tiene una cadena pesada de ID SEC Nº: 19 y una cadena ligera de ID SEC Nº: 23) o fragmento de unión al antígeno del mismo;

(b) determinar si el anticuerpo o fragmento del mismo de anticuerpo candidato de la etapa (a) inhibe competitivamente la unión del anticuerpo terapéutico o de su fragmento de unión al antígeno a la hIL-13.

También se proporciona un anticuerpo competidor o fragmento de unión al antígeno del mismo que inhibe competitivamente la unión del anticuerpo terapéutico o de su fragmento de unión al antígeno cuyo anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende la CDR que tiene las secuencias indicadas en ID SEC Nº: 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo competidor o fragmento de unión al antígeno del mismo que inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo terapéutico de la invención a la hIL-13 cuyo anticuerpo terapéutico comprende una cadena pesada de ID SEC Nº: 18 y una cadena ligera de ID SEC Nº: 22.

Un anticuerpo competidor o fragmento de unión al antígeno del mismo pueden ser de cualquiera de las estructuras de anticuerpo anteriores. Por ejemplo, el anticuerpo competidor puede ser un anticuerpo intacto humano o de primate o un anticuerpo humanizado preferentemente de un isotipo IgG, por ejemplo IgG1 o IgG4. Los fragmentos de anticuerpo

competidor pueden ser Fab, Fab', $F(ab')_2$, ScFv y similares. Se puede producir un anticuerpo competidor según los procedimientos descritos dentro de la presente descripción.

3. Procedimientos de producción

Los anticuerpos de la invención se pueden producir como una población policlonal, pero se producen más preferentemente como una población monoclonal (esto es como una población sustancialmente homogénea de anticuerpos idénticos dirigidos contra un sitio de unión antigénico específico). Por supuesto será evidente para aquellos expertos en la materia que una población implica más de una entidad de anticuerpo. Los anticuerpos de la presente invención se pueden producir en organismos transgénicos tales como cabras (véase Pollock y colaboradores (1999), *J. Immunol. Methods* 231:147-157), pollos (véase Morrow KJJ (2000) *Genet. Eng. News* 20:1-55, ratones (véase Pollock y colaboradores) o plantas (véase Doran PM, (2000) *Curr. Opinion Biotechnol.* 11, 199-204, Ma JK-C (1998), *Nat. Med.* 4; 601-606, Baez J y colaboradores, *BioPharm* (2000) 13: 50-54, Stoger E y colaboradores; (2000) *Plant Mol. Biol.* 42:583-590). Los anticuerpos también se pueden producir mediante síntesis química. No obstante, los anticuerpos de la invención típicamente se producen usando tecnología de cultivos celulares recombinantes muy conocida por aquellos expertos en la materia. Se aísla un polinucleótido que codifica el anticuerpo y se inserta en un vector replicable tal como un plásmido para una clonación adicional (amplificación) o expresión. Un sistema de expresión útil es un sistema glutamato sintetasa (tal como el vendido por Lonza Biologics), particularmente cuando la célula hospedadora es CHO o NS0 (véase a

continuación). El polinucleótido que codifica el anticuerpo se aísla fácilmente y se secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, sondas de oligonucleótidos). Los vectores que se pueden usar incluyen plásmidos, virus, fagos, transposones, minicromosomas de los cuales los plásmidos son una forma de realización típica. Generalmente tales vectores además incluyen una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y secuencias de terminación de la transcripción unidas de manera operable al polinucleótido de las cadenas pesada y/o ligera para así facilitar la expresión. El polinucleótido que codifica las cadenas pesada y ligera se puede insertar en vectores separados y ser transfectado en la misma célula hospedadora o, si se desea tanto la cadena pesada como la cadena ligera se pueden insertar en el mismo vector para transfección en la célula hospedadora. Así, según un aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento para la construcción de un vector que codifica las cadenas pesada y/o ligera de un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención, cuyo procedimiento comprende la inserción en un vector de un polinucleótido que codifica cualquiera de las dos de la cadena ligera y/o cadena pesada de un anticuerpo terapéutico de la invención.

En otro aspecto de la invención se proporciona un polinucleótido que codifica un dominio VH murino que tiene la secuencia indicada como: ID SEC Nº: 24.

En otro aspecto de la invención se proporciona un polinucleótido que codifica un dominio VL murino que tiene la secuencia indicada como: ID SEC Nº: 25.

En otro aspecto de la invención se proporciona un polinucleótido que codifica un dominio VH que tiene la secuencia seleccionada del grupo constituido por: ID SEC Nº: 26, 27, 28, 29.

En otro aspecto de la invención se proporciona un polinucleótido que codifica un dominio VL que tiene la secuencia seleccionada del grupo constituido por: ID SEC Nº: 30, 31.

De acuerdo con la presente invención se proporciona un polinucleótido que codifica una cadena pesada de la invención cuyo polinucleótido se selecciona del grupo constituido por: ID SEC Nº: 32, 33, 34, 35.

De acuerdo con la presente invención se proporciona un polinucleótido que codifica una cadena ligera de la invención cuyo polinucleótido se selecciona del grupo constituido por: ID SEC Nº: 36, 37.

Inmediatamente será evidente para aquellos expertos en la materia que debido a la redundancia del código genético, también están disponibles polinucleótidos alternativos a aquellos descritos en este documento que codificarán los polinucleótidos de la invención.

3.1 Secuencias señal

Los anticuerpos de la presente invención se pueden producir como una proteína de fusión con una secuencia seña heteróloga que tiene un sitio de ruptura específico en el N-término de la proteína madura. La secuencia señal debería ser reconocida y procesada por la célula hospedadora. Para células hospedadoras procariotas, la secuencia señal puede ser una fosfatasa alcalina, penicilinasa, o secuencias conductoras de enterotoxina II estable al calor. Para la secreción de levaduras las secuencias señal pueden

ser una secuencia conductora de invertasa de levaduras, secuencia conductora del factor α o secuencias conductoras de fosfatasa ácida, véase por ejemplo el documento WO 90/13646. En sistemas celulares de mamíferos, están disponibles secuencias conductoras secretoras víricas tales como la señal gD del herpes simplex y una secuencia señal de inmunoglobulina nativa. Típicamente la secuencia señal está ligada al marco de lectura del ADN que codifica el anticuerpo de la invención.

3.2 Origen de replicación

Los orígenes de replicación son muy conocidos en la técnica, con el pBR322 adecuado para la mayoría de bacterias gram-negativa, el plásmido 2μ para la mayoría de las levaduras y varios orígenes víricos tales como SV40, polioma, adenovirus VSV o BPV para la mayoría de células de mamífero. Generalmente el componente origen de replicación no es necesario para los vectores de expresión en mamíferos pero se puede usar el SV40 ya que contiene el promotor temprano.

3.3 Marcador seleccionable

Los genes seleccionables codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina o (b) complementan deficiencias auxiotróficas o suministran nutrientes no disponibles en el medio complejo. El esquema de selección puede implicar la detención del crecimiento de la célula hospedadora. Las células, que se han transformado con éxito con los genes que codifican el anticuerpo terapéutico de la presente invención, sobreviven debido a, por ejemplo, la resistencia a los fármacos conferida por el marcador seleccionable. Otro ejemplo es el denominado marcador

seleccionable DHFR en el que los transformantes se cultivan en presencia de metotrexato. En formas de realización típica, las células se cultivan en presencia de cantidades crecientes de metotrexato para amplificar el número de copias del gen exógeno de interés. Las células CHO son una línea celular particularmente útil para la selección DHFR. Un ejemplo adicional es el sistema de expresión glutamato sintetasa (Lonza Biologics). Un gen seleccionable adecuado para su uso en levaduras es el gen trp1, véase Stinchcomb y colaboradores, *Nature* 282, 38, 1979.

3.4 Promotores

Los promotores adecuados para la expresión de los anticuerpos de la invención están unidos de manera operable al ADN/polinucleótido que codifica el anticuerpo. Los promotores para células procariotas incluyen el promotor phoA, los sistemas promotores lactosa y beta-lactamasa, fosfatasa alcalina, triptófano y promotores híbridos tal como Tac. Los promotores adecuados para la expresión en células de levadura incluyen 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, por ejemplo, enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa y glucoquinasa. Los promotores de levaduras inducibles incluyen alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, metalotioneína y enzimas responsables del metabolismo del nitrógeno o de la utilización de maltosa/galactosa.

Los promotores para la expresión en sistemas celulares de mamíferos incluyen promotores víricos tales como promotores de polioma, de la viruela aviar y adenovirus (por ejemplo, adenovirus 2), virus del

papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus (en particular el promotor del gen temprano inmediato), retrovirus, virus de la hepatitis B, actina, virus del sarcoma de Rous (RSV) y el virus simio 40 temprano o tardío. Por supuesto la elección del promotor está basada en la compatibilidad adecuada con la célula hospedadora usada para la expresión. En una forma de realización por tanto se proporciona un primer plásmido que comprende un promotor de RSV y/o SV40 y/o CMV, el ADN que codifica la región V de la cadena ligera (VL) de la invención, la región κC junto con marcadores seleccionables de resistencia a neomicina y ampicilina y un segundo plásmido que comprende un promotor de RSV o SV40, ADN que codifica para la región V de la cadena pesada (VH) de la invención, ADNc que codifica la región constante γ1, DHFR y marcadores de resistencia a ampicilina.

3.5 Elemento potenciador

Cuando sea apropiado, por ejemplo, para la expresión en procariotas superiores, se puede usar un elemento potenciador unido de manera operable al elemento promotor en un vector. Secuencias potenciadas de mamífero adecuadas incluyen elementos potenciadores de globina, elastasa, albúmina, fetoproteína e insulina. Alternativamente, se puede usar un elemento potenciador de un virus de células eucariotas tal como el potenciador de SV40 (en los pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma, el potenciador baculovírico o el locus IgG2a murino (véase el documento WO 04/009823). El potenciador preferentemente está localizado en el vector en una posición aguas arriba al promotor.

3.6 Células hospedadoras

Las células hospedadoras adecuadas para los vectores de expresión o clonación que codifican los anticuerpos de la invención son células procariotas, levaduras o eucariotas superiores. Las células procariotas adecuadas incluyen eubacterias, por ejemplo, enterobacteriaceae tales como *Escherichia* por ejemplo *E. coli* (por ejemplo ATCC 31.446; 31.537; 27.325), *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella* por ejemplo *Salmonella typhimurium*, *Serratia* por ejemplo *Serratia marcescans* y *Shigella* así como Bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (véase DD 266 710), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. De las células hospedadoras de levaduras, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* (por ejemplo ATCC 16.045; 12.424; 24.178; 56.500), *Yarrowia* (EP 402.226), *Pichia Pastoris* (EP 183.070, véase también Peng y colaboradores, *J. Biotechnol.* 108 (2004) 185-192), también están contemplados hospedadores *Candida*, *Trichoderma reesia* (EP 244.234), *Penicillin*, *Tolypocladium* y *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Aunque las células hospedadoras procariotas y de levaduras están contempladas específicamente por la invención, no obstante preferentemente, las células hospedadoras de la presente invención son células eucariotas superiores. Las células hospedadoras eucariotas superiores adecuadas incluyen células de mamíferos tales como COS-1 (ATCC nº CRL 1650), COS-7 (ATCC CRL 1651), línea de riñón embrionario humano 293, células de riñón de hámster neonato (BHK) (ATCC CRL.1632), BHK570 (ATCC NO: CRL 10314), 293 (ATCC nº CRL 1573), células CHO

de ovario de hámster chino (por ejemplo CHO-K1, ATCC NO: CCL 61, línea celular DHFR-CHO tal como DG44 (véase Urlaub y colaboradores, (1986) *Somatic Cell Mol. Genet.* 12, 555-556)), particularmente aquellas líneas celulares CHO adaptadas para los cultivos en suspensión, células de Sertoli de ratón, células de riñón de mono, células de riñón de mono verde africano (ATCC CRL-1587), células HELA, células de riñón de perro (ATCC CCL 34), células pulmonares humanas (ATCC CCL 75), Hep G2 y mieloma o células de linfoma, por ejemplo, NSO (véase el documento US 5.807.715), Sp2/0, Y0.

Así en una forma de realización de la invención se proporciona una célula hospedadora transformada establemente que comprende un vector que codifica una cadena pesada y/o una cadena ligera del anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo como se ha descrito anteriormente. Preferentemente tales células hospedadoras comprenden un primer vector que codifica la cadena ligera y un segundo vector que codifica dicha cadena pesada.

Fermentación bacteriana

Los sistemas bacterianos son particularmente adecuados para la expresión de fragmentos de anticuerpo. Tales fragmentos están localizados intracelularmente o dentro del periplasma. Las proteínas periplasmáticas insolubles se pueden extraer y replegarse para formar proteínas activas según los procedimientos conocidos por aquellos expertos en la materia, véase Sanchez y colaboradores (1999) *J. Biotechnol.* 72, 13-20 y Cupit PM y colaboradores (1999) *Lett Appl Microbiol*, 29, 273-277.

3.7 Procedimientos de cultivos celulares

Las células hospedadoras transformadas con vectores que codifican los anticuerpos terapéuticos de la invención o sus fragmentos de unión al antígeno se pueden cultivar mediante cualquier procedimiento conocido por aquellos expertos en la materia. Las células hospedadoras se pueden cultivar en matraces agitados, frascos de rodillo o sistemas de fibra hueca, pero se prefiere para la producción a gran escala el uso de reactores de tanque agitado, particularmente para cultivos en suspensión. Preferentemente los tanques agitados se adaptan para la aireación usando, por ejemplo, aspersores, deflectores o impeledores de baja cizalladura. Para las columnas de burbujeo y los reactores de aerotransporte se puede usar aireación directa con burbujas de aire u oxígeno. Cuando las células hospedadoras se cultivan en un medio de cultivo sin suero se prefiere que el medio esté suplementado con un agente protector celular tal como pluronic F-68 para ayudar a prevenir el daño celular como resultado del proceso de aireación. Dependiendo de las características de la célula hospedadora, se puede usar cualquiera de los dos microvehículos como sustratos de crecimiento para líneas celulares dependientes del anclaje o las células se pueden adaptar al cultivo en suspensión (que es típico). El cultivo de células hospedadoras, particularmente células hospedadoras de invertebrados puede utilizar una variedad de modos de operación tal como alimentación discontinua, procesamiento en discontinuo repetido (véase Drapeau y colaboradores (1994) *Cytotechnology* 15: 103-109), proceso en discontinuo extendido o cultivo por perfusión. Aunque las células hospedadoras de mamífero trasformadas recombinantemente se pueden cultivar en medios que contienen suero tal como suero fetal bovino (FCS), se prefiere que tales

células hospedadoras se cultiven en medios sintéticos exentos de suero tal como los descritos en Keen y colaboradores (1995) *Cytotechnology* 17:153-163, o medios disponibles comercialmente tales como ProCHO-CDM o UltraCHO™ (Cambrex NJ, USA), suplementados cuando sea necesario con una fuente energética tal como glucosa y factores de crecimiento sintéticos tales como insulina. El cultivo de células hospedadoras sin suero puede requerir que aquellas células se adapten al crecimiento en las condiciones sin suero. Una aproximación de adaptación es cultivar tales células hospedadoras en medio que contiene suero e intercambiar repetidamente el 80% del medio de cultivo por medio sin suero de manera que las células hospedadoras aprendan a adaptarse a las condiciones sin suero (véase por ejemplo, Scharfenberg K y colaboradores (1995) en *Animal Cell technology: Developments towards the 21st century* (Beuvery E.C. y colaboradores eds), pp 619-623, Kluwer Academic publishers).

Los anticuerpos de la invención secretados al medio se pueden recuperar y purificar usando una variedad de técnicas para dar un grado de purificación adecuado para el uso pretendido. Por ejemplo el uso de los anticuerpos terapéuticos de la invención para el tratamiento de pacientes humanos típicamente exige una pureza de al menos el 95%, más típicamente del 98% o el 99% o una pureza superior (comparado con el medio de cultivo en bruto). En el primer caso, típicamente los restos celulares se eliminan del medio de cultivo usando centrifugación seguida de una etapa de clarificación del sobrenadante usando, por ejemplo, microfiltración, ultrafiltración y/o filtración de profundidad. Están disponibles una variedad de otras técnicas tales como diálisis y electroforesis en gel y

técnicas cromatográficas tales como hidroxiapatita (HA), cromatografía de afinidad (que opcionalmente implica un sistema de marcaje de afinidad tal como polihistidina) y/o cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, véase el documento US 5.429.746). En una forma de realización, los anticuerpos de la invención, después de varias etapas de clarificación, se capturan usando cromatografía de afinidad con proteína A o G seguida de etapas cromatográficas adicionales tales como intercambio iónico y/o cromatografía HA, intercambio catiónico o aniónico, cromatografía de exclusión molecular y precipitación con sulfato de amonio. Típicamente, también se emplean varias etapas de eliminación de virus (por ejemplo, nanofiltración usando por ejemplo un filtro DV-20). Después de estas diversas etapas, se proporciona una preparación purificada (preferentemente monoclonal) que comprende al menos 75 mg/ml o superior, por ejemplo, 100 mg/ml o superior del anticuerpo de la invención o fragmento de unión al antígeno del mismo y por tanto forma una forma de realización de la invención.

4. Composiciones farmacéuticas

Las preparaciones purificadas de los anticuerpos de la invención (particularmente las preparaciones monoclonales) como se ha descrito anteriormente, se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de trastornos y enfermedades humanas tales como enfermedades atópicas, por ejemplo, asma, rinitis alérgica, EPOC. Típicamente tales composiciones comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable según lo conocido y denominado por práctica farmacéutica aceptable, véase por ejemplo Remingtons Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, (1980), Mack Publishing Co. Los ejemplos de tales

vehículos incluyen vehículos esterilizados tales como solución salina, solución de Ringer o solución de dextrosa, tamponados con tampones adecuados a un pH dentro de un intervalo de 5 a 8. Las composiciones farmacéuticas para inyección (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intramuscular o intraportal) o para infusión continua están convenientemente exentas de materia particulada visible y pueden comprender entre 0,1 ng y 100 mg de anticuerpo, preferentemente entre 5 mg y 25 mg de anticuerpo. Los procedimientos para la preparación de tales composiciones farmacéuticas son muy conocidos por aquellos expertos en la materia. En una forma de realización, las composiciones farmacéuticas comprenden entre 0,1 ng y 100 mg de los anticuerpos terapéuticos de la invención en formas de dosificación unitarias, opcionalmente junto con las instrucciones para su uso. Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden liofilizar (secado en congelación) para su reconstitución antes de la administración según los procedimientos muy conocidos o evidentes para aquellos expertos en la materia. Cuando las formas de realización de la invención comprenden los anticuerpos de la invención con un isotipo IgG1, se puede añadir a la composición farmacéutica un quelante de cobre tal como citrato (por ejemplo, citrato sódico) o EDTA o histidina para reducir el grado de degradación de los anticuerpos de este isotipo mediada por cobre, véase el documento EP 0612251. El tratamiento anti-hIL-13 se puede administrar oralmente, por inhalación, tópicamente (por ejemplo, intraocular, intranasal, rectal, en heridas en la piel).

Las dosis efectivas y los regímenes de tratamiento para la

administración del anticuerpo de la invención generalmente se determinan empíricamente y dependen de factores tales como la edad, el peso y el estado de salud del paciente y la enfermedad o trastorno a tratar. Tales factores están dentro del ámbito del facultativo que atiende. Se puede encontrar consejo para la selección de las dosis apropiadas en por ejemplo, Smith y colaboradores (1977) *Antibodies in human diagnosis and therapy*, Raven Press, Nueva York, pero en general estarán entre 1 mg y 1000 mg.

Dependiendo de la enfermedad o trastorno a tratar (pero particularmente el asma), las composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la invención se pueden usar simultánea, separada o secuencialmente con una cantidad eficaz de otro medicamento tal como agentes antiinflamatorios (por ejemplo, corticoesteroides o un NSAID), agentes anticolinérgicos (particularmente antagonistas del receptor M1/M2/M3), agonistas del adrenorreceptor β_2, agentes. anti-infecciosos (por ejemplo antibióticos, antivíricos), antihistamínicos, inhibidor de la PDE4. Los ejemplos de agonistas del adrenorreceptor β_2 incluyen salmeterol, salbutamol, formoterol, salmefamol, fenoterol, terbutalina. Los agonistas del adrenorreceptor β_2 de duración prolongada preferidos incluyen aquellos descritos en los documentos WO 02/66422A, WO 02/270490, WO 02/076933, WO 03/024439 y WO 03/072539. Los corticoesteroides adecuados incluyen metil prednisolona, prednisolona, dexametasona, propionato de fluticasona, éster *S*-fluorometílico del ácido 6α,9α-difluoro-17α-[(2-furanilcarbonil)oxi]-11β-hidroxi-16α-metil-3-oxo-androsta-1,4-dien-17β-carbotioico, éster *S*-(2-oxo-tetrahidro-furan-3S-il) del ácido 6α,9α-difluoro-11β-hidroxi-16α-metil-3-oxo-

17α-propioniloxi-androsta-1,4-dien-17β-carbotioico, ésteres de beclometasona (por ejemplo el éster 17-propionato o el éster 17,21-dipropionato), budesonida, flunisolida, ésteres de mometasona (por ejemplo el éster furoato), acetonuro de triamcinolona, rofleponida, ciclesonida (16α,17-[[(*R*)-ciclohexilmetilen]bis(oxi)]-11β,21-dihidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona), propionato de butixocort, RPR-106541, y ST-126. Los corticoesteroides preferidos incluyen el propionato de fluticasona, éster *S*-fluorometílico del ácido 6α,9α-difluoro-11β-hidroxi-16α-metil-17α-[(4-metil-1,3-tiazol-5-carbonil)oxi]-3-oxo-androsta-1,4-dien-17β-carbotioico y el éster *S*-fluorometílico del ácido 6α,9α-difluoro-17α-[(2-furanilcarbonil)oxi]-11β-hidroxi-16α-metil-3-oxo-androsta-1,4-dien-17β-carbotioico, más preferentemente el éster *S*-fluorometílico del ácido 6α,9α-difluoro-17α-[(2-furanilcarbonil)oxi]-11β-hidroxi-16α-metil-3-oxo-androsta-1,4-dien-17β-carbotioico.

Los compuestos no esteroideos que tienen agonismo glucocorticoide que pueden poseer selectividad para la trans-represión sobre la trans-activación y que pueden ser útiles en terapia de combinación incluyen aquellos cubiertos en las siguientes patentes: WO 03/082827, WO 01/10143, WO 98/54159, WO 04/005229, WO 04/009016, WO 04/009017, WO 04/018429, WO 03/104195, WO 03/082787, WO 03/082280, WO 03/059899, WO 03/101932, WO 02/02565, WO 01/16128, WO 00/66590, WO 03/086294, WO 04/026248, WO 03/061651, WO 03/08277.

Los agentes antiinflamatorios adecuados incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID).

Los NSAID adecuados incluyen cromoglicato sódico, nedocromil

sódico, inhibidores de la fosfodiesterasa (PDE) (por ejemplo, teofilina, inhibidores de la PDE4 o inhibidores de la PDE3/PDE4 mixtos), antagonistas de leucotrienos, inhibidores de la síntesis de leucotrienos, antagonistas de la integrina β-2 y antagonistas o agonistas del receptor de la adenosina (por ejemplo agonistas de la adenosina 2a), agonistas de citoquinas (por ejemplo, antagonistas de quimioquinas, tales como un antagonista de CCR3) o inhibidores de la síntesis de citoquinas, o inhibidores de la 5-lipoxigenasa. Otros agonistas del adrenorreceptor β_2 adecuados incluyen salmeterol (por ejemplo como el xinafoato), salbutamol (por ejemplo como el sulfato o la base libre), formoterol (por ejemplo como el fumarato), fenoterol o terbutalina y sus sales. Un inhibidor de la iNOS (inhibidor de la óxido nítrico sintasa inducible) preferentemente es para la administración por vía oral. Los inhibidores de la iNOS adecuados incluyen aquellos descritos en los documentos WO 93/13055, WO 98/30537, WO 02/50021, WO 95/34534 y WO 99/62875. Los inhibidores de CCR3 adecuados incluyen aquellos descritos en el documento WO 02/26722.

De particular interés es el uso de los anticuerpos de la invención en combinación con un inhibidor de la fosfodiesterasa 4 (PDE4). El inhibidor específico de la PDE4 útil en este aspecto de la invención puede ser cualquier compuesto que sea conocido por inhibir la enzima PDE4 o que se descubra que actúa como un inhibidor de la PDE4, y que solamente son inhibidores de la PDE4, no compuestos que inhiban otros miembros de la familia PDE, tal como la PDE3 y la PDE5, así como la PDE4.

Los compuestos de interés incluyen ácido *cis*-4-ciano-4-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil)ciclohexan-1-carboxílico, 2-carbometoxi-4-ciano-

4-(3-ciclopropilmetoxi-4-difluorometoxifenil)ciclohexan-1-ona y *cis*-[4-ciano-4-(3-ciclopropilmetoxi-4-difluorometoxifenil)ciclohexan-1-ol]. También, ácido *cis*-4-ciano-4-[3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil]ciclohexan-1-carboxílico (también conocido como cilomilast) y sus sales, ésteres, profármacos o formas físicas, que se describen en la patente de EE.UU. 5.552.438 expedida el 3 de septiembre de 1996; esta patente y los compuestos que describen se incorporan por completo en el presente documento por referencia.

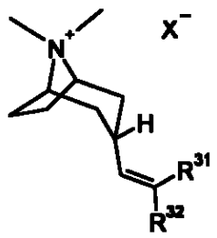
AWD-12-281 de Elbion (Hofgen, N. y colaboradores. 15ª *EFMC Int Symp Med Chem* (Sept 6-10, Edinburgh) 1998, Abst P.98; referencia CAS nº 247584020-9); un derivado de la 9-benciladenina denominado NCS-613 (INSERM); D-4418 de Chiroscience and Schering-Plough; un inhibidor de la PDE4 benzodiacepina identificado como CI-1018 (PD-168787) y atribuido a Pfizer; un derivado del benzodioxol descrito por Kyowa Hakko en el documento WO 99/16766; K-34 de Kyowa Hakko; V-11294A de Napp (Landells, L.J. y colaboradores, *Eur Resp J* [Annu Cong Eur Resp Soc (Sept 19-23, Génova) 1998] 1998, 12 (Supl. 28): Abst P2393); roflumilast (referencia CAS No 162401-32-3) y una ftalacinona (WO 99/47505, cuya descripción se incorpora en el presente documento por referencia) de Byk-Gulden; Pumafentrina, (-)-p-[(4*a*R*,10*b*S*)-9-etoxi-1,2,3,4,4a,10b-hexahidro-8-metox-2-metilbenzo[c][1,6]naftiridin-6-il]-N,N-diisopropilbenzamida que es un inhibidor de la PDE3/PDE4 mixto que ha sido preparado y publicado por Byk-Gulden, ahora Altana; arofilina el desarrollo por Almirall-Prodesfarma; VM554/UM565 de Vernalis; o T-440 (Tanabe Seiyaku; Fuji, K. y colaboradores, *J Pharmacol Exp Ther*, 1998, 284(1): 162), y T2585.

Compuestos de interés adicionales se describen en la solicitud de patente internacional publicada WO 04/024728 (Glaxo Group Ltd), PCT/EP 2003/014867 (Glaxo Group Ltd) y PCT/EP 2004/005494 (Glaxo Group Ltd).

Los agentes anticolinérgicos adecuados son aquellos compuestos que actúan como antagonistas de los receptores muscarínicos, en particular aquellos compuestos que son antagonistas de los receptores M_1 o M_3, antagonistas dobles de M_1/M_3 o M_2/M_3, receptores o pan-antagonistas de los receptores $M_1/M_2/M_3$. Compuestos ejemplares para la administración por inhalación incluyen ipratropium (por ejemplo como bromuro, CAS 22254-24-6, vendido bajo el nombre Atrovent), oxitropium (por ejemplo como bromuro, CAS 30286-75-0) y tiotropium (por ejemplo como bromuro, CAS 136310-93-5, vendido bajo el nombre Spiriva). También son de interés el revatropato (por ejemplo como clorhidrato, CAS 262586-79-8) y el LAS-34273 que se describe en el documento WO 01/04118. Compuestos ejemplares para la administración por vía oral incluyen pirencepina (CAS 28797-61-7), darifenacina (CAS 133099-04-4, o CAS 133099-07-7 para el bromhidrato vendido bajo el nombre Enablex), oxibutinina (CAS 5633-20-5, vendido bajo el nombre Ditropan), terodilina (CAS 15793-40-5), tolterodina (CAS 124937-51-5, o CAS 124937-52-6 para el tartrato, vendido bajo el nombre Detrol), otilonium (por ejemplo como bromuro, CAS 26095-59-0, vendido bajo el nombre Spasmomen), cloruro de trospium (CAS 10405-02-4) y solifenacina (CAS 242478-37-1, o CAS 242478-38-2 para el succinato también conocido como YM-905 y vendido bajo el nombre Vesicare).

Otros agentes anticolinérgicos adecuados incluyen compuestos de fórmula (XXI), que se describen en la solicitud de patente de EE.UU.

60/487981:



(XXI)

en la cual la orientación preferida de la cadena alquílica unida al anillo tropano es endo;

R^{31} y R^{32} se seleccionan, independientemente, del grupo constituido por grupos alquilo inferiores de cadena lineal o ramificada que preferentemente tienen entre 1 y 6 átomos de carbono, grupos cicloalquilo que tienen entre 5 y 6 átomos de carbono, cicloalquil-alquilo que tienen entre 6 y 10 átomos de carbono, 2-tienilo, 2-piridilo, fenilo, fenilo sustituido con un grupo alquilo que no excede de 4 átomos de carbono y fenilo sustituido con un grupo alcoxilo que no excede de 4 átomos de carbono;

X^- representa un anión asociado a la carga positiva del átomo de N. X^- puede ser, pero no está limitado a, cloruro, bromuro, yoduro, sulfato, bencenosulfonato, y toluensulfonato, incluyendo, por ejemplo:

Bromuro de (3-*endo*)-3-(2,2-di-2-tieniletenil)-8,8-dimetil-8-azoniabiciclo[3.2.1]octano;

bromuro de (3-*endo*)-3-(2,2-difeniletenil)-8,8-dimetil-8-azoniabiciclo[3.2.1]octano;

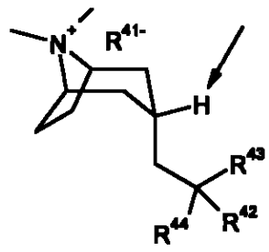
4-metilbencenosulfonato de (3-*endo*)-3-(2,2-difeniletenil)-8,8-dimetil-8-azoniabiciclo[3.2.1]octano;

bromuro de (3-*endo*)-8,8-dimetil-3-[2-fenil-2-(2-tienil)etenil]-8-

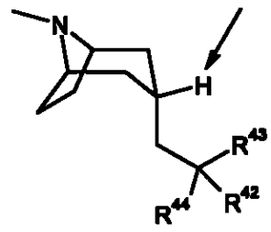
azoniabiciclo[3.2.1]octano; y/o

bromuro de (3-*endo*)-8,8-dimetil-3-[2-fenil-2-(2-piridinil)etenil]-8-azoniabiciclo[3.2.1]octano.

Los agentes anticolinérgicos adecuados adicionales incluyen compuestos de fórmula (XXII) o (XXIII), que se describen en la solicitud de patente de EE.UU. 60/511009:



(XXII)



(XXIII)

en las que:

el átomo de H indicado está en posición exo;

R^{41-} representa un anión asociado a la carga positiva del átomo de N.

R1⁻ puede ser, pero no está limitado a, cloruro, bromuro, yoduro, sulfato, bencenosulfonato y toluensulfonato;

R^{42} y R^{43} se seleccionan, independientemente, del grupo constituido por grupos alquilo inferiores de cadena lineal o ramificada (que preferentemente tienen entre 1 y 6 átomos de carbono), grupos cicloalquilo (que tienen entre 5 y 6 átomos de carbono), cicloalquil-alquilo (que tienen entre 6 y 10 átomos de carbono), heterocicloalquilo (que tienen entre 5 y 6 átomos de carbono) y N u O como heteroátomo, arilo, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo, y heteroarilo opcionalmente sustituido;

R^{44} se selecciona del grupo constituido por alquilo (C_1-C_6), cicloalquilo (C_3-C_{12}), heterocicloalquilo (C_3-C_7), alquil(C_1-C_6)cicloalquilo(C_3-C_{12}), alquil(C_1-

C_6)heterocicloalquilo(C_3-C_7), arilo, heteroarilo, alquil(C_1-C_6)arilo, alquil(C_1-C_6)heteroarilo, -OR^{45}, -CH_2OR^{45}, -CH_2OH, -CN, -CF_3, -$CH_2O(CO)R^{46}$, -CO_2R^{47}, -CH_2NH_2, -$CH_2N(R^{47})SO_2R^{45}$, -$SO_2N(R^{47})(R^{48})$, -$CON(R^{47})(R^{48})$, -$CH_2N(R^{48})CO(R^{48})$, -$CH_2N(R^{48})SO_2(R^{48})$, -$CH_2N(R^{48})CO_2(R^{45})$, -$CH_2N(R^{48})CONH(R^{47})$;

R^{45} se selecciona del grupo constituido por alquilo (C_1-C_6), alquil(C_1-C_6)cicloalquilo(C_3-C_{12}), alquil(C_1-C_6)heterocicloalquilo(C_3-C_7), alquil(C_1-C_6)arilo, alquil(C_1-C_6)heteroarilo;

R^{46} se selecciona del grupo constituido por alquilo (C_1-C_6), cicloalquilo (C_3-C_{12}), heterocicloalquilo (C_3-C_7), alquil(C_1-C_6)cicloalquilo(C_3-C_{12}), alquil(C_1-C_6)heterocicloalquilo(C_3-C7), arilo, heteroarilo, alquil(C_1-C_6)arilo, alquil(C_1-C_6)heteroarilo;

R^{47} y R^{48} se seleccionan, independientemente, del grupo constituido por H, alquilo (C_1-C_6), cicloalquilo (C_3-C_{12}), heterocicloalquilo (C_3-C_7), alquil(C_1-C_6)cicloalquilo(C_3-C_{12}), alquil(C_1-C_6)heterocicloalquilo(C_3-C_7), alquil(C_1-C_6)arilo, y alquil(C_1-C_6)heteroarilo, incluyendo, por ejemplo,:

Yoduro de (*endo*)-3-(2-metoxi-2,2-di-tiofen-2-il-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano;

3-((*endo*)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propionitrilo;

(*endo*)-8-metil-3-(2,2,2-trifenil-etil)-8-aza-biciclo[3.2.1]octano;

3-((*endo*)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propionamida;

ácido 3-((*endo*)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propiónico;

yoduro de (*endo*)-3-(2-ciano-2,2-difenil-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano;

bromuro de (*endo*)-3-(2-ciano-2,2-difenil-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-

biciclo[3.2.1]octano;

3-((*endo*)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propan-1-ol;

N-bencil-3-((*endo*)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propionamida;

yoduro de (*endo*)-3-(2-carbamoil-2,2-difenil-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano;

1-bencil-3-[3-((*endo*)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propil]-urea;

1-etil-3-[3-((*endo*)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propil]-urea;

N-[3-((*endo*)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propil]-acetamida;

N-[3-((*endo*)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propil]-benzamida;

3-((*endo*)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-di-tiofen-2-il-propionitrilo;

yoduro de (*endo*)-3-(2-ciano-2,2-di-tiofen-2-il-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano;

N-[3-((*endo*)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propil]-bencenosulfonamida;

[3-((*endo*)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propil]-urea;

N-[3-((*endo*)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propil]-metanosulfonamida; y/o

bromuro de (*endo*)-3-[2,2-difenil-3-[(1-fenil-metanoil)-amino]-propil]-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano.

Los compuestos más preferidos útiles en la presente invención incluyen:

Yoduro de (*endo*)-3-(2-metoxi-2,2-di-tiofen-2-il-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano;

yoduro de (*endo*)-3-(2-ciano-2,2-difenil-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano;

bromuro de (*endo*)-3-(2-ciano-2,2-difenil-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano;

yoduro de (*endo*)-3-(2-carbamoil-2,2-difenil-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano;

yoduro de (*endo*)-3-(2-ciano-2,2-di-tiofen-2-il-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano; y/o

bromuro de (*endo*)-3-[2,2-difenil-3-[(1-fenil-metanoil)-amino]-propil]-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano.

Los antihistamínicos adecuados (también denominados antagonistas del receptor H1) incluyen cualquiera de uno o más de los numerosos antagonistas conocidos que inhiben los receptores H1, y son seguros para su uso en humanos. Los antagonistas de primera generación, incluyen derivados de etanolaminas, etilendiaminas, y alquilaminas, por ejemplo difenilhidramina, pirilamina, clemastina, clorfeniramina. Los antagonistas de segunda generación, que son no sedantes, incluyen loratidina, desloratidina, terfenadina, astemizol, acrivastina, azelastina, levocetirizina, fexofenadina y cetirizina.

Los ejemplos de antihistamínicos preferidos incluyen loratidina, desloratidina, fexofenadina y cetirizina.

Otras combinaciones contempladas incluyen el uso de los anticuerpos de la invención en combinación con un agente anti-IL-4 (por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-4 tal como pascolizumab) y/o un agente anti-IL-5 (por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-5 tal como mepolizumab) y/o un

agente anti-IgE (por ejemplo, un anticuerpo anti-IgE tal como omalizumab (Xolair™) o talizumab).

Convenientemente, también está contemplada por la presente invención una composición farmacéutica que comprende un kit de partes del anticuerpo de la invención o sus fragmentos de unión al antígeno junto con otros medicamentos opcionalmente junto con las instrucciones para su uso.

La invención además contempla una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo terapéutico monoclonal o sus fragmentos de unión al antígeno como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento de enfermedades sensibles a la modulación de la interacción entre hIL-13 y hIL-13R.

De acuerdo con la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo terapéutico humanizado monoclonal cuyo anticuerpo comprende un dominio VH seleccionado del grupo constituido por: ID SEC Nº: 11, 12, 13, 14 y un dominio VL seleccionado del grupo constituido por: ID SEC Nº: 15, 16.

De acuerdo con la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo terapéutico monoclonal que comprende una cadena pesada seleccionada del grupo constituido por: ID SEC Nº: 18, 19, 20, 21 y una cadena ligera seleccionada del grupo constituido por: ID SEC Nº: 22, 23.

De acuerdo con la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente

eficaz de un anticuerpo terapéutico monoclonal que comprende una cadena pesada de ID SEC Nº: 18 y una cadena ligera de ID SEC Nº: 22 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de una población monoclonal de anticuerpo terapéutico cuyo anticuerpo terapéutico comprende una cadena pesada de ID SEC Nº: 18 y una cadena ligera de ID SEC Nº: 22.

5. Usos clínicos

Los anticuerpos de la invención se pueden usar en el tratamiento de enfermedades/trastornos atópicos y enfermedades/trastornos inflamatorios crónicos. De particular interés es su uso en el tratamiento del asma, tal como asma alérgica, particularmente asma grave (esto es, asma que no es sensible al tratamiento habitual, incluyendo corticoides administrados sistémicamente; véase Busse WW y colaboradores, *J Allergy Clin. Immunol* 2000, 106: 1033-1042), asma "difícil" (definido como el fenotipo asmático caracterizado por el fallo para conseguir el control a pesar de dosis máximas recomendadas de esteroides inhalados prescritos, véase Barnes PJ (1998), *Eur Respir J* 12:1208-1218), asma "inestable" (define un subgrupo de pacientes con asma inestable grave que mantienen una variabilidad del flujo expiatorio máximo amplio (PEF) a pesar de dosis elevadas de esteroides inhalados, véase Ayres JG y colaboradores (1998) *Thorax* 58:315-321), asma nocturna, asma premenstrual, asma resistente a esteroides (véase Woodcock AJ (1993) *Eur Respir J* 6:743-747), asma dependiente de

esteroides (definido como el asma que sólo se puede controlar con dosis elevadas de esteroides orales), asma inducida por aspirina, asma de inicio en el adulto, asma pediátrica. Los anticuerpos de la invención se pueden usar para prevenir, reducir la frecuencia de, o aliviar los efectos de los episodios asmáticos agudos (*status asthmaticus*). Los anticuerpos de la invención también se pueden usar para reducir la dosificación necesaria (tanto en términos de cantidad administrada como de frecuencia de dosificación) de otros medicamentos usados en el tratamiento del asma. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención se pueden usar para reducir la dosificación necesaria para el tratamiento del asma con esteroides tal como tratamiento con corticoesteroides ("ahorro de esteroides"). Otras enfermedades o trastornos que se pueden tratar con los anticuerpos de la invención incluyen dermatitis atópica, rinitis alérgica, enfermedad de Crohn, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), esofagitis eosinófila, trastornos o enfermedades fibróticas tales como fibrosis pulmonar idiopática, esclerosis sistémica progresiva (esclerodermia), fibrosis hepática, granulomas hepáticos, esquistosomiasis, leismaniasis, y enfermedades de la regulación del ciclo celular, por ejemplo, enfermedad de Hodgkin, leucemia linfocítica crónica de las células B.

En una forma de realización de la invención se proporciona un procedimiento para el tratamiento de un paciente humano afectado de una afección asmática que no responde al tratamiento con corticoestéroides cuyo procedimiento comprende la etapa de administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención.

En otra forma de realización se proporciona un procedimiento para la

prevención de un ataque asmático agudo en un paciente humano cuyo procedimiento comprende la etapa de administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención.

En otra forma de realización se proporciona un procedimiento para la reducción de la frecuencia de y/o alivio de los efectos de un ataque asmático agudo en un paciente humano cuyo procedimiento comprende la etapa de administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención.

En otra forma de realización de la invención se proporciona un procedimiento para predisponer la respuesta de las células T ayudantes hacia una respuesta de tipo Th1 después de un ataque alérgico o inflamatorio en un paciente humano cuyo procedimiento comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o sus fragmentos de unión al antígeno de la invención.

En otra forma de realización de la invención se proporciona un procedimiento para el tratamiento de un paciente humano que tiene la variante hIL-13 Q130 cuyo paciente está afectado de asma, tal como asma grave, dicho procedimiento comprende la etapa de administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o sus fragmentos de unión al antígeno de la invención.

Aunque la presente invención se ha descrito principalmente en relación al tratamiento de enfermedades o trastornos humanos, la presente invención también puede tener aplicaciones en el tratamiento de enfermedades o trastornos similares en mamíferos no humanos.

La presente invención ahora se describe por medio de un único

ejemplo.

Ejemplificación

1. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES Y CARACTERIZACIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL 6A1 DE RATÓN

Los anticuerpos monoclonales (Acsm) se producen por células de hibridoma generalmente de acuerdo con el procedimiento indicado en E Harlow y D Lane, *Antibodies a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. El resultado de la fusión de células de mieloma de ratón con linfocitos B da ratones inmunizados con el antígeno diana. La célula de hibridoma se inmortaliza mediante la pareja de fusión mieloma mientras que la capacidad para producir anticuerpos se proporciona mediante el linfocito B.

Se inmunizaron cinco ratones SJL por inyección intraperitoneal con 2 µg cada uno de IL-13 humana recombinante derivada de *E. coli* (Cambridge Bioscience, Nº cat. CH-013). Se usó un esquema de inmunización para desarrollar una elevada titulación de anticuerpos anti-IL-13 humana por la respuesta inmunitaria en los ratones. Después de cinco inmunizaciones durante 64 días, los ratones se sacrificaron selectivamente y se recogieron las células del bazo. Las células del bazo de 3 de los ratones se retiraron y los linfocitos B se fusionaron con células de mieloma de ratón derivadas de células P3X usando PEG1500 (Boehringer) para generar hibridomas. Las líneas celulares de hibridoma individuales se clonaron por dilución limitante (E Harlow y D Lane). Se identificó microscópicamente los pocillos que contenían colonias únicas y los sobrenadantes se probaron para su actividad. Las células de la mayoría de los clones activos se expandieron

para criopreservación, producción de anticuerpos, etc.

Inicialmente, los sobrenadantes de hibridoma se examinaron para su actividad de unión frente a una proteína IL-13 humana marcada con det-1. recombinante expresada en *E. coli* (elaboración propia) en un formato de experimento en sandwich. Se completó un examen secundario de estos positivos usando un procedimiento BIAcore™ para detectar la unión a la proteína IL-13 humana marcada con det-1. A continuación las muestras de estos hibridomas se probaron para su capacidad para neutralizar la bioactividad de IL-13 humana recombinante expresada en *E. coli* (Cambridge Bioscience, cat. no CH-013) en un bioexperimento con células TF-1.

Se subclonaron seis positivos identificados del bioexperimento de neutralización de IL-13 humana por dilución limitante para generar líneas celulares monoclonales estables. Las inmunoglobulinas de estos hibridomas, crecidas en factorías celulares en condiciones exentas de suero, se purificaron usando columnas de proteína A inmovilizada. Estos Acsm purificados a continuación se re-examinaron en los siguientes sistemas experimentales;

- Unión a IL-13 humana recombinante expresada en *E. coli* (en un formato ELISA en sandwich)
- Inhibición de la unión de IL-13 humana marcada con det-1 recombinante expresada en *E. coli* a ambas cadenas del receptor para IL-13 (en un formato ELISA en sandwich)
- Neutralización de cualquiera de las dos IL-13 humana o de macaco recombinantes expresadas en *E. coli* (en un bioexperimento con células

TF-1)

- Neutralización de IL-13 humana expresada en mamífero (en un bioexperimento con células TF-1)
- Neutralización de una variante de IL-13 humana Q130 recombinante expresada en *E. coli* (en un bioexperimento con células TF-1)
- Especificidad para la unión a IL-13 humana por evaluación de la reactividad cruzada del Acm para IL-4 humana en un ELISA anti-IL-4 y evaluación de la reactividad cruzada del Acm para IL-5 en un bioexperimento de neutralización de IL-5
- Análisis BIAcore™ para las medidas de afinidad de unión a IL-13 humana

El anticuerpo 6A1 monoclonal se identificó como el anticuerpo más potente que neutraliza las bioactividades de ambas IL-13 humana y de macaco. Los siguientes análisis describen el perfil para el anticuerpo 6A1 monoclonal en estos experimentos.

1.1 Unión a IL-13 humana recombinante expresada en *E. coli*

El 6A1 unido a IL-13 humana recombinante expresada en *E. coli* en un ELISA en sandwich, procedimiento descrito en la sección 7. Véase Figura 1.

1.2 Inhibición de la unión de IL-13 humana marcada con det-1 recombinante expresada en *E. coli* a IL-13Rα1 e IL-13Rα2 en un formato ELISA

El 6A1 inhibió la unión de IL-13 humana marcada con det-1 recombinante expresada en *E. coli* a ambas cadenas del receptor para IL-3. Además, inhibió la unión más eficazmente que reactivos de anticuerpos

policlonales anti-IL-13 humana y de anticuerpos monoclonales anti-IL-13 humana disponibles comercialmente (obtenidos de R&D Systems). Se calculó un valor CI_{50} de 0,165 µg/ml para la inhibición de la unión de IL-13 humana al IL-13Rα1 humano para el anticuerpo 6A1 monoclonal. Se calculó un valor CI_{50} de 0,056 µg/ml para la inhibición de la unión de IL-13 humana al IL-13Rα2 humano para el anticuerpo 6A1 monoclonal. Véase Figuras 2A y 2B. Un control de IgG de especificidad irrelevante no presentó actividad.

1.3 Neutralización de IL-13 humana y de macaco recombinante expresada en *E. coli* en un bioexperimento de proliferación con células TF-1

Las células TF-1 proliferan en respuesta a IL-13 humana e IL-13 de macaco. Se desarrolló un bioexperimento para asegurar la capacidad de neutralización de un Acm anti-IL-13 sobre la proliferación de células TF-1 inducida por IL-13 humana y de macaco. El 6A1 neutralizó la bioactividad de ambas IL-13 recombinantes humana y de macaco en un bioexperimento con células TF-1. Además, neutralizó ambas IL-13 humana y de macaco más potentemente que reactivos de anticuerpos policlonales anti-IL-13 humana y de anticuerpos monoclonales anti-IL-13 humana disponibles comercialmente (obtenidos de R&D Systems). Véase Figura 3.

Se calculó un valor DN_{50} medio de 0,0783 µg/ml para la neutralización de 5 ng/ml de la bioactividad de IL-13 humana recombinante expresada en *E. coli* en un bioexperimento con células TF-1 para el anticuerpo 6A1 monoclonal. Se calculó un valor DN_{50} de 0,04 µg/ml para la neutralización de 5 ng/ml de la bioactividad de IL-13 de macaco recombinante expresada en *E. coli* en un bioexperimento con células TF-1 para el anticuerpo 6A1

monoclonal. [El valor de DN_{50} (dosis de neutralización) es la concentración de anticuerpo monoclonal necesario para reducir la proliferación de células TF-1 al 50%, en respuesta a una concentración fija de IL-13].

1.4 Neutralización de IL-13 humana expresada en mamífero (células CHO) en un bioexperimento de proliferación con células TF-1

Se evaluó la capacidad de neutralización del anticuerpo 6A1 monoclonal para IL-13 humana expresada en células CHO en un experimento de proliferación con células TF-1. El 6A1 neutralizó IL-13 humana expresada en mamífero más potentemente que un reactivo policlonal anti-IL-13 humana disponible comercialmente. Se calculó un valor DN_{50} de 0,037 µg/ml para la neutralización de ~ 50 ng/ml de IL-13 humana expresada en mamífero en un bioexperimento con células TF-1 para el anticuerpo 6A1 monoclonal. Véase Figura 4.

1.5 Neutralización de la variante IL-13 humana Q130 recombinante en un bioexperimento de proliferación con células TF-1

Se evaluó la capacidad de neutralización del anticuerpo 6A1 monoclonal para IL-13 humana Q130 recombinante expresada en *E. coli* (Peprotech, Nº cat. 200-13A) en un experimento de proliferación con células TF-1. El 6A1 neutralizó IL-13 humana Q130 más potentemente que un reactivo policlonal anti-IL-13 humana disponible comercialmente. Se calculó un valor DN_{50} de 0,11 µg/ml para la neutralización de 60 ng/ml de la bioactividad de IL-13 humana Q130 en un bioexperimento con células TF-1 para el anticuerpo 6A1 monoclonal. Véase Figura 5.

1.6 Especificidad para la unión a IL-13 humana

Como IL-4 humana comparte la mayoría de la identidad con IL-13

humana tanto estructural como funcionalmente, se evaluó la especificidad del anticuerpo 6A1 monoclonal para IL-13 humana en un ELISA de unión de IL-4 humana. El 6A1 no se unió a IL-4 humana recombinante expresada en *E. coli*, indicando el alto nivel de especificidad de este anticuerpo monoclonal para IL-13. Además, el 6A1 no neutralizó de manera cruzada la bioactividad de IL-5 humana recombinante expresada en *E. coli* en un bioexperimento con células TF-1. Véase Figuras 6 y 7.

1.7 Análisis BIAcore™

Se evaluó la afinidad del 6A1 para IL-13 recombinante humana y de macaco por análisis BIAcore™. Véase Tabla 1.

Tabla 1

Muestra de IL-13	Velocidad de asociación Ka (1/Ms)	Velocidad de disociación Kd (1/Ms)	Constante de afinidad kD
IL-13 humana marcada con det-1	$2,25 \times 10^{6}$	$7,2 \times 10^{-5}$	32 pM
IL-13 humana (CA)	$6,82 \times 10^{5}$	$1,84 \times 10^{-4}$	270 pM
IL-13 cyno (CA)	$9,14 \times 10^{5}$	$5,6 \times 10^{-5}$	61,2 pM

Estos datos indican que el 6A1 tiene una muy alta afinidad por ambas IL-13 humana y de macaco. [Se usaron dos muestras de IL-13 humana diferentes (ambas generadas en *E. coli*) para este análisis. La IL-13 es insoluble cuando se produce en *E. coli* y se debe solubilizar y a continuación replegarse *in vitro*. Las diferencias en la calidad de las dos muestras de IL-13 replegadas pueden explicar la diferencia en las afinidades de unión para cada una de estas muestras de IL-13 humana].

2. CLONACIÓN DE LAS REGIONES VARIABLES DEL CLON 6A1

Se extrajo el ARN total del clon de células de hibridoma 6A1 y el ADNc de los dominios variables ligero y pesado se produjo por transcripción inversa usando cebadores específicos para la secuencia conductora murina y las regiones constantes del anticuerpo según el isotipo pre-determinado (IgG1/κ). El ADNc de los dominios ligero y pesado a continuación se clonó en el vector pCR2.1 para su secuenciación.

2.1 Extracción del ARN

El ARN total se extrajo de sedimentos de 10^{6} células del clon de hibridoma 6A1 usando el SV Total RNA Isolation System de Promega según

las instrucciones del fabricante.

2.2 Transcripción Inversa

El ARN se sometió a transcripción inversa para producir el ADNc de los dominios variables ligero y pesado usando cebadores específicos para las secuencias conductoras murinas y las regiones constantes IgG1/κ murinas. La mezcla de cebadores usados se indica en Jones ST y Bendig MM *Bio/technology* 9:88-89 (1991)

Se prepararon reservas de cebadores directos de la secuencia conductora de V_H y V_L murinas a 50 μM. También se prepararon disoluciones de los cebadores inversos de la región constante κ y la IgG1 murinas a 50 μM.

2.3 PCR de transcripción inversa (RT-PCR)

La transcripción inversa del ARN que codifica las regiones variables ligera y pesada se llevó a cabo por duplicado usando el Access RT-PCR System de Promega según las instrucciones del fabricante. Los cebadores inversos y directos de VH y VL son como se ha descrito anteriormente.

2.4 Purificación en gel del producto de la RT-PCR

Los productos de la RT-PCR ($2xV_H$ y $2xV_L$) se cargaron en una disolución de carga de gel en un gel de agarosa al 1% preparativo que contiene el 0,01% de bromuro de etidio y se corrió en un tampón TAE a 100 V durante 1 hora y se separaron las bandas de la región V. También se corrió en el gel una escalera de ADN de 100 pb para permitir la identificación de las bandas V_H y V_L.

Los fragmentos de ADN se extrajeron y purificaron del gel usando un kit de extracción QIAquick ™Gel de Qiagen según las instrucciones del

fabricante.

2.5 Ligación

Los fragmentos de la RT-PCR purificados ($2xV_H$ y $2xV_L$) se clonaron en el vector pCR2.1 usando un kit de clonación TA de Invitrogen según las instrucciones del fabricante.

2.6 Transformación

Los plásmidos ligados se transformaron en células TOP10F' según las instrucciones del kit de clonación TA. Se repartieron 50 µl y 200 µl de células transformadas en placas de L-agar que contenían 100 µg/ml de ampicilina y se cubrieron con 8 µl de una disolución de IPTG 500 mM y 16 µl de una disolución de X-Gal 50 mg/ml en DMF. Las placas se incubaron durante toda la noche a 37°C.

2.7 Secuenciación

Las colonias se seleccionaron y se cultivaron durante toda la noche a 37°C en 5 ml de medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina.

Los plásmidos pCR2.1 que contenían los dominios V_H y V_L de 6A1 se extrajeron y purificaron usando el kit Qiagen QIAprep Spin Miniprep según las instrucciones del fabricante. Los dominios V_H y V_L se secuenciaron usando los cebadores T7, M13 directo y M13 inverso.

La secuencia de aminoácidos de la región V_H de 6A1 (consenso de 10 clones de dos reacciones RT-PCR):

ID SEC Nº: 7

La secuencia de aminoácidos de la región V_L de 6A1 (consenso de 10 clones de dos reacciones RT-PCR):

ID SEC Nº: 8

3. ANTICUERPO QUIMÉRICO

Se injertó un anticuerpo quimérico compuesto de regiones V murinas parentales (descritas en la sección 2.7) en las regiones C de IgG1/k de tipo silvestre, esto se diseñó para confirmar la clonación de las regiones V murinas correctas y también para usarse como una referencia cuando se probaron las construcciones humanizadas. El anticuerpo quimérico se expresó en células CHO, se purificó y se probó para la unión a IL-13 humana por ELISA.

3.1 Amplificación por PCR

Las regiones V murinas clonadas se amplificaron por PCR para introducir los sitios de restricción necesarios para la clonación en los vectores de expresión en mamíferos Rld y Rln. Los sitios Hind III y Spe I se diseñaron para encuadrar el dominio V_H y permitir la clonación en un vector Rld modificado que contiene la región C γ1 humana de tipo silvestre. Los sitios Hind III y BsiW I se diseñaron para encuadrar el dominio V_L y permitir la clonación en un vector Rln modificado que contiene la región C κ humana.

Cebador directo de V_H:

5'-GAT GAA GCT TGC CAC CAT GAA ATG CAG CTG GGT CAT C-3' (ID SEC Nº: 86)

El sitio de restricción Hind III está subrayado y la secuencia Kozak está en negrita.

Cebador inverso de V_H:

5'-GAT GGA CTA GTG TTC CTT GAC CCC AGT A -3' (ID SEC Nº: 87)

El sitio de restricción Spe I está subrayado.

Cebador directo de V_L:

5'-GAT GAA GCT TGC CAC CAT GAA GTT GCC TGT TAG GCT G-3' (ID SEC Nº: 88)

El sitio de restricción Hind III está subrayado y la secuencia Kozak está en negrita.

Cebador inverso de V_L:

5'-GAT GCG TAC GTT TGA TTT CCA GCT TGG TGC C-3' (ID SEC Nº: 89)

El sitio de restricción BsiW I esta subrayado.

Reacción de PCR:	agua	66 µl
	Tampón de PCR 10x	10 µl
	dNTP (2 mM)	10 µl
	cebador 1 (5 µM)	4 µl
	cebador 2 (5 µM)	4 µl
	polimerasa AmpliTaq	2 µl
	plásmido purificado	4 µl
	vol total	100µl

Cebador 1: cebador directo V_H o V_L

Cebador 2: cebador inverso V_H o V_L

Plásmido purificado: plásmido pCR2.1 V_H o V_L purificado por Qiagen Minipreps (200x diluido)

Ciclos de PCR:
1- 95°C durante 4 min
2- 95°C durante 1 min
3- 55°C durante 1 min
4- 72°C durante 1 min
5- 72°C durante 7 min

Las etapas 2 a 4: se repitieron 30 veces

3.2 Clonación en vectores de expresión en mamíferos

Los productos de la PCR se purificaron usando el kit MinElute PCR Purification de Qiagen según las instrucciones del fabricante.

El producto de la PCR V_H y el vector de expresión en mamíferos RId hCγ1wt se digirieron con Hind III-Spe I:

Tampón 10x (NEBuffer2)	5 µl
BSA 100x (NEB)	0,5 µl
ADN	5 µl
Hind III (Promega)	2 µl
Spe I (NEB)	2 µl
agua	35,5 µl
vol total	50 µl

ADN: producto de la PCR V_H purificado o el vector RId hCγ1wt (a 0,25 mg/ml)

Incubado a 37°C durante 2 horas.

El producto de la PCR V_L y el vector de expresión en mamíferos RIn hCκ se digirieron con Hind III-BsiW I:

Tampón 10x (NEBuffer2)	5 µl
ADN	5 µl
Hind III (Promega)	2 µl
agua	38 µl
vol total	50 µl

ADN: producto de la PCR V_L purificado o el vector RIn hCκ (a 0,25 mg/ml)

Incubado a 37°C durante 2 horas. Se añadió 2 µl de BsiW I (NEB) y se incubó a 55°C durante 2 horas.

Los productos de las digestiones de restricción se cargaron en una disolución de carga de gel en un gel de agarosa al 1% preparativo que contenía bromuro de etidio al 0,01% y se corrió en un tampón TAE a 100 V durante 1 hora y se separaron las bandas de los fragmentos de la PCR V_H y V_L así como el vector Rld y Rln. También se corrió en el gel una escalera de ADN de 100 pb para permitir la identificación de las bandas V_H, V_L y del vector. El ADN se extrajo y se purificó del gel usando el kit de extracción QIAquick Gel de Qiagen según las instrucciones del fabricante.

El fragmento de la PCR V_H digerido con Hind III-Spe I se ligó al vector Rld hCγ1wt digerido con Hind III-Spe I. El fragmento de la PCR V_L digerido con Hind III- BsiW I se ligó al vector Rln hCκ digerido con Hind III-BsiW I. La ligación se llevó a cabo usando el LigaFast Rapid DNA Ligation System de Promega según las instrucciones del fabricante proporcionando:

V_H: vector: Rld hCγ1wt digerido con Hind III-Spe I

inserto: fragmento de la PCR V_H digerido con Hind III-Spe I

V_L: vector: Rln hCκ digerido con Hind III-BsiW I

inserto: fragmento de la PCR V_L digerido con Hind III-BsiW I

Los productos ligados se transformaron en células competentes DH5α. Se descongelaron viales de DH5α de 200 µl en hielo. Se prepararon alícuotas de 50 µl en tubos de transformación. Se añadió 2 µl de la mezcla de ligación y se agitó suavemente con una punta de pipeta seguido de incubación durante 30 minutos en hielo. La mezcla se incubó durante 45 segundos a 42°C sin agitación. A continuación ésta se transfirió a hielo durante 2 minutos. Se añadió 450 µl de medio SOC y los tubos se incubaron durante 1 h a 37°C en un incubador agitador. Se repartió a 100 µl del cultivo

en placas de L-agar suplementadas con 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron durante toda la noche a 37°C.

3.3 Secuenciación

Los clones V_H y V_L se cultivaron durante toda la noche a 37°C en 5 ml de medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina. Los plásmidos Rld y Rln que contenían los dominios V_H y V_L respectivamente se extrajeron y purificaron usando el kit Qiagen QIAprep Spin Miniprep según las instrucciones del fabricante. La región V_H se secuenció usando cebadores directos en el vector Rld y la secuencia señal y el cebador inverso en la región Cγ1 humana.

La región V_L se secuenció usando cebadores directos en el vector Rln y la secuencia señal y el cebador inverso en la región Cκ humana. Se identificaron los clones con las secuencias V_H y V_L correctas y los plásmidos se prepararon para su expresión en células CHO.

3.4 Expresión del anticuerpo quimérico en células CHO

Los plásmidos Rld y Rln que contenían los dominios V_H y V_L de 6A1 respectivamente se co-transfectaron de manera transitoria en células CHO y se expresaron. El anticuerpo quimérico producido se purificó del sobrenadante del cultivo celular por cromatografía de afinidad con proteína A en sefarosa

3.4.1 Purificación del plásmido

Las células DH5α que contenían los plásmidos Rld-6A1V_H y Rln-6A1V_L se cultivaron en 5 ml de medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina durante 8 horas a 37°C en un incubador agitador. Se inoculó 200 ml de medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina con 1 ml de

cultivo de día y se incubó durante toda la noche a 37°C en un incubador agitador. Los plásmidos se extrajeron y purificaron usando el kit QIAfilter Plasmid Maxi de Qiagen según las instrucciones del fabricante. El sedimento de etanol se resuspendió en 200 µl de tampón TE y se midió la concentración del plásmido por absorbancia a 260 nm después de diluir 100 veces la disolución stock.

3.4.2 Transfección

Las células CHO se cultivaron hasta confluencia en medio MEM de Dulbecco con Glutamax-1 (DMEM) suplementado con Ultra Low Fetal Bovine Serum y penicilina-estreptomicina al 1% en 4 x 175 cm^2 frascos de cultivo de tejidos BD Falcon a 37°C.

Para cada frasco, en un tubo Falcon de 50 ml, se añadió y se mezcló lo siguiente:

8 ml de Optimem 1 con Glutamax-1

20 µg de plásmido purificado RId-6A1V_H

20µg de plásmido purificado RIn-6A1V_L

240 µl TransFast Transfection Reagent en vórtex

La mezcla se incubó durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el medio DMEM del frasco y a continuación la mezcla se pasó por el vórtex y se añadió al frasco. La mezcla se incubó a 37°C durante 1 h. Se añadió 32 ml de Optimem al frasco y se incubó a 37°C durante 48-72 h.

3.4.3 Purificación del anticuerpo quimérico

El medio de todos los frascos de 175 cm^2 se reunió y se centrifugó a 1500 rpm durante 3 minutos en un MSE Mistral 2000 y el sobrenadante se pasó a través de un Filter System 0,22 µm CA de 500 ml. El anticuerpo se

purificó del sobrenadante clarificado en un Amersham Biosciences Akta Explorer usando el software Unicorn. La columna usada fue una HiTrap rProtein A Sepharose FF de 1 ml. La velocidad de flujo fue de 1 ml/min.

La columna se equilibró con 10 VC de PBS de Dulbecco y a continuación se cargó con el sobrenadante clarificado a través de la bomba A. La columna se lavó con 20 VC de PBS de Dulbecco, la bomba A se lavó para el material sobrante y se pasó 10 VC de PBS de Dulbecco adicionales a través de la columna para asegurar una clarificación completa del sobrenadante.

El anticuerpo se eluyó con 10 VC de ImmunoPure IgG Elution Buffer (Pierce) y se recogió en fracciones de 1 ml que contenían 100 µl de tampón de neutralización Trizma-HCl 1 M a pH 8,0. La columna se re-equilibró con 5 VC de PBS de Dulbecco.

Se cuantificó el anticuerpo en las fracciones eluidas leyendo la absorbancia a 280 nm frente a un blanco que contenía 10 volúmenes de ImmunoPure IgG Elution Buffer + 1 volumen de Trizma-HCl 1 M a pH 8,0 y las fracciones con cantidades suficientes del anticuerpo puro se reunieron y se almacenaron en alícuotas de 100 µl a -20°C.

3.4.4 Análisis del anticuerpo quimérico

Se analizó el sobrenadante y el anticuerpo quimérico 6A1 purificado (6A1c) en ELISAs de unión de IL-13 de macaco y humana.

El sobrenadante de las células CHO se transfectó transitoriamente con anticuerpo monoclonal 6A1 quimérico, unido a ambas IL-13 recombinante humana y de macaco expresadas en *E. coli* en un ELISA en sandwich. El anticuerpo purificado también se unió a ambas IL-13

recombinante humana y de macaco expresadas en *E. coli* en el ELISA en sandwich (datos no mostrados). Véase Figura 8.

La secuencia de aminoácidos y la secuencia del ADNc para IL-13 de macaco (incluyendo la secuencia señal) se indican como ID SEC Nº: 90 y 91 respectivamente.

Estos resultados confirman que se habían clonado con éxito las regiones variables de 6A1 correctas para producir un anticuerpo quimérico de unión al antígeno capaz de unirse a ambas IL-13 humana y de macaco.

4. HUMANIZACIÓN DEL CLON 6A1

4.1 Estrategia de humanización

4.1.1 Búsqueda de las bases de datos de ratón

Se identificaron 12 secuencias de ratón con la homología más alta para la secuencia de aminoácidos V_H de 6A1 y 11 secuencias de ratón con la homología más alta para la secuencia de aminoácidos V_L buscando en una base de datos de péptidos (Genbank).

La secuencia de aminoácidos V_H de 6A1 se comparó con todas las 12 secuencias de ratón de la búsqueda en la base de datos y se identificaron como significativos los siguientes residuos marco:

Posición	VH de 6A1	ratón	suceso
19	R	K	12/12
38	I	K	12/12
81	R	Q	12/12

La posición es según el sistema de numeración de Kabat y colaboradores.

La secuencia de aminoácidos V_L de 6A1 se comparó con 11

secuencias de ratón de la búsqueda en la base de datos que no identificó ningún residuo marco como significativo.

4.1.2. Búsqueda de la base de datos humana

Se identificaron las secuencias marco humanas con la homología más alta para los marcos de V_H y V_L de 6A1 usando el EasyBlast en una base de datos de péptidos.

Se identificó un grupo de secuencias humanas para la V_H de 6A1 del cual se seleccionó el siguiente marco para su humanización

ID SEC Nº: 92

Se identificó los siguientes residuos marco como potencialmente importantes en la afinidad de recuperación y que puede ser necesario retromutar:

Posición (Kabat#)	V_H de 6A1	V_H humana
19	K	R
38	R	I
73	E	T
81	E	R

Se diseñaron 4 construcciones V_H humanizadas con diferentes retromutaciones, una como un injerto directo según las definiciones de CDR dada anteriormente (A1), las otras con diversas retromutaciones (A2, A3, A4).

Por tanto

A2 es A1 más R38I

A3 es A2 más E73T

A4 es A3 más K19R más E81R

Se identificó un grupo de secuencias humanas para la V_L de 6A1 del cual se seleccionó el siguiente marco para su humanización

ID SEC Nº: 93

Se identificó los siguientes residuos marco como potencialmente importantes en la afinidad de recuperación y que puede ser necesario retromutar:

Posición (Kabat#)	V_L de 6A1 de ratón	V_L humana
85	V	I

Se diseñaron dos construcciones, una como un injerto directo (L1), la otra con la retromutación (L2) (es decir, L1 con I85V).

Construcción A1 de V_H humanizada:

ID SEC Nº: 11

Construcción A2 de V_H humanizada:

ID SEC Nº: 12

Construcción A3 de V_H humanizada:

ID SEC Nº: 13

Construcción A4 de V_H humanizada:

ID SEC Nº: 14

Construcción L1 de V_L humanizada:

ID SEC Nº: 15

Construcción L2 de V_L humanizada:

ID SEC Nº: 16

4.2 Humanización de 6A1

Las construcciones de V_H y V_L se prepararon *de novo* por formación de oligonucleótidos solapados que incluyen los sitios de restricción para la

clonación en los vectores de expresión en mamíferos RId y RIn así como una secuencia señal humana. Se introdujeron los sitios de restricción Hind III y Spe I para el marco del dominio V_H que contiene la secuencia señal humana para la clonación en RId que contiene la región constante γ1 humana de tipo silvestre. Se introdujeron los sitios de restricción Hind III y BsiW I para el marco del dominio V_L que contiene la secuencia señal humana para la clonación en RIn que contiene la región constante kappa humana.

Secuencia señal humana: ID SEC Nº: 17

Se diseñó 4 construcciones V_H humanizadas y dos construcciones V_L humanizadas. Esto daría como resultado 8 combinaciones diferentes de cadena pesada-cadena ligera.

Se diseñó la formación de 10 oligonucleótidos aproximadamente de 60 bases de largo aproximadamente con un solapamiento de 18 bases aproximadamente.

4.2.1 Formación de oligonucleótidos

Se prepararon disoluciones de reserva de oligonucleótidos a partir de 5 µl de cada disolución de stock de oligos a 100 µM. La síntesis de los genes V_H y V_L para la formación de los oligonucleótidos solapados se llevó a cabo de manera general según Stemmer WP y colaboradores (1995) *Gene* 164(1):49-53 usando el software descrito en Ertl PF y colaboradores (2003) *Methods* 31:199-206.

4.2.1.1 Reacción de PCR de ensamblaje representativa:

agua	41,5 µl
tampón de PCR 10xProofStart	5 µl
dNTP (10 mM)	1,5 µl
reserva de oligos	1 µl
ADN polimerasa ProofStart	1 µl
vol total	50 µl

Ciclos de la PCR de ensamblaje
1- 94°C durante 2 min
2- 94°C durante 30 sec
3- 40°C durante 2 min
4- 72°C durante 10 sec
5- 94°C durante 15 sec
6- 40°C durante 30 sec
7- 72°C durante 20 sec + 3 sec/ciclo

Las etapas 4 a 7 se repitieron 25 veces

4.2.1.2 PCR de recuperación representativa

Los cebadores 1 y 2 fueron los primeros oligonucleótidos superior e inferior usados en la PCR de ensamblaje. La PCR de recuperación permite la amplificación del gen V completo.

Reacción de PCR de recuperación:

agua	42 µl
tampón de PCR 10xProofStart	4 µl
dNTP (10 mM)	1,5 µl
cebador 1 (100 µM)	0,5 µl
cebador 2 (100 µM)	0,5 µl
reacción de PCR de ensamblaje	1 µl

ADN polimerasa ProofStart	0,5µl
total vol	50µl

Ciclos de PCR de recuperación: 1- 94°C durante 2 min

2- 94°C durante 45 sec

3- 60°C durante 30 sec

4- 72°C durante 2 min

5- 72°C durante 4 min

Las etapas 2 a 4 se repitieron 25 veces

Los productos de la PCR de recuperación se purificaron usando el kit MinElute PCR Purification de Qiagen según las instrucciones del fabricante.

4.2.2 Digestiones de restricción

Las construcciones A1, A2, A3, A4 de V_H de 6A1 humanizadas se digirieron con Hind III-Spe I, las construcciones L1, L2 de V_L de 6A1 humanizadas se digirieron con Hind-III-BsiW I como se ha descrito de manera similar para la sección 3.

4.2.3 Purificación en gel

Los productos de la digestión de restricción se purificaron de manera similar a la sección 3.

4.2.4 Ligación

Los fragmentos de V_H de 6A1 humanizados digeridos con Hind III-Spe I se ligaron en el vector RId hCγ1wt digerido con Hind III-Spe I.

Los fragmentos de V_L de 6A1 humanizados digeridos con Hind III-BsiW I se ligaron en el vector RIn hCκ digerido con Hind III-BsiW I

La ligación se llevó a cabo usando el LigaFast Rapid DNA Ligation System de Promega según las instrucciones del fabricante.

4.2.5 Transformación

De manera similar a como se ha descrito previamente para la sección 3

4.2.6 Procedimiento de secuenciación representativo

Las colonias de cada placa de reacción se cultivaron durante toda la noche a 37°C en 5 ml de medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina. Los plásmidos se extrajeron y purificaron usando el kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen según las instrucciones del fabricante y se secuenciaron usando los cebadores descritos previamente en la sección 3. Se identificaron los clones con las secuencias V_H y V_L humanizadas correctas y los plásmidos se prepararon para su expresión en células CHO.

5. EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS HUMANIZADOS

Se prepararon cuatro construcciones V_H humanizadas (A1, A2, A3, A4) y dos construcciones V_L humanizadas (L1 y L2) en los vectores de expresión en mamíferos RId hCγ1wt y RIn hCκ. Se co-transfectaron transitoriamente ocho plásmidos de combinaciones de cadena ligera-cadena pesada (A1L1, A1L2, A2L1, A2L2, A3L1, A3L2, A4L1, A4L2) en células CHO y se expresaron a pequeña escala para dar 8 anticuerpos humanizados diferentes. Los anticuerpos producidos en el sobrenadante de las células CHO se analizaron en el ELISA de unión de IL-13 humana.

5.1 Procedimiento de purificación de plásmidos representativo

Se cultivó células DH5α que contenían uno de los plásmidos descritos anteriormente el 5 ml de medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina durante 8 horas a 37°C en un incubador agitador. Se inoculó 200 ml de medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina con 1 ml de

cultivo de día y se incubó durante toda la noche a 37°C en un incubador agitador. Los plásmidos se extrajeron y purificaron usando el kit QIAfilter Plasmid Maxi de Qiagen según las instrucciones del fabricante. El sedimento de etanol se resuspendió en 200 µl de tampón TE y se midió la concentración del plásmido por absorbancia a 260 nm después de diluir 100 veces la disolución stock.

5.2 Procedimiento de transfección representativo

Se sembró 9 pocillos de placas Corning Costar 3506 de 6 pocillos con 10^6 células CHO y se cultivaron durante toda la noche en medio MEM de Dulbecco con Glutamax-1 (DMEM) suplementado con Ultra Low Fetal Bovine Serum y penicilina-estreptomicina al 1% a 37°C.

Para cada pocillo, se añadió lo siguiente en un Bijou de 5 ml de manera que cada transformación contenía una combinación diferente de cadenas pesada y ligera.

1 ml de Optimem 1 con Glutamax-1

5 µg de plásmido se lleva V_H humanizada

5 µg de plásmido se lleva V_L humanizada

30 µg TransFast Transfection Reagent pasado por vórtex

La incubación tuvo lugar durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el medio DMEM de los pocillos y a continuación la mezcla se pasó por el vórtex y se añadió al pocillo apropiado. La incubación tuvo lugar a 37°C durante 1 h. Se añadió 2 ml de Optimem por pocillo y se incubó a 37°C durante 48-72 h.

5.3 Análisis de los anticuerpos humanizados

Se recuperó el medio de cada pocillo y se centrifugó a 13.000 rpm

durante 1 min en una centrífuga Eppendorf 5415R y el sobrenadante se pasó a través de un filtro de jeringa de 25 mm Pall Acrodisc de 0,2 µm. El sobrenadante de células se evaluó para la unión a IL-13 humana en un ELISA. Los 8 anticuerpos humanizados se unieron a IL-13 humana con un perfil similar al anticuerpo quimérico 6A1 en el ELISA de unión a IL-13 humana. Véase Figura 9.

Los anticuerpos humanizados L1+A1 y L2+A1 se seleccionaron para su expresión a una escala mayor, purificación y análisis posterior.

6. EVALUACIÓN DE LOS ANTICUERPOS L1+A1 Y L2+A1 ANTI- IL-13 HUMANA HUMANIZADOS

6.1 Actividad en los ELISAs de unión de IL-13 humana y de macaco

Se generaron con éxito L1+A1 y L2+A1 de la expresión a mayor escala y se evaluaron para la unión a IL-13 humana y de macaco expresadas en *E.coli* mediante ELISA. Véase Figuras 10a y 10b.

ELISA	Acm	CE_{50} (µg/ml)
Unión a IL-13 humana	Acm 6A1 parental	0,049
	6A1 quimérico	0,015
	L1+A1	0,018
	L2+A1	0,024
Unión a IL-13 de macaco	Acm 6A1 parental	0,039
	6A1 quimérico	0,018
	L1+A1	0,021
	L2+A1	0,028

Ambos L1+A1 y L2+A1 se unieron a IL-13 humana y de macaco expresadas en *E.coli* con un perfil similar. Los valores de CE_{50} (generados usando una función de ajuste a una curva 'Robosage' en Excel) indicaron que la actividad de unión es muy similar al Acm 6A1 quimérico patrón.

6.2 Evaluación de L1+A1 y L2+A1 para la unión a IL-13 humana nativa (derivada de PBMC)

Se usó el sobrenadante de células Th2 CD4+ (generadas a partir de cultivos de PBMC humanas) estimuladas con anti-CD3 y anti-CD28 para evaluar la unión del Acm 6A1 quimérico, L1+A1 y L2+A1 a IL-13 humana nativa (derivada de PBMC). En un ELISA, los 3 anticuerpos se unieron a IL-13 humana nativa en el sobrenadante de células Th2 con un comportamiento muy similar a aquel del Acm 6A1 parental. Véase Figura 11

Además, se generó una curva patrón usando los reactivos disponibles comercialmente, para determinar el nivel de IL-13 humana nativa presente en el sobrenadante de las células Th2. Los 3 anticuerpos y el Acm anti-IL-13 humana disponible comercialmente detectaron cantidades equivalentes de IL-13 en la muestra de sobrenadante de Th2. Véase Tabla 2 a continuación.

Tabla 2

Acm	IL-13 nativa (ng/ml)
Acm 6A1 parental	22,5
6A1 quimérico	19,6
L1+A1	25,1
L2+A1	22,7
Acm control +	28,0

6.3 Actividad inhibidora de L1+A1 y L2+A1 para IL-13 en ELISAs de unión al receptor para IL-13

Se evaluó el Acm 6A1 parental de ratón, 6A1 quimérico, L1+A1 y L2+A1, para su capacidad para inhibir la unión de IL-13 humana a las cadenas IL-13Rα1 y IL-13Rα2 en un ELISA de competición. Véase Figuras

12a y 12b y Tabla 3 a continuación.

Tabla 3

ELISA	Acm	CI_{50} (µg/ml)
Competición por el IL-13Rα1 humano	Acm 6A1 parental	0,039
	6A1 quimérico	0,034
	L1+A1	0,044
	L2+A1	0,056
Competición por el IL-13Rα2 humano	Acm 6A1 parental	0,020
	6A1 quimérico	0,040
	L1+A1	0,113
	L2+A1	0,117

Todos los anticuerpos inhibieron la unión de IL-13 humana marcada con det-1 expresada en *E. coli* al IL-13Rα1 humano con un perfil similar. De manera similar, todos los anticuerpos inhibieron la unión de IL-13 humana marcada con det-1 expresada en *E. coli* al IL-13Rα2 humano, aunque con alguna reducción en la eficacia para L1+A1 y L2+A1 en este experimento (los valores de CI_{50} se generaron usando una función de ajuste a una curva 'Robosage' en Excel)

6.4 Evaluación de la afinidad de L1+A1 y L2+A1 para la unión a IL-13 humana

Se evaluó las cinéticas de unión de L1+A1 y L2+A1 para IL-13 humana usando el sistema BIAcore™. Véase Sección 7 a continuación para el procedimiento usado.

Análisis 1:

Completado para ambas IL-13 humana y de macaco (proteína expresada en *E. coli*). Los valores de K_D indicados son el promedio de las 5 curvas de concentración diferentes de IL-13 (realizadas por triplicado). Nótese que las distribuciones de transferencia total eran evidentes en este análisis y que se ha completado un protocolo experimental modificado (para

corregir esta distribución) en el Análisis 4 (en el que no están presentes las distribuciones de transferencia total). Véase Tabla 4.

Tabla 4

Muestra de IL-13	Acm	Velocidad de asociación Ka (Ms^{-1})	Velocidad de disociación Kd (s^{-1})	Constante de afinidad K_D (pM)
IL-13 humana	Acm 6A1 parental	$1,96 \times 10^{6}$	$6,78 \times 10^{-5}$	35
	6A1quimérico	$4,64 \times 10^{5}$	2×10^{-5}	43
	L1+A1	$5,07 \times 10^{5}$	$1,55 \times 10^{-4}$	300
	L2+A1	$5,07 \times 10^{5}$	$1,56 \times 10^{-4}$	310
IL-13 de macaco	Acm 6A1 parental	$9,14 \times 10^{5}$	$5,6 \times 10^{-5}$	61
	6A1quimérico	$5,92 \times 10^{5}$	$3,27 \times 10^{-5}$	55
	L1+A1	$4,46 \times 10^{5}$	$1,55 \times 10^{-5}$	35
	L2+A1	$5,77 \times 10^{5}$	$5,58 \times 10^{-5}$	97

Análisis 2:

Completado para la unión de IL-13 humana (proteína expresada en *E. coli*) a L1+A1. Véase Tabla 5.

Tabla 5

Muestra de IL-13	Acm	Velocidad de asociación Ka (Ms^{-1})	Velocidad de disociación Kd (s^{-1})	Constante de afinidad K_D (pM)
IL-13 humana	L1+A1	$4,95 \times 10^{5}$	$8,22 \times 10^{-5}$	166

Análisis 3:

Completado para el péptido número 24 16-mero de IL-13 humana biotinilado (identificado como el epítopo de unión lineal para el Acm 6A1 parental, véase sección 6.7). Nótese los valores de K_D absolutos obtenidos para la unión a ligandos peptídicos a menudo son bastante diferentes de aquellos observados para la unión a la proteína diana completa. No obstante, estos datos son coherentes con los datos de la proteína completa y los datos de neutralización de IL-13 (en el bioexperimento con TF-1) en que indican una reducción en la afinidad de tres veces aproximadamente entre el 6A1 quimérico y el L1+A1. Véase Tabla 6.

Tabla 6

Muestra de IL-13	Acm	Velocidad de asociación Ka (Ms^{-1})	Velocidad de disociación Kd (s^{-1})	Constante de afinidad K_D (pM)
Péptido 24	Acm 6A1 parental	$2,95 \times 10^5$	$9,15 \times 10^{-4}$	3,11
	6A1quimérico	$2,57 \times 10^5$	$9,19 \times 10^{-4}$	3,58
	L1+A1	$1,95 \times 10^5$	$1,7 \times 10^{-3}$	9,03
	L2+A1	$1,79 \times 10^5$	$1,67 \times 10^{-3}$	9,35

Análisis 4:

Completado para ambas IL-13 humana y de macaco (proteína expresada en *E. coli*). Los valores de K_D indicados son el promedio de las 5 curvas de concentración diferentes de IL-13 (realizadas por triplicado). Nótese que las distribuciones de transferencia total no eran evidentes para este grupo de datos. Véase Tabla 7.

Tabla 7

Muestra de IL-13	Acm	Velocidad de asociación Ka (Ms^{-1})	Velocidad de disociación Kd (s^{-1})	Constante de afinidad K_D (pM)
IL-13 humana	6A1 quimérico	$1,05 \times 10^6$	4×10^{-5}	38
	L1+A1	$8,24 \times 10^5$	$1,4 \times 10^{-4}$	170
	L2+A1	$9,07 \times 10^5$	$1,39 \times 10^{-4}$	153
IL-13 de macaco	6A1 quimérico	$8,85 \times 10^5$	$2,65 \times 10^{-5}$	30
	L1+A1	$7,3 \times 10^5$	$5,86 \times 10^{-5}$	80
	L2+A1	$7,72 \times 10^5$	$4,25 \times 10^{-5}$	55

Los resultados indican una diferencia significativa entre las construcciones humanizadas L1+A1 y L2+A1.

L1+A1 presenta una afinidad por IL-13 humana de 168 pM aproximadamente. Las cinéticas están dominadas por una velocidad de disociación excepcionalmente baja, como se podría predecir de la potente actividad de neutralización del anticuerpo. Los datos para la constante de asociación k_{on} están sistemáticamente alrededor de 6×10^5 $M^{-1}s^{-1}$. Las estimaciones de la constante de disociación k_{off} son más variables, cubriendo el intervalo de $1,4 \times 10^{-4}$ a $8,22 \times 10^{-5}$ s^{-1}, reflejando el desafío técnico para la obtención de una cuantificación precisa para velocidades de disociación lentas.

6.5 Actividad de L1+A1 y L2+A1 en los bioexperimentos de neutralización de IL-13

Se evaluaron el Acm 6A1 parental de ratón, 6A1 quimérico, L1+A1 y

L2+A1 para su actividad de neutralización de IL-13 en un bioexperimento con células TF-1 *in vitro* (este bioexperimento es el patrón de la industria para la evaluación de la bioactividad de IL-13 y para la evaluación de la capacidad de neutralización de anticuerpos anti-IL-13 suministrados comercialmente). Se evaluaron una serie de variantes de IL-13 en este experimento, incluyendo IL-13 humana expresada en *E.coli*, IL-13 de macaco expresada en *E.coli*, IL-13 humana Q130 expresada en *E.coli* (la variante asociada al asma), y IL-13 humana expresada en células CHO de mamífero (nota: IL-13 humana nativa en la muestra del sobrenadante de células Th2 no se podría usar en este bioexperimento, ya que este sobrenadante también contiene otras citoquinas que son capaces de proliferar células TF-1). Véase Figuras 13a, 13b, 13c y 13d.

Todos los anticuerpos neutralizaron la bioactividad de todas las variantes de IL-13 en este sistema bioexperimental; se determinó la capacidad de neutralización de cada anticuerpo para cada variante de IL-13 y se expresó como un valor de DN_{50}. Véase Tabla 8.

Tabla 8

Variante de IL-13	Acm	DN_{50} medio para dos experimentos (µg/ml)
IL-13 humana expresada en *E.coli*	6A1 quimérico	0,119
	L1+A1	0,428
	L2+A1	0,608
	Acm 6A1 parental	0,193
IL-13 de macaco expresada en *E.coli*	6A1 quimérico	0,059
	L1+A1	0,078
	L2+A1	0,120
	Acm 6A1 parental	0,078
IL-13 humana Q130 expresada en *E.coli*	6A1 quimérico	0,128
	L1+A1	0,438
	L2+A1	0,705
	Acm 6A1 parental	0,213
IL-13 humana expresada en células CHO	6A1 quimérico	0,285
	L1+A1	0,975
	L2+A1	1,200
	Acm 6A1 parental	0,440

Nota: como son necesarias cantidades diferentes de cada variante de IL-13 para proliferar hasta el mismo grado las células TF-1 en este bioexperimento, no es apropiado comparar los valores de DN_{50} generados por un anticuerpo particular a través de cada variante de IL-13 usada. No

obstante, es apropiado comparar los valores de DN_{50} generados por cada anticuerpo para una única variante de IL-13.

En general, el nivel de neutralización conseguido por el Acm 6A1 parental y el 6A1 quimérico fue muy similar, indicando que no hubo pérdida de eficacia entre el Acm parental y la quimera. No obstante, las eficacias de L1+A1 y L2+A1 se redujeron ligeramente en comparación con ambos Acm 6A1 parental y 6A1 quimérico un promedio de 3 a 4 veces aproximadamente para cada variante de IL-13 individual probada. Estos datos están muy de acuerdo con aquellos obtenidos de la evaluación con BIAcore™.

6.6 Especificidad de L1+A1 y L2+A1 para la unión a IL-13 humana

Las especificidades de L1+A1 y L2+A1 para IL-13 humana se evaluaron por análisis de la reactividad cruzada potencial frente a IL-4 humana y el GM-CSF humano en ELISAs de unión. Véase Figuras 14a y 14b.

Se encontró que estos Acm son altamente específicos para su unión a IL-13, sin reactividad cruzada para IL-4 humana o el GM-CSF humano a concentraciones de Acm de hasta 30 µg/ml. Además, estos Acm no neutralizaron de manera cruzada la bioactividad de IL-5 humana en un bioexperimento con IL-5. Véase Figura 14c.

6.7 Mapeo del epítopo de 6A1 usando péptidos biotinilados

Las proteínas IL-13 humana e IL-13 de macaco se corrieron en un gel SDS-PAGE desnaturalizante. La transferencia Western con Acm 6A1 de ratón detectó las bandas de los tamaños esperados para ambas proteínas IL-13 humana (expresada en *E. coli*, elaboración propia) y de macaco (expresada en *E. coli*, elaboración propia). El 6A1 no detectó la hIL-13

(expresada en *E. coli*, Cambridge Bioscience), debido probablemente a un fallo técnico. Este análisis sugiere que el Acm 6A1 reconoce un epítopo del péptido lineal dentro de las secuencias de IL-13 humana y de macaco (datos no mostrados).

Se sintetizaron péptidos 16-meros biotinilados compensados por 4 para mapear la localización del epítopo de la célula B reconocido por el Acm 6A1 en ambas IL-13 humana y de macaco. Se usó el método de ELISA para detectar la unión del péptido biotinilado inmovilizado al Acm 6A1 parental.

Detalles de los péptidos diseñados de encargo 16 mer: 88 x 16 mers, compensados por 4 (suministrados por Mimotopes, Australia).

Formato: Péptidos 25 y 44 = Biotina-SGSG-PÉPTIDO-ácido

Péptidos 2-24 y 27-43 = Biotina-SGSG-PÉPTIDO-amida

#	Hidro	P. Mol.	N-térm.	Secuencia C-térm.
2	0,42	2311,66	Biotina-	ID SEC Nº: 38-NH_2
3	0,27	2453,82	Biotina-	ID SEC Nº: 39-NH_2
4	0,38	2326,70	Biotina-	ID SEC Nº: 40-NH_2
5	0,31	2231,58	Biotina-	ID SEC Nº: 41-NH_2
6	0,43	2289,66	Biotina-	ID SEC Nº: 42-NH_2
7	0,59	2190,57	Biotina-	ID SEC Nº: 43-NH_2
8	0,57	2260,64	Biotina-	ID SEC Nº: 44-NH_2
9	0,62*	2255,64	Biotina-	ID SEC Nº: 45-NH_2
10	0,51	2197,56	Biotina-	ID SEC Nº: 46-NH_2
11	0,56	2144,52	Biotina-	ID SEC Nº: 47-NH_2
12	0,46	2090,38	Biotina-	ID SEC Nº: 48-NH_2
13	0,29	2219,54	Biotina-	ID SEC Nº: 49-NH_2

	14	0,29	2180,53	Biotina-	ID SEC Nº: 50-NH_2
	15	0,36	2318,70	Biotina-	ID SEC Nº: 51-NH_2
	16	0,32	2303,73	Biotina-	ID SEC Nº: 52-NH_2
	17	0,47	2209,57	Biotina-	ID SEC Nº: 53-NH_2
	18	0,48	2257,60	Biotina-	ID SEC Nº: 54-NH_2
	19	0,17	2273,57	Biotina-	ID SEC Nº: 55-NH_2
	20	0,27	2300,60	Biotina-	ID SEC Nº: 56-NH_2
	21	0,29	2383,77	Biotina-	ID SEC Nº: 57-NH_2
	22	0,35	2401,83	Biotina-	ID SEC Nº: 58-NH_2
	23	0,45	2407,92	Biotina-	ID SEC Nº: 59-NH_2
	24	0,42	2541,08	Biotina-	ID SEC Nº: 60-NH_2
	25	0,33	2513,97	Biotina-	ID SEC Nº: 61-OH
	27	0,42	2283,64	Biotina-	ID SEC Nº: 62-NH_2
	28	0,27	2425,81	Biotina-	ID SEC Nº: 63-NH_2
	29	0,57	2228,57	Biotina-	ID SEC Nº: 64-NH_2
	30	0,62*	2223,57	Biotina-	ID SEC Nº: 65-NH_2
	31	0,51	2165,49	Biotina-	ID SEC Nº: 66-NH_2
	32	0,56	2112,45	Biotina-	ID SEC Nº: 67-NH_2
	33	0,27	2207,56	Biotina-	ID SEC Nº: 68-NH_2
	34	0,33	2345,73	Biotina-	ID SEC Nº: 69-NH_2
	35	0,29	2330,76	Biotina-	ID SEC Nº: 70-NH_2
	36	0,45	2236,60	Biotina-	ID SEC Nº: 71-NH_2
	37	0,43	2276,64	Biotina-	ID SEC Nº: 72-NH_2
	38	0,12	2292,62	Biotina-	ID SEC Nº: 73-NH_2
	39	0,22	2319,64	Biotina-	ID SEC Nº: 74-NH_2

	40	0,24	2402,82	Biotina-	ID SEC Nº: 75-NH_2
	41	0,33	2387,80	Biotina-	ID SEC Nº: 76-NH_2
	42	0,43	2393,90	Biotina-	ID SEC Nº: 77-NH_2
	43	0,39	2527,05	Biotina-	ID SEC Nº: 78-NH_2
5	44	0,35	2471,88	Biotina-	ID SEC Nº: 79-OH

(* indica un valor de hidrofobicidad elevado)

Ejemplo: una placa de 96 pocillos típica dispuesta para este experimento.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
B	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
C	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
D	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
E	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
F	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
G	39	39	40	40	41	41	42	42	43	43	44	44
H	+VE (4)	+VE (16)	+VE (32)	+VE (4)	+VE (16)	+VE (32)	–VE (4)	–VE (16)	–VE (32)	–VE (4)	–VE (16)	–VE (32)

NB: los números indican el péptido en cada pocillo

Los números entre paréntesis indican en el factor de dilución del anticuerpo control.

Resultado típico: absorbancia a 490 nm de los 96 pocillos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,057	0,067	0,079	0,063	0,072	0,061	0,084	0,061	0,075	0,064	0,075	0,066
B	0,068	0,070	0,105	0,065	0,075	0,072	0,071	0,070	0,084	0,061	0,062	0,063
C	0,119	0,081	0,099	0,064	0,073	0,077	0,060	0,061	0,090	0,144	2,109	2,200
D	0,115	0,129	0,141	0,060	0,090	0,063	0,104	0,078	0,076	0,135	2,148	2,210
E	0,060	0,074	0,098	0,062	0,064	0,071	0,088	0,082	0,089	0,073	0,068	0,067
F	0,082	0,078	0,071	0,062	0,056	0,057	0,084	0,067	0,090	0,074	0,063	0,056
G	0,057	0,055	0,060	0,060	0,058	0,058	0,104	0,108	2,236	2,237	2,229	2,229
H	1,499	1,197	0,739	1,548	1,209	0,976	0,077	0,080	0,072	0,072	0,082	0,103

Este resultado (uno de una serie de intentos) tiene correlación con un resultado positivo para los péptidos 24, 25, 43 y 44 como se muestra a. continuación (así como los péptidos control positivo). Véase Figura 15. Todos los intentos demuestran que los péptidos 24, 25, 43 y 44 eran positivos.

Péptido 24: QFVKDLLLHLKKLFRE (ID SEC Nº: 80)

Péptido 25: DLLLHLKKLFREGRFN (ID SEC Nº: 81)

Péptido 43: QFVKDLLVHLKKLFRE (ID SEC Nº: 82)

Péptido 44: DLLVHLKKLFREGQFN (ID SEC Nº: 83)

Los péptidos 24 y 25 se derivan de la hIL-13. Los péptidos 43 y 44 derivan de la cynoIL-13.

Además y como cabría esperar, todos los Acsm 6A1 quimérico, L1+A1 y L2+A1 se unen al mismo epítopo lineal de la región C-terminal en ambas IL-13 humana y de macaco (datos para los Acsm 6A1 quimérico, L1+A1 y L2+A1 no mostrados).

En resumen, los resultados del ELISA indican que el Acm 6A1 parental de ratón, el 6A1 quimérico, los Acms L1+A1 y L2+A1 se unen todos dentro de la siguiente secuencia de la proteína IL-13 humana:

DLLLHLKKLFRE (ID SEC Nº: 84)

Y dentro de la siguiente secuencia de la proteína IL-13 de macaco:

DLLVHLKKLFRE (ID SEC Nº: 85)

NB: **LA NEGRITA** indica diferencias de residuo entre IL-13 humana y ortólogo de IL-13 de macaco.

Por consiguiente se ha determinado que el Acm 6A1 parental de ratón, el 6A1 quimérico, los Acsm L1+A1 y L2+A1 se unen inmunoespecíficamente a IL-13 humana entre los residuos 97 y 108 de ID SEC Nº: 9

6.8 Mapeo preciso del epítopo de 6A1 usando péptidos biotinilados

Se determinó el epítopo de unión exacto para el Acm 6A1 usando un grupo de péptidos basados en torno a KDLLLHLKKLFREG para la unión a IL-13 humana y a KDLLVHLKKLFREG para la unión a IL-13 de macaco. Los péptidos se ordenaron con un aminoácido eliminado secuencialmente de cualquiera de los dos N o C-término de estas secuencias peptídicas parentales (es decir, KDLLLHLKKLFREG o KDLLVHLKKLFREG), para definir el epítopo de unión lineal preciso para el Acm 6A1.

Se usó un método de ELISA para detectar la unión del péptido biotinilado inmovilizado al Acm 6A1 parental.

El número de identificación del péptido (413 a 447) y sus secuencias correspondientes se muestran a continuación.

Secuencias de los péptidos:

Péptido #	N-Térm.	Secuencia	C- Térm.
413	Biotina-	ID SEC Nº: 94	-NH_2
414	Biotina-	ID SEC Nº: 95	-NH_2
415	Biotina-	ID SEC Nº: 96	-NH_2
416	Biotina-	ID SEC Nº: 97	-NH_2
417	Biotina-	ID SEC Nº: 98	-NH_2
418	Biotina-	ID SEC Nº: 99	-NH_2
419	Biotina-	ID SEC Nº: 100	-NH_2
420	Biotina-	ID SEC Nº: 101	-NH_2
421	Biotina-	ID SEC Nº: 102	-NH_2
422	Biotina-	ID SEC Nº: 103	-NH_2
423	Biotina-	ID SEC Nº: 104	-NH_2
424	Biotina-	ID SEC Nº: 105	-NH_2
425	Biotina-	ID SEC Nº: 106	-NH_2
426	Biotina-	ID SEC Nº: 107	-NH_2
427	Biotina-	ID SEC Nº: 108	-NH_2
428	Biotina-	ID SEC Nº: 109	-NH_2
429	Biotina-	ID SEC Nº: 110	-NH_2
430	Biotina-	ID SEC Nº: 111	-NH_2
431	Biotina-	ID SEC Nº: 112	-NH_2
432	Biotina-	ID SEC Nº: 113	-NH_2
433	Biotina-	ID SEC Nº: 114	-NH_2
434	Biotina-	ID SEC Nº: 115	-NH_2
435	Biotina-	ID SEC Nº: 116	-NH_2
436	Biotina-	ID SEC Nº: 117	-NH_2

437	Biotina-	ID SEC Nº: 118	$-NH_2$
438	Biotina-	ID SEC Nº: 119	$-NH_2$
439	Biotina-	ID SEC Nº: 120	$-NH_2$
440	Biotina-	ID SEC Nº: 121	$-NH_2$
441	Biotina-	ID SEC Nº: 122	$-NH_2$
442	Biotina-	ID SEC Nº: 123	$-NH_2$
443	Biotina-	ID SEC Nº: 124	$-NH_2$
444	Biotina-	ID SEC Nº: 125	$-NH_2$
445	Biotina-	ID SEC Nº: 126	$-NH_2$
446	Biotina-	ID SEC Nº: 127	$-NH_2$
447	Biotina-	ID SEC Nº: 128	$-NH_2$
044 (Control)	Biotina-	ID SEC Nº: 79	$-NH_2$

Ejemplo: una placa de 96 pocillos típica dispuesta para este experimento

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424
B	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424
C	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436
D	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436
E	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	044
F	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	044
G	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK
H	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK

NB: Los números indican el péptido en cada pocillo

Resultados típicos: absorbancia a 490 nm de los 96 pocillos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,456	2,501	2,434	2,419	2,746	2,661	2,224	2,407	0,059	0,052	0,052	2,527
B	2,480	2,452	2,444	2,624	2,639	3,106	2,188	2,473	0,059	0,055	0,052	2,568
C	2,472	0,099	0,065	0,059	0,070	0,058	0,053	0,054	0,162	2,479	2,389	2,883
D	2,399	0,100	0,067	0,053	0,049	0,051	0,052	0,047	0,485	2,838	2,783	2,640
E	2,582	2,359	2,585	2,512	0,096	0,052	0,054	0,048	0,049	0,183	0,051	2,424
F	2,431	2,872	2,522	2,243	0,097	0,059	0,052	0,049	0,057	0,047	0,050	2,342
G	0,056	0,051	0,058	0,065	0,056	0,067	0,049	0,047	0,053	0,057	0,052	0,056
H	0,047	0,052	0,050	0,070	0,054	0,047	0,056	0,053	0,049	0,050	0,052	0,049

Véase Figuras 16a y 16b. Los resultados indican que el Acm 6A1 parental se une al epítopo lineal de aminoácidos KKLFR en la región C-terminal de ambos IL-13 humana y el ortólogo de IL-13 de macaco.

Además y como cabría esperar el 6A1 quimérico y los Acsm L1+A1 y L2+A1 se unen todos al mismo epítopo lineal (es decir, KKLFR) en la región C-terminal de IL-13 humana (datos para los Acsm 6A1 quimérico, L1+A1 y L2+A1 no mostrados). Posteriormente se demostró que el Acm 6A1 parental se une al mismo epítopo en IL-13 de macaco.

En resumen, los resultados del ELISA indican que el Acm 6A1 parental de ratón, el 6A1 quimérico, los Acsm L1+A1 y L2+A1 se unen todos dentro de la siguiente secuencia de la proteína IL-13 humana: **KKLFR**

6.9 Exploración de alanina del epítopo de unión del 6A1 usando péptidos biotinilados

Para identificar los residuos claves involucrados en la interacción de IL-13 con el Acm 6A1, se adoptó una aproximación de exploración de alanina usando una secuencia péptica parental que contiene el epítopo de

unión KKLFR (es decir, QFVKDLLLHLKKLFREGRFN). Para este análisis, se generaron péptidos (suministrados por AnaSpec Inc) en los que uno de los aminoácidos se sustituyó secuencialmente por un residuo alanina en cada posición del aminoácido en el epítopo KKLFR (y también para cada uno de los aminoácidos que bordean directamente este epítopo).

Se usó un método de ELISA para detectar la unión del péptido biotinilado inmovilizado al Acm 6A1 y L1+A1.

Los péptidos generados para este análisis y el número de identificación del péptido correspondiente se muestran a continuación:

Péptido #	N-Térm.	Secuencia
1	Biotina	ID SEC Nº: 129
62	Biotina	ID SEC Nº: 130
63	Biotina	ID SEC Nº: 131
64	Biotina	ID SEC Nº: 132
65	Biotina	ID SEC Nº: 133
66	Biotina	ID SEC Nº: 134
67	Biotina	ID SEC Nº: 135
68	Biotina	ID SEC Nº: 136

Resultados: Absorbancia a 490 nm

Resultados de prueba promedio (n = 2).

Para el Acm 6A1 parental (murino):

Número de péptido	1	62	63	64	65	66	67	68
A_{490} promedio	3,543	3,489	3,2795	1,468	3,8495	3,5995	0,595	3,581

Para L1+A1:

Número de péptido	1	62	63	64	65	66	67	68
A_{490} promedio	2,8535	2,832	2,6535	1,8175	3,0165	2,84	0,816	2,8085

Véase Figuras 17a y 17b.

Estos datos sugieren que los residuos aminoácido claves implicados en la interacción del Acm 6A1 o L1+A1 con IL-13 son la arginina (R) en la posición 107, y la lisina (K) en la posición 103.

Este análisis se repitió, pero usando Acsm 6A1 y L1+A1 a un intervalo de concentraciones para confirmar este efecto sobre un intervalo de dilución de Acm.

Véase Figuras 17c y 17d.

Estos datos confirman que los residuos aminoácido claves implicados en la interacción del 6A1 parental (es decir, murino) o L1+A1 con IL-13 son la arginina (R) en la posición 107, y la lisina (K) en la posición 103 de ID SEC Nº: 9.

SECCIÓN 7. - MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

En la siguiente sección se usaron los siguientes materiales y procedimientos donde fuese apropiado. Estos materiales y procedimientos son representativos. Se pueden haber producido cambios menores de los materiales y procedimientos en experimentos repetidos.

MATERIALES

SV Total RNA Isolation System: Promega Z3100

Access RT-PCR System: Promega A1250

Kit QIAquick Gel Extraction: Qiagen 28704

Disolución de carga de gel: Sigma G7654

Agarosa: Invitrogen 15510-019

Bromuro de etidio: Sigma E1510

Tampón TAE: Elaboración propia

Escalera de ADN de 100 pb: New England BioLabs N3231S

Kit de clonación TA: Invitrogen 45-0046

Células TOP10F': Invitrogen 44-0300

L-agar + 100 μg/ml de ampicilina: Elaboración propia

X-Gal, 50 mg/ml en DMF: Promega V394A

ADN polimerasa AmpliTaq: Applied Biosystems

Tampón de PCR 10x: Applied Biosystems

E-Gel de agarosa al 1,2%: Invitrogen G501801

Medio LB + 100 μg/ml de ampicilina: Elaboración propia

Kit QIAprep Spin Miniprep: Qiagen 27106

Kit MinElute PCR Purification: Qiagen 28004

NEBuffer2 10x conc: New England Biolabs B7002S

BSA purificado 100x conc: New England Biolabs B9001S

BsiW I: New England Biolabs R0553L

Hind III: Promega R604A

Spe I: New England Biolabs R0133S

LigaFast Rapid DNA Ligation System: Promega M8225

Células MAX Efficiency DH5α Chemically Competent: Invitrogen 18258-012

Medio SOC: Elaboración propia

Kit QIAfilter Plasmid Maxi: Qiagen 12263

MEM de Dulbecco con Glutamax-1: Invitrogen 31966-021

Optimem 1 con Glutamax-1: Invitrogen 51985-026

TransFast Transfection Reagent: Promega E2431

1ml HiTrap rProtein A Sepharose FF: Amersham Biosciences 17-5079-01

PBS de Dulbecco: Sigma D8537

Tampón ImmunoPure IgG Elution: Pierce 21009

Trizma-HCl 1M pH 8,0: Sigma T2694

ADN polimerasa ProofStart: Qiagen 1016816

Tampón de PCR ProofStart: Qiagen 1016961

7.1. ELISA de unión a IL-13 humana o de macaco

Este experimento describe un ELISA que detecta la unión de un anticuerpo a IL-13 humana o de macaco. Es un formato de ELISA en sandwich.

7.1.1 Materiales

1. Nunc Immunoplate 1 F96 Maxisorp (Life Technologies, 4-39454A)
2. IL-13 humana (Cambridge Biosciences, nº cat. CH1-013)
3. IL-13 de macaco (fabricado por GlaxoSmithkline)
4. Anticuerpo policlonal de cabra anti-IL-13 humana (R+D Systems, nº

cat. AF-213-NA)

5. Anti-IgG-HRP humana (Sigma, Nº cat. A-6029)
6. Anti-IgG-HRP de ratón (Sigma, Nº cat. A-9309)
7. Tampón carbonato/bicarbonato (Sigma; nº cat. C-3041)
8. TBST [solución salina Tris tamponada (6,06 g Tris + 8,06 g NaCl + 0,2 g KCl + H_20 hasta 1L) + Tween 20 al 0,05%]
9. BSA (Sigma A-7030)
10. OPD (Sigma, Nº cat. P-9187)
11. Ácido sulfúrico

7.1.2 Procedimiento

1. La disolución de bloqueo es BSA al 3%+TBST
2. La disolución de lavado es TBST
3. Cubrir las placas de ELISA 'Nunc Maxisorp' con 50 µl de anticuerpo policlonal de cabra anti-IL-13 humana 5 µg/ml (R+D Systems, nº cat. AF-213-NA. Preparado a una concentración de stock de 500 µg/ml según las instrucciones del fabricante, y almacenado en alícuotas a -20°C) en tampón carbonato/bicarbonato (Sigma; nº cat. C-3041, preparado según las instrucciones del fabricante), cubrir con un precinto de la placa e incubar durante toda la noche a 4°C.
4. Bloquear con 100 µl de BSA al 3%/TBST, incubar a temperatura ambiente durante 1 h.
5. Lavar X3 en TBST (al menos 200 µl de disolución de lavado por pocillo y por lavado).
6. Añadir 20 ng por pocillo (en un volumen de 50 µl) de IL-13 humana (Cambridge Bioscience, nº cat. CH1-013. Preparado a una concentración

de stock de 100 ng/µl según las instrucciones del fabricante, y almacenado en alícuotas a -20°C) o 20 ng por pocillo de IL-13 de macaco, en disolución de bloqueo e incubar a temperatura ambiente durante 1 h.

7. Lavar X3 en TBST.
8. Añadir 50 µl de muestra de anticuerpo (titulado para obtener los datos de titulación del último punto, si fuese necesario) en disolución de bloqueo, incubar a temperatura ambiente durante 1 h.
9. Lavar X3 en TBST.
10. Para el anticuerpo humanizado o el anticuerpo 6A1 quimérico, detectar la unión usando 50 µl por pocillo de anti-IgG-HRP humana (Sigma, Nº cat. A-6029) a una dilución 1/2000 en disolución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Para el anticuerpo monoclonal 6A1 de ratón, detectar la unión usando 50 µl por pocillo de anti-IgG-HRP de ratón (Sigma, Nº cat. A-9309) a una dilución 1/1000 en disolución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente.
11. Lavar X3 en TBST.
12. Revelar con 100 µl de OPD (Sigma, Nº cat. P-9187. Preparado según las instrucciones del fabricante), detener con 50 µl de H_2SO_4 3 M, leer a una absorbancia de 490 nm. El tiempo de revelado es de ~ 12 minutos.

7.2. ELISA de la unión de IL-13 humana a la cadena IL-13Rα1 humana

Este ELISA determina si un anticuerpo puede inhibir la unión de IL-13 humana a la cadena IL-13Rα1 humana.

7.2.1 Materiales

1. Nunc Immunoplate 1 F96 Maxisorp (Life Technologies, 4-39454A)

2. IL-13Rα1-Fc humana (R&D Systems, cat.no. 146-IR)
3. IL-13 humana marcada con Det-1 (elaboración propia)
4. Anti-IL-13 humana biotinilada (R&D Systems, nº cat. BAF213)
5. Estreptavidina-HRP
6. Tampón carbonato/bicarbonato (Sigma; nº cat. C-3041)
7. TBST [solución salina Tris tamponada (6,06 g Tris + 8,06 g NaCl + 0,2 g KCl + H_20 hasta 1 L) + 0.05% Tween 20]
8. BSA (Sigma A-7030)
9. OPD (Sigma, Nº cat. P-9187)
10. Ácido sulfúrico

7.2.2 Procedimiento

1. La disolución de bloqueo es BSA al 3%+TBST
2. La disolución de lavado es TBST
3. Cubrir las placas de ELISA 'Nunc Maxisorp' con 50 µl de IL-13Rα1-Fc humana 5 ng/µl en tampón carbonato/bicarbonato. Cubrir con un precinto de la placa e incubar durante toda la noche a 4°C.
4. Bloquear con 100 µl de BSA al 3%/TBST, incubar a temperatura ambiente durante 1 h.
5. Lavar X3 en TBST (al menos 200 µl de disolución de lavado por pocillo y por lavado).
6. En un volumen total de 50 µl, pre-incubar IL-13 humana marcada con det-1 0,04 ng/µl con la muestra de anticuerpo (titulado) en disolución de bloqueo durante 30 minutos. Añadir la muestra pre-incubada a la placa del ELISA cubierta con el receptor e incubar a temperatura ambiente durante 1 h.

7. Lavar X3 en TBST.
8. Detectar cualquier unión a IL-13 humana usando 50 µl por pocillo de anti-IL-13 humana biotinilada diluida a 1 µg/ml. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.
9. Lavar X3 en TBST.
10. Añadir 50 µl por pocillo de conjugado estreptavidina-HRP a una dilución 1/1000. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.
11. Lavar X3 en TBST.
12. Revelar con 100 µl de OPD (Sigma, N° cat. P-9187. Preparado según las instrucciones del fabricante), detener con 50 µl de H_2SO_4 3 M, leer a una absorbancia de 490 nm. El tiempo de revelado es de ~2 minutos.

7.3. ELISA de unión de IL-13 humana a la cadena IL-13Rα2 humana

Este ELISA determina si un anticuerpo puede inhibir la unión de IL-13 humana a la cadena IL-13Rα2 humana.

7.3.1 Materiales

1. Nunc Immunoplate 1 F96 Maxisorp (Life Technologies, 4-39454A)
2. Anti-IgG humana (Sigma, n° cat. I-3382)
3. IL-13Rα2-Fc humana (R&D Systems, cat.no. 614-IR)
4. IL-13 humana marcada con Det-1 (elaboración propia)
5. Anti-IL-13 humana biotinilada (R&D Systems, n° cat. BAF213)
6. Estreptavidina-HRP
7. Tampón carbonato/bicarbonato (Sigma; n° cat. C-3041)
8. TBST [solución salina Tris tamponada (6,06 g Tris + 8,06 g NaCl + 0,2 g KCl + H_20 hasta 1 L) + 0.05% Tween 20]
9. BSA (Sigma A-7030)

10. OPD (Sigma, Nº cat. P-9187)

11. Ácido sulfúrico

7.3.2 Procedimiento

1. La disolución de bloqueo es BSA al 3%+TBST
2. La disolución de lavado es TBST
3. Cubrir las placas de ELISA 'Nunc Maxisorp' con 50 µl de anti-IgG humana diluida a 1/1000 en tampón carbonato/bicarbonato. Cubrir con un precinto de la placa e incubar durante toda la noche a 4°C.
4. Bloquear con 100 µl de BSA al 3%/TBST, incubar a temperatura ambiente durante 1 h.
5. Lavar X3 en TBST (al menos 200 µl de disolución de lavado por pocillo y por lavado).
6. Añadir 50 µl por pocillo de IL-13Rα2-Fc humana 1 µg/ml en disolución de bloqueo. Cubrir con un precinto de la placa e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.
7. Lavar X3 en TBST.
8. En un volumen total de 50 µl, pre-incubar IL-13 humana marcada con det-1 0,04 ng/µl con la muestra de anticuerpo (titulado) en disolución de bloqueo durante 30 minutos. Añadir la muestra pre-incubada a la placa del ELISA cubierta con el receptor e incubar a temperatura ambiente durante 1 h.
9. Lavar X3 en TBST.
10. Detectar cualquier unión a IL-13 humana usando 50 µl por pocillo de anti-IL-13 humana biotinilada diluida a 1 µg/ml. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.

11. Lavar X3 en TBST.

12. Añadir 50 µl por pocillo de conjugado estreptavidina-HRP a una dilución 1/1000. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.

13. Lavar X3 en TBST.

14. Revelar con 100 µl de OPD (Sigma, Nº cat. P-9187. Preparado según las instrucciones del fabricante), detener con 50 µl de H_2SO_4 3 M, leer a una absorbancia de 490 nm. El tiempo de revelado es de ~ 2 minutos

7.4. Bioexperimento de neutralización de IL-13 (experimento de proliferación de células TF-1)

Este es un bioexperimento de IL-13 que se puede usar para determinar la capacidad de neutralización de un anticuerpo anti-IL-13. El procedimiento descrito a continuación usa IL-13 recombinante humana o de macaco. También se puede usar en este experimento IL-13 humana expresada en mamíferos o la variante IL-13 humana Q130. (Las células TF-1 también proliferan en respuesta a IL-5 humana. Este experimento también se usó para evaluar la capacidad de neutralización del 6A1 sobre la bioactividad de IL-5 humana).

7.4.1 Materiales

1. Línea celular TF-1 (elaboración propia)
2. Placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos (Invitrogen)
3. IL-13 humana (Cambridge Bioscience, nº cat. CH1-013)
4. Experimento de proliferación celular no reactivo CellTiter 96 (Promega, Nº cat. G4000)

7.4.2 Procedimiento

1. Procedimiento para medir la capacidad de un Acm anti-IL-13 humana para neutralizar la bioactividad de IL-13 recombinante humana o de macaco en un bioexperimento con células TF-1 (línea celular TF-1 de elaboración propia, no la versión del ATCC).
2. Este experimento se realiza en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos estériles (Invitrogen), en condiciones estériles. Todas las pruebas se realizan por triplicado.
3. Pre-incubar IL-13 humana 10 ng/ml (Cambridge Bioscience, nº cat. CH1-013. Preparada a una concentración de stock de 100 ng/µl según las instrucciones del fabricante usando una técnica estéril en una campana de cultivo de tejidos de clase 2, almacenada en alícuotas pequeñas a -20°C) o IL-13 de macaco 10 ng/ml (de elaboración propia CA) con varias diluciones del Acm anti-IL-13 humana (diluido a partir de 6 µg/ml en 3 diluciones hasta 0,025 µg/ml) en un volumen total de 50 µl durante 1 hora a 37°C. También están incluidos los pocillos con el control positivo, que presentan IL-13 pero no Acm anti-IL-13 humana. Además, los pocillos con el control negativo no presentarán IL-13 ni Acm anti-IL-13 humana. Uso de una placa de 96 pocillos de fondo redondo estéril, con baja unión de proteínas, para esta pre-incubación. (Nótese que la concentración de IL-13 y el Acm anti-IL-13 humana se reducirá a la mitad en una etapa posterior cuando se añadan las células).
4. Plaquear 50 µl de células TF-1 a $2x10^5$ por ml en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos estéril. Después de 1 hora de pre-incubación, añadir la muestra de IL-13 y de Acm anti-IL-13 humana a las células. El volumen final del experimento de 100 µl, que contiene varias diluciones

del Acm anti-IL-13 humana, IL-13 recombinante y células TF-1, se incuba a 37°C durante ~70 horas en un incubador de CO_2 humidificado.

5. A las ~ 66 hs, se examinó los pocillos para confirmar que estaban estériles y no se había producido contaminación por bacterias.
6. Añadir 15 µl por pocillo de sustrato MTT esterilizado con filtro (Nº cat. G4000, Promega. Preparados según las instrucciones del fabricante) durante las 4 horas finales de incubación.
7. Detener la reacción con 100 µl de disolución de stop (suministrada en el kit MTT) para solubilizar el producto azul de formazán metabolizado. Dejar durante al menos 2 horas, a continuación pipetear arriba y abajo para ayudar a disolver los cristales. Alternativamente, cubrir la placa con un precinto de la placa y dejar a 4°C durante toda la noche, a continuación pipetear arriba y abajo al día siguiente (esto es más fácil para el pipeteo)
8. Leer la absorbancia de la disolución en cada pocillo en un lector de placas de 96 pocillos a una longitud de onda de 570 nm.
9. La capacidad del Acm anti-IL-13 humana para neutralizar la bioactividad de IL-13 humana o de macaco se expresa como, aquella concentración de Acm anti-IL-13 humana necesaria para neutralizar la bioactividad de una cantidad definida de IL-13 humana o de macaco (5 ng/ml) al 50% (= DN_{50}). Cuanto menor sea la concentración necesaria, más potente es la capacidad de neutralización.

Ejemplo: una placa de 96 pocillos típica dispuesta para este experimento

	Muestra 1									Control positivo Ac		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3 ug/ml Acm anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1			Acm muestra 2			Acm muestra 3			3 ug/ml poli anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1		
B	1 ug/ml Acm anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1									1 ug/ml poli anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1		
C	0,33 ug/ml Acm anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1									0,33 ug/ml poli anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1		
D	0,11 ug/ml Acm anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1									0,11 ug/ml poli anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1		
E	0,037 ug/ml Acm anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1									0,037 ug/ml poli anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1		
F	0,0123 ug/ml Acm anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1									0,0123 ug/ml poli anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1		
G	Control positivo para la proliferación de células TF-1 = células TF-1 + IL-13 (sin Acm, 12 pocillos)											

H	Control para el fondo = Células TF-1 presentes exactas (sin IL-13, sin muestra de Acm, 12 pocillos)

7.5. ELISA de unión a IL-4 humana

Este experimento describe un ELISA que detecta la unión de un anticuerpo a IL-4 humana. Es un formato de ELISA en sandwich.

7.5.1 Materiales

1. Nunc Immunoplate 1 F96 Maxisorp (Life Technologies, 4-39454A)
2. IL-4 humana (R+D Systems, nº cat.)
3. Anticuerpo policlonal de cabra anti-IL-4 humana (R+D Systems, Nº cat. AF-204-NA)
4. Anticuerpo monoclonal de rata anti-IL-4 humana biotinilado (BD / Pharmingen, Nº cat.)
5. Anti-IgG-HRP de ratón (Dako, Nº cat. P0260)
6. Anti-IgG-HRP de ratón (Sigma, Nº cat. A-9309)
7. Tampón carbonato/bicarbonato (Sigma; nº cat. C-3041)
8. PBST (PBS + Tween 20 al 0,05%)
9. BSA (Sigma A-7030)
10. OPD (Sigma, Nº cat. P-9187)
11. Ácido sulfúrico

7.5.2 Procedimiento

1. La disolución de bloqueo es BSA al 3% en PBST
2. La disolución de lavado es PBST
3. Cubrir las placas de ELISA 'Nunc Maxisorp' con 50 µl de anticuerpo policlonal de cabra anti-IL-4 humana 5 µg/ml (R+D Systems, nº cat. AF-204-NA. Preparado a una concentración de stock de 500 µg/ml según las

instrucciones del fabricante, y almacenado en alícuotas a -20°C) en tampón carbonato/bicarbonato (Sigma; nº cat. C-3041, preparado según las instrucciones del fabricante), cubrir con un precinto de la placa e incubar durante toda la noche a 4°C.

4. Bloquear con 100 µl de BSA al 3%/PBST, incubar a temperatura ambiente durante 1 h.
5. Lavar X3 en PBST (al menos 200 µl de disolución de lavado por pocillo y por lavado).
6. Añadir IL-4 humana 1 ng/ml (en un volumen de 50 µl) en disolución de bloqueo e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.
7. Lavar X3 en PBST.
8. Añadir 50 µl de muestra de anticuerpo (titulado para obtener los datos de titulación del último punto, si fuese necesario) en disolución de bloqueo, incubar a temperatura ambiente durante 1 h. Como control positivo para la unión a IL-4 humana, usar un anticuerpo monoclonal anti-IL-4 humana biotinilado (titulado).
9. Lavar X3 en TBST.
10. Para el anticuerpo monoclonal 6A1 de ratón, detectar la unión usando 50 µl por pocillo de anti-IgG-HRP de ratón (Sigma, Nº cat. A-9309) a una dilución 1/1000 en disolución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Para el anticuerpo humanizado o el anticuerpo 6A1 quimérico, detectar la unión usando 50 µl por pocillo de anti-IgG-HRP humana (Sigma, Nº cat. A-6029) a una dilución 1/2000 en disolución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Para el control positivo del anticuerpo monoclonal anti-IL-4 humana de rata biotinilado, detectar

usando un anticuerpo conjugado con estreptavidina-HRP. (Alternativamente, el anticuerpo anti-HRP de ratón, P0260, detectará ambos anticuerpos 6A1 y el anticuerpo monoclonal de rata anti-IL-4 humana biotinilado).

11. Lavar X3 en TBST.

12. Revelar con 100 µl de OPD (Sigma, Nº cat. P-9187. Preparado según las instrucciones del fabricante), detener con 50 µl de H_2SO_4 3 M, leer a una absorbancia de 490 nm.

7.6. ELISA del mapeo del epítopo

Este experimento describe un ELISA que detecta la unión del Acm 6A1 de ratón a péptidos de IL-13 humana o de macaco.

7.6.1 Materiales

1. Nunc Immunoplate 1 F96 Maxisorp (Life Technologies, 4-39454A)
2. Estreptavidina ImmunoPure© (Pierce, nº cat. 21125)
3. PBST (solución salina fosfato tamponada + Tween 20 al 0,05%)
4. BSA (Sigma A-7030)
5. Péptidos 16-meros de IL-13 humana y de macaco, compensación = 4 (Orden de encargo a Mimotopes)
6. Péptidos 20-meros control positivo y negativo (Suministrados con la orden de encargo a Mimotopes)
7. Acm 6A1
8. Ac control (Suministrados con la orden de encargo a Mimotopes)
9. Conjugado Ig de conejo anti-ratón - hP (DAKO, código nº P0260)
10. OPD (Sigma, Nº cat. P-9187)
11. Ácido sulfúrico 3 M

7.6.2 Procedimiento

1. La disolución de bloqueo es BSA al 3% + PBST
2. La disolución de lavado es PBST
3. Cubrir las placas de ELISA 'Nunc Maxisorp' con 100 µl de estreptavidina ImmunoPure© 5 µg/ml (Pierce, nº cat. 21125. Preparada a una concentración de stock de 1 mg/ml según las instrucciones del fabricante, y almacenada en alícuotas a +4°C) usando PBST como diluyente. Incubar durante toda la noche a 37°C para permitir que se seque la disolución.
4. Bloquear con 200 µl de BSA al 3%/PBST. Añadir el precinto de la placa e incubar a temperatura ambiente durante 1 h.
5. Lavar X3 en PBST (al menos 200 µl de disolución de lavado por pocillo y por lavado).
6. Por duplicado y usando PBST como diluyente, añadir 100 µl por pocillo (excepto en los pocillos control) de diluciones de 1000 veces de cada péptido (disueltos según las instrucciones del fabricante en 200 µl de acetonitrilo/agua 40/60, a continuación formar alícuotas en diluciones de 10 veces en el mismo disolvente y almacenar -20°C).
7. En los pocillos control, por duplicado y usando PBST como diluyente añadir 100 µl por pocillo de diluciones de 10 veces de los péptidos control (disueltos según las instrucciones del fabricante en 1 ml de acetonitrilo/agua 40/60 y almacenar a -20°C). Añadir el precinto de la placa e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora en una mesa de agitación.
8. Lavar X3 en PBST (al menos 200 µl de disolución de lavado por

pocillo y por lavado).

9. Añadir 100 µl por pocillo (excepto en los pocillos control) de Acm de ratón 1,506 µg/ml en PBST.
10. Añadir 100 µl por pocillo sólo a los pocillos control, de diluciones de 4, 16 y 32 veces del anticuerpo control (usado como se suministra por el fabricante y almacenado a -20°C) usando PBST como diluyente. Añadir el precinto de la placa e incubar a rtp (presión y temperatura ambiente) durante 1 hora en una mesa de agitación.
11. Lavar X3 en PBST (al menos 200 µl de disolución de lavado por pocillo y por lavado).
12. Añadir 100 µl por pocillo del conjugado Ig de conejo anti-ratón - hP diluido 2000 veces (DAKO, código nº P0260 usado como se suministra, almacenado a +4°C) usando PBST como diluyente. Añadir el precinto de la placa e incubar a presión y temperatura ambiente durante 1 hora en una mesa de agitación.
13. Lavar X3 en PBST (al menos 200 µl de disolución de lavado por pocillo y por lavado).
14. Revelar con 100 µl de OPD (Sigma, Nº cat. P-9187. Preparado según las instrucciones del fabricante), detener con 50 µl de H_2SO_4 3 M, leer a una absorbancia de 490 nm. El tiempo de revelado es de ~ 10 minutos.

7.7. ELISA del mapeo preciso del epítopo

Este experimento describe un ELISA que detecta la unión del Acm 6A1 a los péptidos de IL-13 humana o de macaco

7.7.1 Materiales

1. Nunc Immunoplate 1 F96 Maxisorp (Life Technologies, 4-39454A)
2. Estreptavidina ImmunoPure© (Pierce, nº cat. 21125)
3. PBST (solución salina fosfato tamponada + Tween 20 al 0,05%)
4. BSA (Sigma A-7030)
5. Péptidos malla protectora parcial de IL-13 humana y de macaco (14-meros truncados por un aminoácido a la vez de ambos extremos N- y C-terminal; orden de encargo a Mimotopes)
6. Péptidos 16-meros control positivo (Suministrados con la orden de encargo a Mimotopes anterior)
7. Acm 6A1 (elaboración propia)
8. Anticuerpo conjugado con Ig de cabra anti-ratón - hP (Sigma A-9309)
9. OPD (Sigma, Nº cat. P-9187)
10. Ácido sulfúrico 3 M

7.7.2 Procedimiento

1. La disolución de bloqueo es BSA al 3% + PBST
2. La disolución de lavado es PBST
3. Cubrir las placas de ELISA 'Nunc Maxisorp' con 100 µl de estreptavidina ImmunoPure© 5 µg/ml (Pierce, nº cat. 21125. Preparada a una concentración de stock de 1 mg/ml según las instrucciones del fabricante, y almacenada a +4°C). Incubar durante toda la noche a 37°C.
4. Bloquear con 200 µl de BSA al 3% en PBST. Añadir el precinto de la placa e incubar durante toda la noche a +4°C.
5. Lavar X3 en PBST (al menos 200 µl de disolución de lavado por pocillo y por lavado).

6. Por duplicado y usando BSA al 3% en PBST como diluyente, añadir 100 µl por pocillo de diluciones de 1000 veces de cada péptido (disueltos según las instrucciones del fabricante en 200 µl de acetonitrilo/agua 40/60 y almacenados a -20°C).
7. Lavar X3 en PBST (al menos 200 µl de disolución de lavado por pocillo y por lavado).
8. Añadir 100 µl por pocillo de 6A1 3 µg/ml diluido en BSA al 3% en PBST. Añadir el precinto de la placa e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora en una mesa de agitación.
9. Lavar X3 en PBST (al menos 200 µl de disolución de lavado por pocillo y por lavado).
10. Añadir 100 µl por pocillo de diluciones de 1000 veces de anticuerpo conjugado con Ig de cabra anti-ratón - hP (Sigma A-9309 usado como se suministra, almacenado a +4°C) usando BSA al 3% en PBST como diluyente. Añadir el precinto de la placa e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora en una mesa de agitación.
11. Lavar X3 en PBST (al menos 200 µl de disolución de lavado por pocillo y por lavado).
12. Revelar con 100 µl de OPD (Sigma, Nº cat. P-9187. Preparado según las instrucciones del fabricante), detener con 50 µl de H_2SO_4 3 M, leer a una absorbancia de 490 nm. El tiempo de revelado es de ~ 10 minutos.

7.8 Procedimiento Biacore™ para el anticuerpo IL-13 vs IL-13 de longitud completa

Los análisis cinéticos se llevaron a cabo usando el procedimiento de

captura del anticuerpo. Brevemente, la proteína A se inmovilizó en un chip CM5 Biosensor por acoplamiento de la amina primaria según con los protocolos Biacore™ estándar. El anticuerpo candidato a continuación se pasó sobre la superficie de la proteína A, y se capturó. Una vez que se observó una señal de unión estable, IL-13 se pasó sobre la superficie del anticuerpo capturado a diversas concentraciones. Las curvas de unión posteriores se analizaron con el software de análisis de Biacore™ BIAeval 4.1 para determinar las cinéticas

7.8.1 Procedimiento Biacore™ para el anticuerpo IL-13 vs péptido

El análisis cinético se llevó a cabo usando la captura directa de los péptidos de IL-13. Brevemente, el péptido IL-13 biotinilado se captura usando un chip Biosensor estrepavidina. A continuación los anticuerpos se pasaron sobre la superficie del sensor a diversas concentraciones. Las curvas de unión posteriores se analizaron con el software de análisis de Biacore™ BIAeval 4.1 para determinar las cinéticas.

Tabla A

Descripción de la proteína o el polinucleótido (PN)	Identificador de secuencia (ID SEC Nº:)
6A1, CDRH1	1
6A1, CDRH2	2
6A1, CDRH3	3
6A1, CDRL1	4
6A1, CDRL2	5
6A1, CDRL3	6
6A1, VH (murino)	7

6A1, VL (murino)	8
hIL-13	9
hIL-13 (PN)	10
6A1, VH, construcción humanizada A1	11
6A1, VH, construcción humanizada A2	12
6A1, VH, construcción humanizada A3	13
6A1, VH, construcción humanizada A4	14
6A1, VL, construcción humanizada L1	15
6A1, VL, construcción humanizada L2	16
6A1, cadena pesada, construcción humanizada A1	18
6A1, cadena pesada, construcción humanizada A2	19
6A1, cadena pesada, construcción humanizada A3	20
6A1, cadena pesada, construcción humanizada A4	21
6A1, cadena ligera, construcción humanizada L1	22
6A1, cadena ligera, construcción humanizada L2	23
6A1, PN que codifica ID SEC Nº: 7	24
6A1, PN que codifica ID SEC Nº: 8	25
6A1, PN que codifica ID SEC Nº: 11	26
6A1, PN que codifica ID SEC Nº: 12	27

6A1, PN que codifica ID SEC Nº: 13 28

6A1, PN que codifica ID SEC Nº: 14 29

6A1, PN que codifica ID SEC Nº: 15 30

6A1, PN que codifica ID SEC Nº: 16 31

6A1, PN que codifica ID SEC Nº: 18 32

6A1, PN que codifica ID SEC Nº: 19 33

6A1, PN que codifica ID SEC Nº: 20 34

6A1, PN que codifica ID SEC Nº: 21 35

6A1, PN que codifica ID SEC Nº: 22 36

6A1, PN que codifica ID SEC Nº: 23 37

LISTADO DE SECUENCIAS

ID SEC Nº: 1

FYIKDTYMH

ID SEC Nº: 2

TIDPANGNTKYVPKFQG

ID SEC Nº: 3

SIYDDYHYDDYYAMDY

ID SEC Nº: 4

RSSQNIVHINGNTYLE

ID SEC Nº: 5

KISDRFS

ID SEC Nº: 6

FQGSHVPWT

ID SEC Nº: 7

EIQLQQSVAELVRPGASVRLSCTASGFYIKDTYMHWVIQRPEQGLEWIGTI

DPANGNTKYVPKFQGKATITADTSSNTAYLRLSSLTSEDTAIYYCARSIYDD
YHYDDYYAMDYWGQGTSVTVSS.

ID SEC Nº: 8

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQNIVHINGNTYLEWYLQKPGQSPKL
LIYKISDRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPWT
FGGGTKLEIK.

ID SEC Nº: 9

GPVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALESLIN
VSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLLHLK
KLFREGRFN

ID SEC Nº: 10

GGCCCTGTGCCTCCCTCTACAGCCCTCAGGGAGCTCATTGAGGAGCTG
GTCAACATCACCCAGAACCAGAAGGCTCCGCTCTGCAATGGCAGCATG
GTATGGAGCATCAACCTGACAGCTGGCATGTACTGTGCAGCCCTGGAA
TCCCTGATCAACGTGTCAGGCTGCAGTGCCATCGAGAAGACCCAGAGG
ATGCTGAGCGGATTCTGCCCGCACAAGGTCTCAGCTGGGCAGTTTTCC
AGCTTGCATGTCCGAGACACCAAAATCGAGGTGGCCCAGTTTGTAAAG
GACCTGCTCTTACATTTAAAGAAACTTTTTCGCGAGGGACGGTTCAACT
GA

ID SEC Nº: 11

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWVRQAPGQGLEWM
GTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSI
YDDYHYDDYYAMDYWGQGTLVTVSS

ID SEC Nº: 12

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWVIQAPGQGLEWMG

TIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSIY

DDYHYDDYYAMDYWGQGTLVTVSS

ID SEC Nº: 13

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWVIQAPGQGLEWMG

TIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSIY

DDYHYDDYYAMDYWGQGTLVTVSS

ID SEC Nº: 14

QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGFYIKDTYMHWVIQAPGQGLEWMG

TIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADTSTSTAYMRLSSLRSEDTAVYYCARSIY

DDYHYDDYYAMDYWGQGTLVTVSS

ID SEC Nº: 15

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQNIVHINGNTYLEWYLQKPGQSPRLL

IYKISDRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADDVGIYYCFQGSHVPWTF

GQGTKLEIK

ID SEC Nº: 16

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQNIVHINGNTYLEWYLQKPGQSPRLL

IYKISDRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADDVGVYYCFQGSHVPWTF

GQGTKLEIK

ID SEC Nº: 17

MGWSCIILFLVATATGVHS

ID SEC Nº: 18

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWVRQAPGQGLEWM

GTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSI

YDDYHYDDYYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL

GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL

GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

ID SEC Nº: 19

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWVIQAPGQGLEWMG
TIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSIY
DDYHYDDYYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

ID SEC Nº: 20

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWVIQAPGQGLEWMG
TIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSIY
DDYHYDDYYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE

PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

ID SEC Nº: 21

QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGFYIKDTYMHWVIQAPGQGLEWMG
TIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADTSTSTAYMRLSSLRSEDTAVYYCARSIY
DDYHYDDYYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

ID SEC Nº: 22

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQNIVHINGNTYLEWYLQKPGQSPRLL
IYKISDRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADDVGIYYCFQGSHVPWTF
GQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC

ID SEC Nº: 23

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQNIVHINGNTYLEWYLQKPGQSPRLL
IYKISDRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADDVGVYYCFQGSHVPWTF
GQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ

GLSSPVTKSFNRGEC

ID SEC Nº: 24

GAAATTCAGCTGCAGCAGTCTGTGGCAGAACTTGTGAGGCCAGGGGCC
TCAGTCAGGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCTACATTAAAGACACCT
ATATGCACTGGGTGATTCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTG
GAACGATTGATCCTGCGAATGGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCCA
GGGCAAGGCCACTATAACTGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCT
GCGGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCATCTATTACTGTGC
TAGAAGCATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTATGCTATGGACT
ACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

ID SEC Nº: 25

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAG
ATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAACATTGTACATATTAAT
GGAAACACCTATTTAGAATGGTACCTTCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAA
AGCTCCTGATCTACAAAATTTCCGACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAG
GTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACGCTCAAGATCAGCAG
AGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTCACAT
GTTCCGTGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

ID SEC Nº: 26

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTC
CTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATTCTACATTAAAGACACC
TATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATG
GGAACGATTGATCCTGCGAATGGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCC
AGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACA
TGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTG

CGAGAAGCATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTATGCTATGGA

CTACTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAGTCTCCTCA

ID SEC Nº: 27

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCC

TCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATTCTACATTAAAGACACCTA

TATGCACTGGGTGATACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGG

AACGATTGATCCTGCGAATGGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCCAGG

GCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGG

AGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGA

GAAGCATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTATGCTATGGACTAC

TGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAGTCTCCTCA

ID SEC Nº: 28

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTC

CTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATTCTACATTAAAGACACC

TATATGCACTGGGTGATACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATG

GGAACGATTGATCCTGCGAATGGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCC

AGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACACATCCACGAGCACAGCCTACA

TGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTG

CGAGAAGCATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTATGCTATGGA

CTACTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAGTCTCCTCA

ID SEC Nº: 29

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTC

CTCGGTGAGGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATTCTACATTAAAGACACC

TATATGCACTGGGTGATACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATG

GGAACGATTGATCCTGCGAATGGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCC

AGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACACATCCACGAGCACAGCCTACA
TGAGGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTG
CGAGAAGCATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTATGCTATGGA
CTACTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAGTCTCCTCA

ID SEC Nº: 30

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAG
AGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGATCTAGTCAGAACATTGTACATATTAA
TGGAAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCA
CGGCTCTTGATCTATAAAATTTCCGACCGATTTTCTGGGGTCCCTGACA
GGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACATTGAAAATCAGCAG
AGTGGAGGCTGACGATGTTGGAATTTATTACTGCTTTCAAGGTTCACAT
GTTCCGTGGACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAG

ID SEC Nº: 31

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAG
AGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGATCTAGTCAGAACATTGTACATATTAA
TGGAAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCA
CGGCTCTTGATCTATAAAATTTCCGACCGATTTTCTGGGGTCCCTGACA
GGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACATTGAAAATCAGCAG
AGTGGAGGCTGACGATGTTGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTCACAT
GTTCCGTGGACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAG.

ID SEC Nº: 32

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTC
CTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATTCTACATTAAAGACACC
TATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATG
GGAACGATTGATCCTGCGAATGGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCC

AGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACA

TGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTG

CGAGAAGCATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTATGCTATGGA

CTACTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAA

GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG

GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAC

CGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC

ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC

GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC

AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAG

CCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTG

AACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGG

ACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGG

ACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG

GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC

AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGAC

TGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC

CCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA

GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAG

AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC

ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA

GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAG

CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC

ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG

CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

ID SEC Nº: 33

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTC
CTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATTCTACATTAAAGACACC
TATATGCACTGGGTGATACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATG
GGAACGATTGATCCTGCGAATGGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCC
AGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACA
TGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTG
CGAGAAGCATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTATGCTATGGA
CTACTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAA
GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG
GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAC
CGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC
ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC
AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAG
CCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTG
AACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGG
ACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGG
ACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG
GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC
AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGAC
TGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC
CCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA
GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAG
AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC

ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA

GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAG

CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC

ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG

CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

ID SEC Nº: 34

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTC

CTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATTCTACATTAAAGACACC

TATATGCACTGGGTGATACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATG

GGAACGATTGATCCTGCGAATGGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCC

AGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACACATCCACGAGCACAGCCTACA

TGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTG

CGAGAAGCATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTATGCTATGGA

CTACTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAA

GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG

GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAC

CGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC

ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC

GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC

AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAG

CCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTG

AACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGG

ACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGG

ACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG

GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC

AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGAC
TGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC
CCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA
GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAG
AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC
ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA
GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAG
CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC
ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG
CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

ID SEC Nº: 35

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTC
CTCGGTGAGGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATTCTACATTAAAGACACC
TATATGCACTGGGTGATACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATG
GGAACGATTGATCCTGCGAATGGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCC
AGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACACATCCACGAGCACAGCCTACA
TGAGGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTG
CGAGAAGCATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTATGCTATGGA
CTACTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAA
GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG
GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAC
CGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC
ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC
AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAG

CCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTG

AACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGG

ACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGG

ACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG

GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC

AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGAC

TGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC

CCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA

GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAG

AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC

ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA

GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAG

CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC

ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG

CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

<u>ID SEC Nº: 36</u>

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAG

AGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGATCTAGTCAGAACATTGTACATATTAA

TGGAAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCA

CGGCTCTTGATCTATAAAATTTCCGACCGATTTTCTGGGGTCCCTGAÇA

GGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACATTGAAAATCAGCAG

AGTGGAGGCTGACGATGTTGGAATTTATTACTGCTTTCAAGGTTCACAT

GTTCCGTGGACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACG

GTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGA

AATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAG

AGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTCCAATCGGGTAA

CTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAG

CCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA

AGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAC

AAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

ID SEC Nº: 37

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAG

AGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGATCTAGTCAGAACATTGTACATATTAA

TGGAAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCA

CGGCTCTTGATCTATAAAATTTCCGACCGATTTTCTGGGGTCCCTGACA

GGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACATTGAAAATCAGCAG

AGTGGAGGCTGACGATGTTGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTCACAT

GTTCCGTGGACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACG

GTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGA

AATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAG

AGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTCCAATCGGGTAA

CTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAG

CCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA

AGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAC

AAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

ID SEC Nº: 38

SGSGPSTALRELIEELVNIT

ID SEC Nº: 39

SGSGLRELIEELVNITQNQK

ID SEC Nº: 40

SGSGIEELVNITQNQKAPLC

ID SEC Nº: 41

SGSGVNITQNQKAPLCNGSM

ID SEC Nº: 42

SGSGQNQKAPLCNGSMVWSI

ID SEC Nº: 43

SGSGAPLCNGSMVWSINLTA

ID SEC Nº: 44

SGSGNGSMVWSINLTAGMYC

ID SEC Nº: 45

SGSGVWSINLTAGMYCAALE

ID SEC Nº: 46

SGSGNLTAGMYCAALESLIN

ID SEC Nº: 47

SGSGGMYCAALESLINVSGC

ID SEC Nº: 48

SGSGAALESLINVSGCSAIE

ID SEC Nº: 49

SGSGSLINVSGCSAIEKTQR

ID SEC Nº: 50

SGSGVSGCSAIEKTQRMLSG

ID SEC Nº: 51

SGSGSAIEKTQRMLSGFCPH

ID SEC Nº: 52

SGSGKTQRMLSGFCPHKVSA

ID SEC Nº: 53

SGSGMLSGFCPHKVSAGQFS

ID SEC Nº: 54

SGSGFCPHKVSAGQFSSLHV

ID SEC Nº: 55

SGSGKVSAGQFSSLHVRDTK

ID SEC Nº: 56

SGSGGQFSSLHVRDTKIEVA

ID SEC Nº: 57

SGSGSLHVRDTKIEVAQFVK

ID SEC Nº: 58

SGSGRDTKIEVAQFVKDLLL

ID SEC Nº: 59

SGSGIEVAQFVKDLLLHLKK

ID SEC Nº: 60

SGSGQFVKDLLLHLKKLFRE

ID SEC Nº: 61

SGSGDLLLHLKKLFREGRFN

ID SEC Nº: 62

SGSGPSTALKELIEELVNIT

ID SEC Nº: 63

SGSGLKELIEELVNITQNQK

ID SEC Nº: 64

SGSGNGSMVWSINLTAGVYC

ID SEC Nº: 65

SGSGVWSINLTAGVYCAALE

ID SEC Nº: 66

SGSGNLTAGVYCAALESLIN

ID SEC Nº: 67

SGSGGVYCAALESLINVSGC

ID SEC Nº: 68

SGSGVSGCSAIEKTQRMLNG

ID SEC Nº: 69

SGSGSAIEKTQRMLNGFCPH

ID SEC Nº: 70

SGSGKTQRMLNGFCPHKVSA

ID SEC Nº: 71

SGSGMLNGFCPHKVSAGQFS

ID SEC Nº: 72

SGSGFCPHKVSAGQFSSLRV

ID SEC Nº: 73

SGSGKVSAGQFSSLRVRDTK

ID SEC Nº: 74

SGSGGQFSSLRVRDTKIEVA

ID SEC Nº: 75

SGSGSLRVRDTKIEVAQFVK

ID SEC Nº: 76

SGSGRDTKIEVAQFVKDLLV

ID SEC Nº: 77

SGSGIEVAQFVKDLLVHLKK

ID SEC Nº: 78

SGSGQFVKDLLVHLKKLFRE

ID SEC Nº: 79

SGSGDLLVHLKKLFREGQFN

ID SEC Nº: 80

QFVKDLLLHLKKLFRE

ID SEC Nº: 81

DLLLHLKKLFREGRFN

ID SEC Nº: 82

QFVKDLLVHLKKLFRE

ID SEC Nº: 83

DLLVHLKKLFREGQFN

ID SEC Nº: 84

DLLLHLKKLFRE

ID SEC Nº: 85

DLLVHLKKLFRE

ID SEC Nº: 86

GATGAAGCTTGCCACCATGAAATGCAGCTGGGTCATC

ID SEC Nº: 87

GATGGACTAGTGTTCCTTGACCCCAGTA

ID SEC Nº: 88

GATGAAGCTTGCCACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTG

ID SEC Nº: 89

GATGCGTACGTTTGATTTCCAGCTTGGTGCC

ID SEC Nº: 90

SPVPPSTALKELIEELVNITQNQKAPLCN

GSMVWSINLTAGVYCAALESLINVSGCSA

IEKTQRMLNGFCPHKVSAGQFSSLRVRDT

KIEVAQFVKDLLVHLKKLFREGQFN

ID SEC Nº: 91

AGCCCTGTGCCTCCCTCTACAGCCCTCAAGGAGCTCATTGAGGAGCTG

GTCAACATCACCCAGAACCAGAAGGCCCCGCTCTGCAATGGCAGCATG

GTGTGGAGCATCAACCTGACAGCTGGCGTGTACTGTGCAGCCCTGGAA

TCCCTGATCAACGTGTCAGGCTGCAGTGCCATCGAGAAGACCCAGAGG

ATGCTGAACGGATTCTGCCCGCACAAGGTCTCAGCTGGGCAGTTTTCC

AGCTTGCGTGTCCGAGACACCAAAATCGAGGTGGCCCAGTTTGTAAAG

GACCTGCTCGTACATTTAAAGAAACTTTTTCGCGAGGGACAGTTCAACT

GA

ID SEC Nº: 92

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWVRQAPGQGLEWM

GTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSI

YDDYHYDDYYAMDYWGQGTLVTVSSG

ID SEC Nº: 93

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQNIVHINGNTYLEWYLQKPGQSPRLL

IYKISDRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADDVGIYYCFQGSHVPWTF

GQGTKLEIK

ID SEC Nº: 94

SGSGKDLLLHLKKLFREG

ID SEC Nº: 95

SGSGDLLLHLKKLFREG

ID SEC Nº: 96

SGSGLLLHLKKLFREG

ID SEC Nº: 97

SGSGLLHLKKLFREG

ID SEC Nº: 98

SGSGLHLKKLFREG

ID SEC Nº: 99

SGSGHLKKLFREG

ID SEC Nº: 100

SGSGLKKLFREG

ID SEC Nº: 101

SGSGKKLFREG

ID SEC Nº: 102

SGSGKLFREG

ID SEC Nº: 103

SGSGLFREG

ID SEC Nº: 104

SGSGFREG

ID SEC Nº: 105

SGSGKDLLLHLKKLFRE

ID SEC Nº: 106

SGSGKDLLLHLKKLFR

ID SEC Nº: 107

SGSGKDLLLHLKKLF

ID SEC Nº: 108

SGSGKDLLLHLKKL

ID SEC Nº: 109

SGSGKDLLLHLKK

ID SEC Nº: 110

SGSGKDLLLHLK

ID SEC Nº: 111

SGSGKDLLLHL

ID SEC Nº: 112

SGSGKDLLLH

ID SEC Nº: 113

SGSGKDLLL

ID SEC Nº: 114

SGSGKDLL

ID SEC Nº: 115

SGSGKDLLVHLKKLFREG

ID SEC Nº: 116

SGSGDLLVHLKKLFREG

ID SEC Nº: 117

SGSGLLVHLKKLFREG

ID SEC Nº: 118

SGSGLVHLKKLFREG

ID SEC Nº: 119

SGSGVHLKKLFREG

ID SEC Nº: 120

SGSGKDLLVHLKKLFRE

ID SEC Nº: 121

SGSGKDLLVHLKKLFR

ID SEC Nº: 122

SGSGKDLLVHLKKLF

ID SEC Nº: 123

SGSGKDLLVHLKKL

ID SEC Nº: 124

SGSGKDLLVHLKK

ID SEC Nº: 125

SGSGKDLLVHLK

ID SEC Nº: 126

SGSGKDLLVHL

ID SEC Nº: 127

SGSGKDLLVH

ID SEC Nº: 128

SGSGKDLLV

ID SEC Nº: 129

QFVKDLLLHLKKLFREGRFN

ID SEC Nº: 130

QFVKDLLLHAKKLFREGRFN

ID SEC Nº: 131

QFVKDLLLHLAKLFREGRFN

ID SEC Nº: 132

QFVKDLLLHLKALFREGRFN

ID SEC Nº: 133

QFVKDLLLHLKKAFREGRFN

ID SEC Nº: 134

QFVKDLLLHLKKLAREGRFN

ID SEC Nº: 135

QFVKDLLLHLKKLFAEGRFN

ID SEC Nº: 136

QFVKDLLLHLKKLFRAGRFN

Habiendo descrito la invención como antecede se declara como propiedad lo contenido en las siguientes

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a hIL-13 y neutraliza su actividad.

2. Un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a hIL-13 y modula (por ejemplo, inhibe o bloquea) la interacción entre hIL-13 y hIL-13R.

3. Un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a hIL-13 y modula la interacción entre hIL-13 y hIL-13R y comprende la siguiente CDRH3: ID SEC Nº: 3.

4. Un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a hIL-13 y modula la interacción entre hIL-13 y hIL-13R cuyo anticuerpo o fragmento del mismo comprende las siguientes CDR:

CDRH1: ID SEC Nº: 1

CDRH2: ID SEC Nº: 2

CDRH3: ID SEC Nº: 3

CDRL1: ID SEC Nº: 4

CDRL2: ID SEC Nº: 5

CDRL3: ID SEC Nº: 6

5. Un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente al epítopo definido en ID SEC Nº: 84 de ID SEC Nº: 9 y modula la interacción entre hIL-13 y hIL-13R.

6. Un anticuerpo terapéutico o el fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 5 en el que el anticuerpo se une entre los residuos 103 y 107 inclusive de ID SEC Nº: 9.

7. Un anticuerpo terapéutico o el fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 6 en el que la unión del anticuerpo con la hIL-13 depende de la presencia de un residuo arginina en la posición 107 de ID SEC Nº: 9.

8. Un anticuerpo terapéutico o el fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 7 en el que la sustitución del residuo arginina en la posición 107 de ID SEC Nº: 9 con un residuo alanina conduce sustancialmente a la pérdida completa de la unión entre dicho anticuerpo y la hIL-13.

9. Un anticuerpo terapéutico o el fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el anticuerpo es un anticuerpo intacto.

10. Un anticuerpo terapéutico o el fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 9 en el que el anticuerpo es de rata, ratón, primate (por ejemplo, macaco, mono del viejo mundo o gran simio) o humano.

11. Un anticuerpo terapéutico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o quimérico.

12. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 en el que el anticuerpo comprende una región constante humana.

13. El anticuerpo de la reivindicación 12 en el que el anticuerpo comprende una región constante del isotipo IgG.

14. El anticuerpo de la reivindicación 13 en el que el anticuerpo es IgG1 o IgG4.

15. Un anticuerpo murino de la reivindicación 10 que comprende un dominio VH de ID SEC Nº: 7 y un dominio VL de ID SEC Nº: 8.

16. Un anticuerpo humanizado de la reivindicación 11 que comprende un dominio VH de ID SEC Nº: 11 y un dominio VL de ID SEC Nº: 15.

17. Un anticuerpo humanizado de la reivindicación 11 que comprende un dominio VH de ID SEC Nº: 12 y un dominio VL de ID SEC Nº: 15.

18. Un anticuerpo humanizado de la reivindicación 11 que comprende un dominio VH de ID SEC Nº: 13 y un dominio VL de ID SEC Nº: 15.

19. Un anticuerpo humanizado de la reivindicación 11 que comprende un dominio VH de ID SEC Nº: 14 y un dominio VL de ID SEC Nº: 15.

20. Un anticuerpo humanizado de la reivindicación 11 que comprende un dominio VH de ID SEC Nº: 11 y un dominio VL de ID SEC Nº: 16.

21. Un anticuerpo humanizado de la reivindicación 11 que comprende un dominio VH de ID SEC Nº: 12 y un dominio VL de ID SEC Nº: 16.

22. Un anticuerpo humanizado de la reivindicación 11 que comprende un dominio VH de ID SEC Nº: 13 y un dominio VL de ID SEC Nº: 16.

23. Un anticuerpo humanizado de la reivindicación 11 que comprende un dominio VH de ID SEC Nº: 14 y un dominio VL de ID SEC Nº: 16.

24. Un anticuerpo humanizado de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23 que adicionalmente comprende una región constante de un isotipo IgG (por ejemplo, IgG1 o IgG4).

25. Un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada de ID SEC Nº: 18 y una cadena ligera de ID SEC Nº: 22.

26. Un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada de ID SEC Nº: 19 y una cadena ligera de ID SEC Nº: 22.

27. Un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada de ID SEC Nº: 20 y una cadena ligera de ID SEC Nº: 22.

28. Un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada de ID SEC Nº: 21 y una cadena ligera de ID SEC Nº: 22.

29. Un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada de ID SEC Nº: 18 y una cadena ligera de ID SEC Nº: 23.

30. Un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada de ID SEC Nº: 19 y una cadena ligera de ID SEC Nº: 23.

31. Un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada de ID SEC Nº: 20 y una cadena ligera de ID SEC Nº: 23.

32. Un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada de ID SEC Nº: 21 y una cadena ligera de ID SEC Nº: 23.

33. Un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a hIL-13 en el que dicho anticuerpo o fragmento del mismo comprende la CDRH3 (ID SEC Nº: 3) que además comprende opcionalmente las CDR de ID SEC Nº: 1, 2, 4, 5 y 6, en las que los residuos seleccionados del grupo constituido por 19, 38, 73 y 81 de la región marco de la cadena pesada aceptora humana y el residuo en la posición 85 del marco de la cadena ligera aceptora humana se sustituyen

por los residuos correspondientes encontrados en el marco del anticuerpo donador del cual se deriva la CDRH3.

34. Un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a hIL-13 en el que dicho anticuerpo o fragmento del mismo comprende la CDRH3 (ID SEC Nº: 3) que además comprende opcionalmente las CDR de ID SEC Nº: 1, 2, 4, 5 y 6 en el que el marco de la cadena pesada humana comprende uno o más (por ejemplo, todos) de los siguientes residuos (o uno de sus sustitutos conservativos):

Posición	Residuo
39	I
20	R
74	T
81	R

y la cadena ligera comprende

Posición	Residuo
85	V

35. Un fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el fragmento es un Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, dianticuerpo, trianticuerpo, tetranticuerpo, minianticuerpo, minicuerpo, VH, VL.

36. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14

que comprende una región Fc mutada tal que dicho anticuerpo tiene una ADCC y/o una activación del complemento reducidas.

37. Un anticuerpo terapéutico que inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes a la hIL-13.

38. Una célula hospedadora transformada o transfectada recombinante que comprende un primer y un segundo vector, comprendiendo dicho primer vector un polinucleótido que codifica una cadena pesada de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes y comprendiendo dicho segundo vector un polinucleótido que codifica una cadena ligera de cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

39. La célula hospedadora de la reivindicación 38 en la que el primer vector comprende un polinucleótido de ID SEC Nº: 7 y un segundo vector comprende un polinucleótido de ID SEC Nº: 8.

40. La célula hospedadora de la reivindicación 38 en la que el primer vector comprende un polinucleótido seleccionado del grupo constituido por ID SEC Nº: 26, ID SEC Nº: 27, ID SEC Nº: 28, ID SEC Nº: 29, ID SEC Nº: 32, ID SEC Nº: 33, ID SEC Nº: 34, ID SEC Nº: 35 y un segundo vector que comprende un polinucleótido seleccionado del grupo constituido por: ID SEC Nº: 15, ID SEC Nº: 16. ID SEC Nº: 36, ID SEC Nº: 37.

41. La célula hospedadora de una cualquiera de las reivindicaciones 38 a

40 en la que la célula es eucariota.

42. La célula hospedadora de la reivindicación 42 en la que la célula es de mamífero.

43. La célula hospedadora de la reivindicación 41 ó 42 en la que la célula es CHO o NS0.

44. Un procedimiento para la producción de un anticuerpo terapéutico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 37 cuyo procedimiento comprende la etapa de cultivo de una célula hospedadora de una cualquiera de las reivindicaciones 38 a 43 en un medio de cultivo sin suero.

45. El procedimiento de la reivindicación 44 en el que dicho anticuerpo se secreta por dicha célula hospedadora en dicho medio de cultivo.

46. El procedimiento de la reivindicación 45 en el que dicho anticuerpo se purifica adicionalmente hasta al menos el 95% o más, respecto al dicho anticuerpo contenido en el medio de cultivo.

47. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 37 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

48. Un kit de partes que comprende la composición de la reivindicación

47 junto con instrucciones para su uso.

49. Un procedimiento para el tratamiento de un paciente humano afectado de asma cuyo procedimiento comprende la etapa de administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo terapéutico de 1 a 37.

50. El procedimiento de la reivindicación 49 en el que dicho paciente está afectado de asma alérgica.

51. El procedimiento de la reivindicación 49 en el que el paciente está afectado de asma grave.

52. El procedimiento de la reivindicación 49 en el que el paciente está afectado de asma difícil.

53. El procedimiento de la reivindicación 49 en el que el paciente está afectado de asma inestable.

54. El procedimiento de la reivindicación 49 en el que el paciente está afectado de asma nocturna, asma premenstrual, asma resistente a esteroides, asma dependiente de esteroides, asma inducida por aspirina, asma de inicio en el adulto, asma pediátrica.

55. Un procedimiento para el tratamiento de un paciente humano

afectado de una afección asmática que no responde al tratamiento con corticoesteroides cuyo procedimiento comprende la etapa de administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 37.

56. Un procedimiento para la prevención de ataques asmáticos agudos en un paciente humano cuyo procedimiento comprende la etapa de administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de las reivindicaciones 1 a 37.

57. Un procedimiento para la reducción de la frecuencia de y/o alivio de los efectos de ataques asmáticos agudos en un paciente humano cuyo procedimiento comprende la etapa de administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de las reivindicaciones 1 a 37.

58. Un procedimiento para el tratamiento de un paciente humano afectado de una enfermedad o trastorno seleccionados del grupo constituido por dermatitis atópica, rinitis alérgica, enfermedad de Crohn, EPOC, enfermedades o trastornos fibróticos tales como fibrosis pulmonar idiopática, esclerosis sistémica progresiva, fibrosis hepática, granulomas hepáticos, esquistosomiasis, leismaniasis, y enfermedades de la regulación del ciclo celular tal como enfermedad de Hodgkin, leucemia linfocítica crónica de las células B.

59. Uso de un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 37 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno seleccionados del grupo constituido por: asma alérgica, asma grave, asma difícil, asma inestable, asma nocturna, asma premenstrual, asma resistente a esteroides, asma dependiente de esteroides, asma inducida por aspirina, asma de inicio en el adulto, asma pediátrica, dermatitis atópica, rinitis alérgica, enfermedad de Crohn, EPOC, enfermedades o trastornos fibróticos tales como fibrosis pulmonar idiopática, esclerosis sistémica progresiva, fibrosis hepática, granulomas hepáticos, esquistosomiasis, leismaniasis, y enfermedades de la regulación del ciclo celular tal como enfermedad de Hodgkin, leucemia linfocítica crónica de las células B.

60. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 37 en el que el anticuerpo bloquea la unión entre hIL-13 y hIL-13R.

61. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 60 en el que el anticuerpo bloquea la unión entre hIL-13 y hIL-13R.

62. Un anticuerpo terapéutico que se une específicamente a hIL-13 y modula (por ejemplo, inhibe o bloquea) la interacción entre hIL-13 y hIL-13R cuyo anticuerpo se une al motivo KKLFR de ID SEC Nº: 9.

63. Un anticuerpo terapéutico que se une específicamente a hIL-13 y modula (por ejemplo, inhibe o bloquea) la interacción entre hIL-13 y hIL-13R y tiene una constante de disociación k_{off} en el intervalo de 1,4 x 10^{-4} a 8,22 x 10^{-5} s^{-1}.

64. El anticuerpo terapéutico de la reivindicación 63 que comprende una CDRH3 de ID SEC Nº: 3.

65. El anticuerpo terapéutico de la reivindicación 64 que comprende una CDRH1 de ID SEC Nº: 1, CDRH2 de ID SEC Nº: 2, CDRL1 de ID SEC Nº: 4, CDRL2 de ID SEC Nº: 5 y CDRL3 de ID SEC Nº: 6.

RESUMEN

La presente invención se refiere a inmunoglobulinas, particularmente anticuerpos que se unen específicamente a interleuquina 13 humana (hIL-13). Los anticuerpos de la invención se pueden usar en el tratamiento de una variedad de enfermedades o trastornos sensibles a la modulación de la interacción entre hIL-13 y el receptor para IL-13 humana. Tales enfermedades incluyen asma grave, dermatitis atópica, EPOC y diversas enfermedades fibróticas. También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden dichos anticuerpos y procedimientos de fabricación.

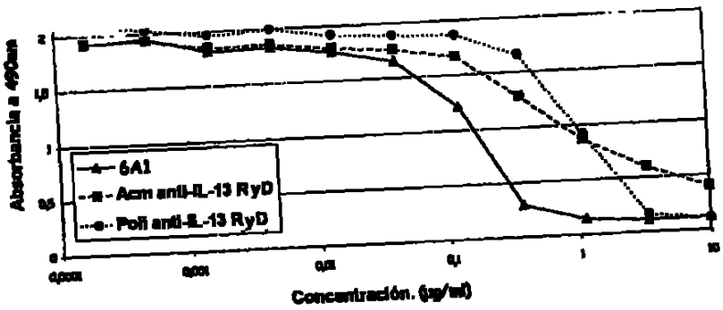

Absorbancia a 490nm
2
1,5
1
0,5
0
6A1
Acm anti-IL-13 RyD
Poli anti-IL-13 RyD
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
Concentración. (µg/ml)

Figura 1

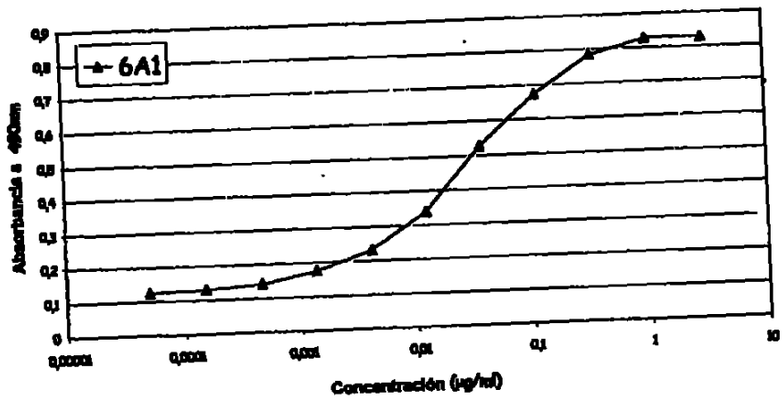

Absorbancia a 490nm
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
6A1
0,00001
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
Concentración (µg/ml)

Figura 2 a

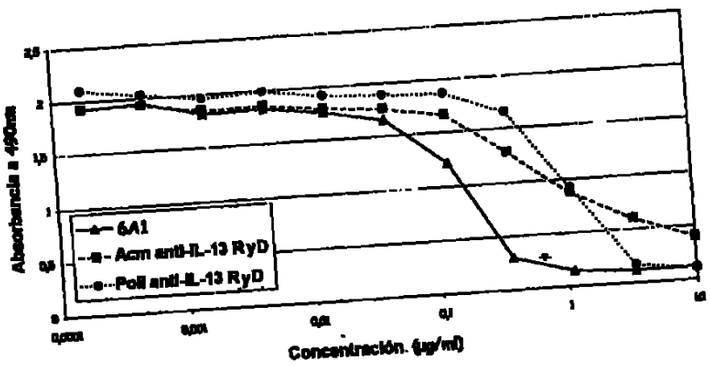

Absorbancia a 490nm
6A1
Acm anti-IL-13 RyD
Poli anti-IL-13 RyD
Concentración. (µg/ml)

Figura 2b

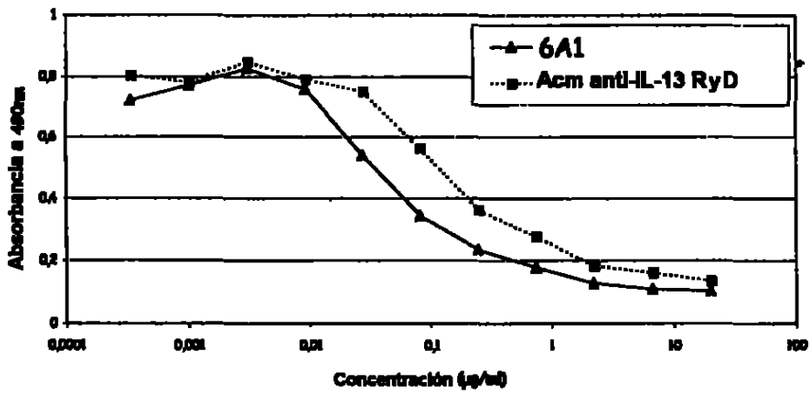

6A1
Acm anti-IL-13 RyD
Absorbancia a 490nm
Concentración (µg/ml)

Figura 3

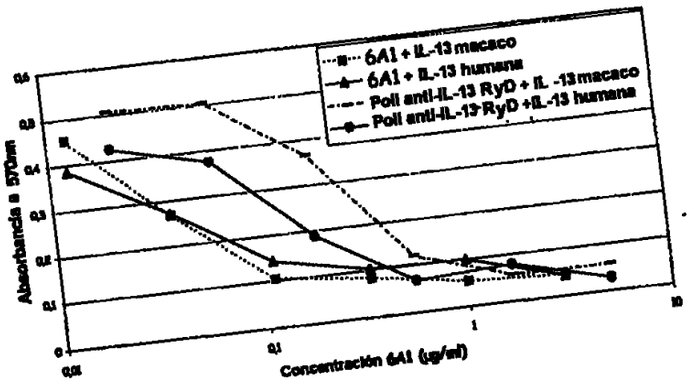
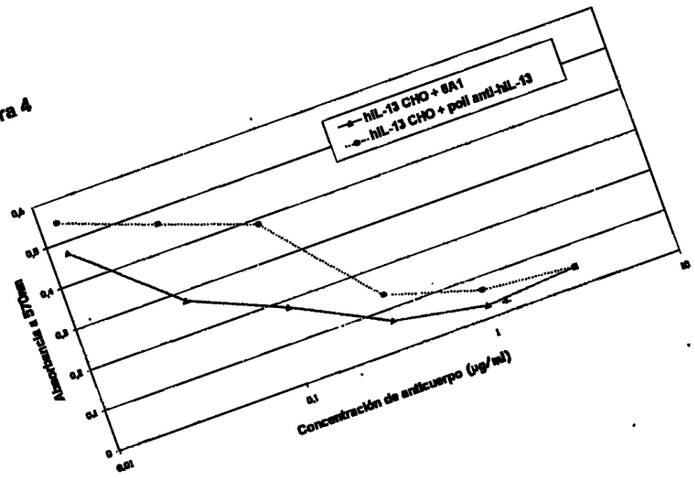

6A1 + IL-13 macaco
6A1 + IL-13 humana
Poli anti-IL-13 RyD + IL -13 macaco
Poli anti-IL-13 RyD +IL-13 humana
Absorbancia a 570nm
Concentración 6A1 (µg/ml)
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0.01
0.1
1
10

Figura 4


hIL-13 CHO + 6A1
hIL-13 CHO + poli anti-hIL-13
Absorbancia a 570nm
Concentración de anticuerpo (µg/ml)
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0,01
0,1
1
10

400

Figura 5

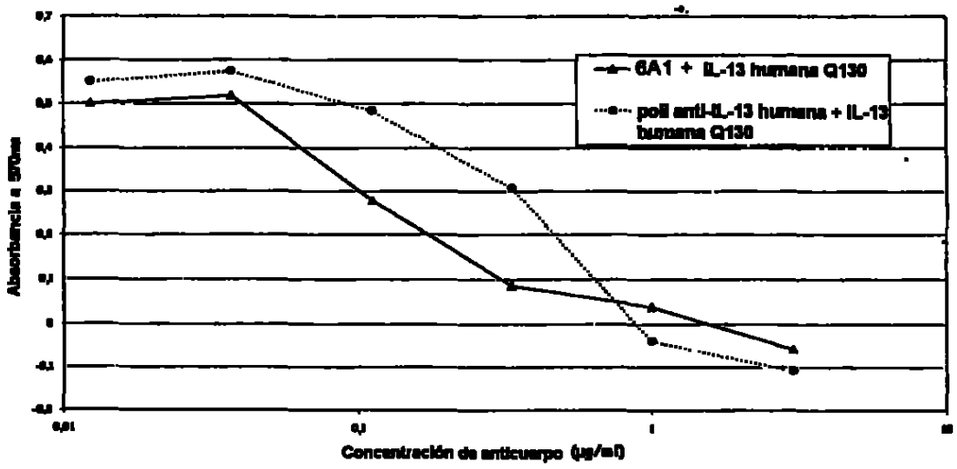

6A1 + IL-13 humana Q130
poli anti-IL-13 humana + IL-13 humana Q130
Concentración de anticuerpo (µg/ml)

Figura 6

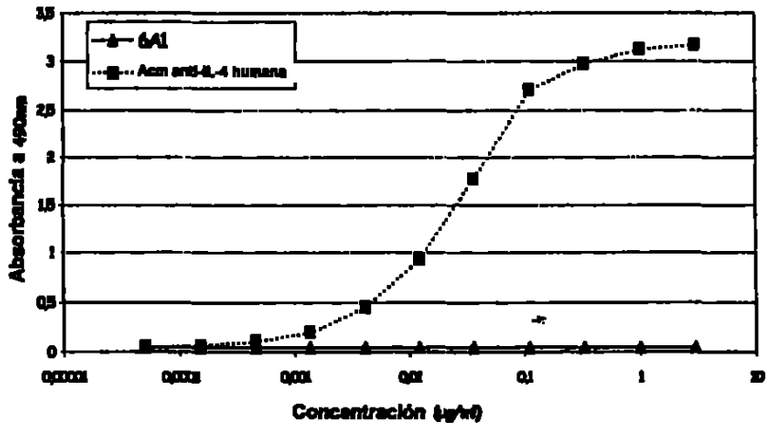

6A1
Acm anti-IL-4 humana
Absorbancia a 450nm
Concentración (µg/ml)

Figura 7

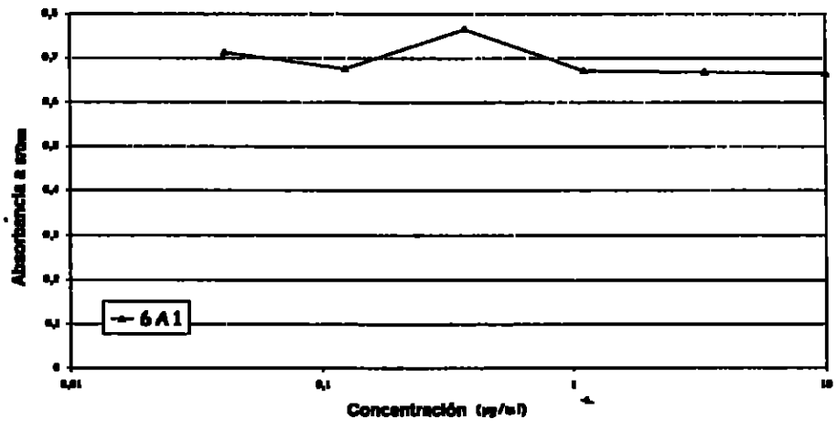
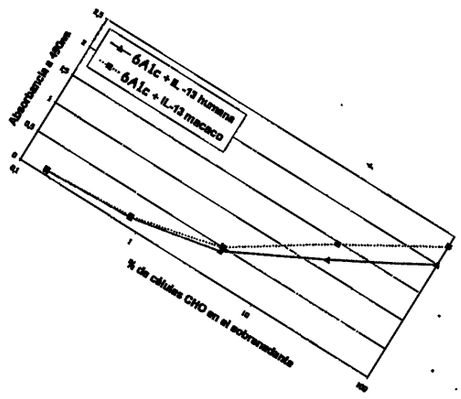


Figura 6


6A1c + IL-13 humana
6A1c + IL-13 macaco
Absorbancia a 450nm
% de células CHO en el sobrenadante

403

Figura 9

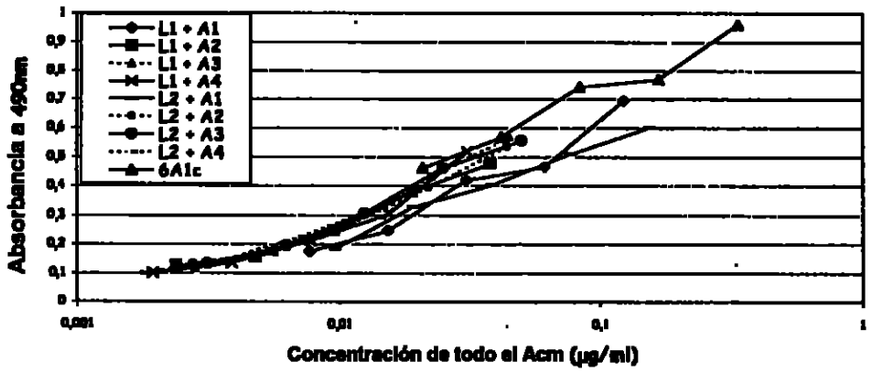
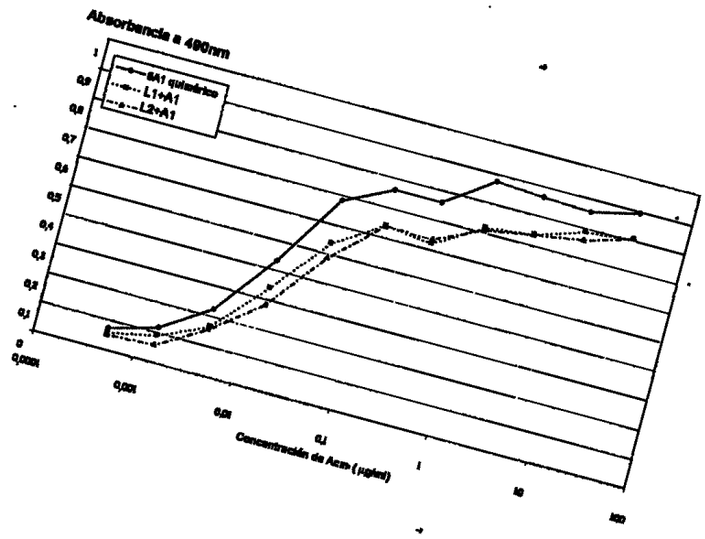

L1 + A1
L1 + A2
L1 + A3
L1 + A4
L2 + A1
L2 + A2
L2 + A3
L2 + A4
6A1c
Absorbancia a 490nm
0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
0,7
0,8
0,9
1
0,001
0,01
0,1
1
Concentración de todo el Acm (µg/ml)

Figura 10a


Absorbancia a 490nm
BA1 quimérico
L1+A1
L2+A1
1
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Concentración de Acm (ng/ml)

406

Figura 10b

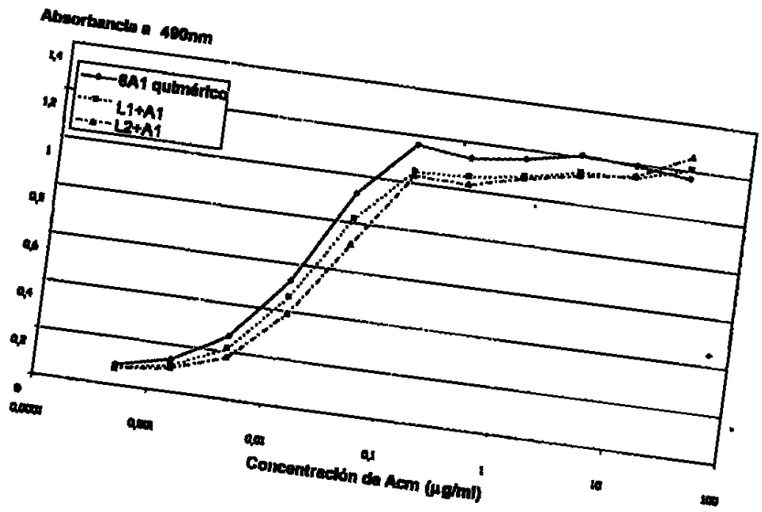


Figura 11

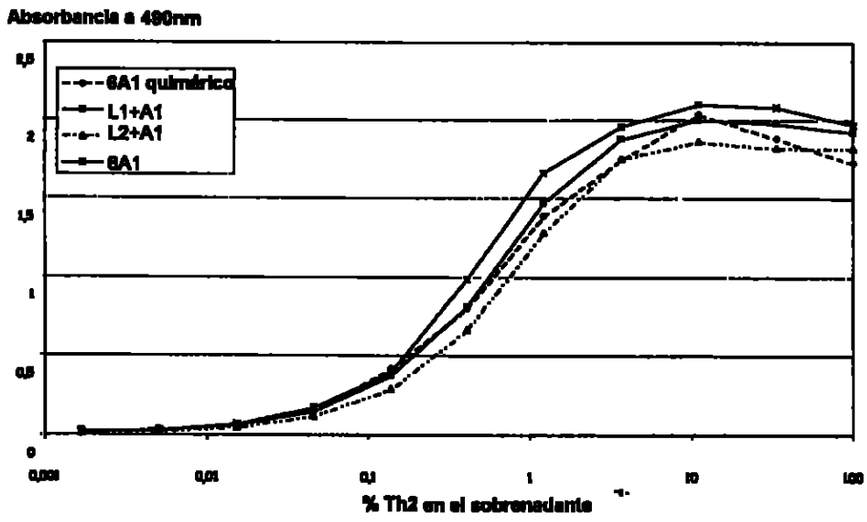

Absorbancia a 490nm
6A1 quimérico
L1+A1
L2+A1
6A1
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
% Th2 en el sobrenadante

Figura 12a

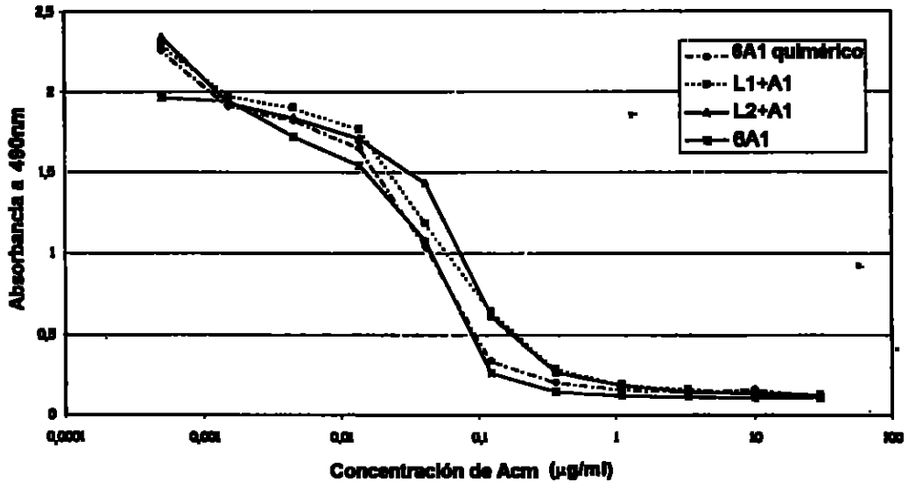

6A1 quimérico
L1+A1
L2+A1
6A1
Absorbancia a 490nm
Concentración de Acm (µg/ml)

Figura 12b

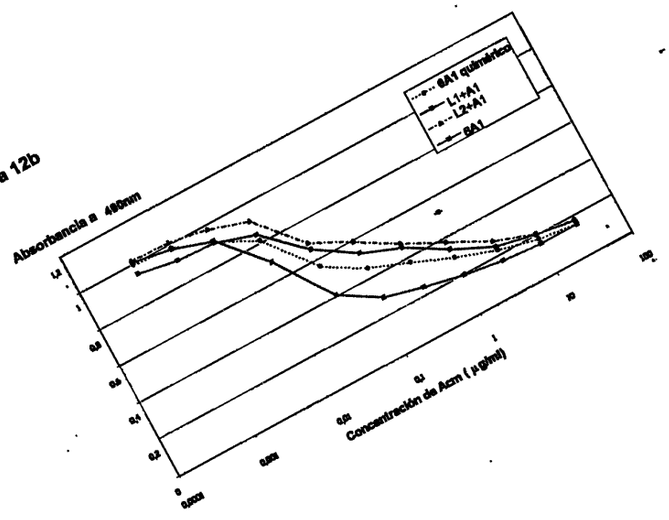

6A1 químérica
L1+A1
L2+A1
6A1
Absorbancia a 490nm
Concentración de Acm (µg/ml)

Figura 13a

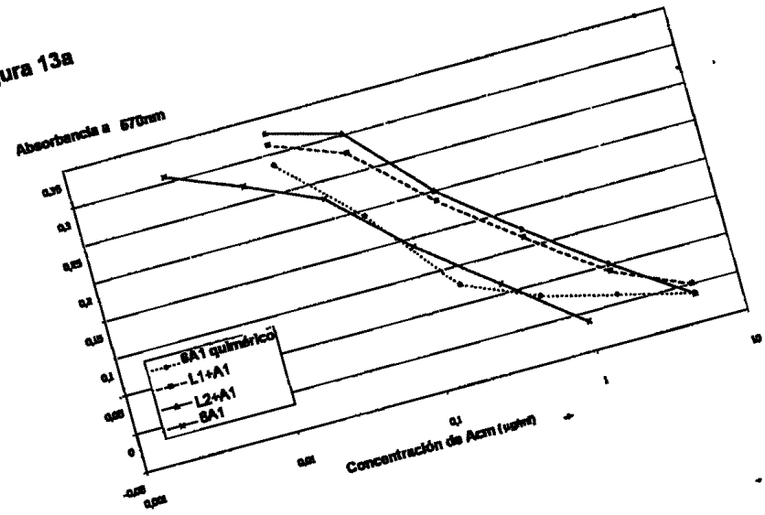
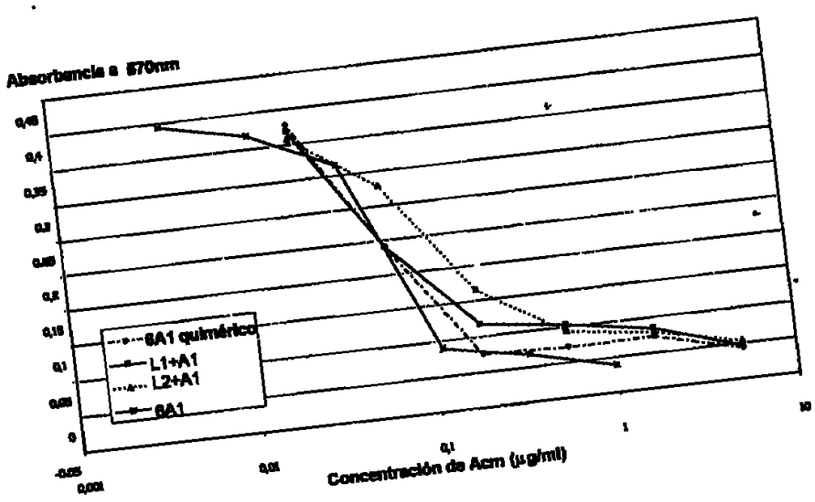

Absorbancia a 570nm
0,35
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
-0,05
0,01
0,1
1
10
Concentración de Acm (ug/ml)
6A1 químérico
L1+A1
L2+A1
6A1

Figura 13b


Absorbancia a 570nm
0,45
0,4
0,35
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
-0,05
0,001
0,01
0,1
1
10
Concentración de Acm (µg/ml)
6A1 químérico
L1+A1
L2+A1
6A1

412

Figura 13c

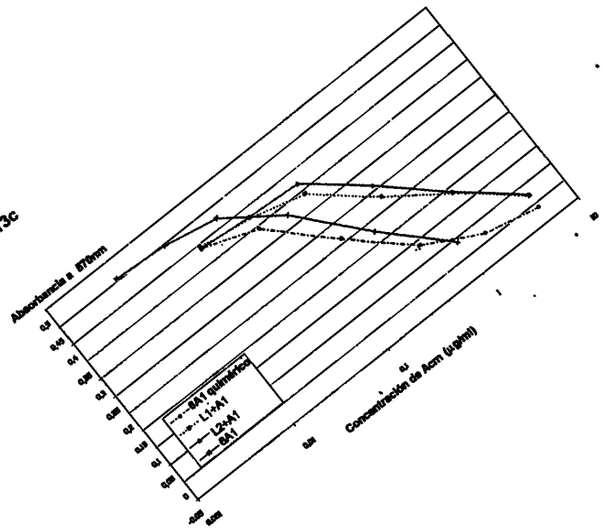


Figura 13d

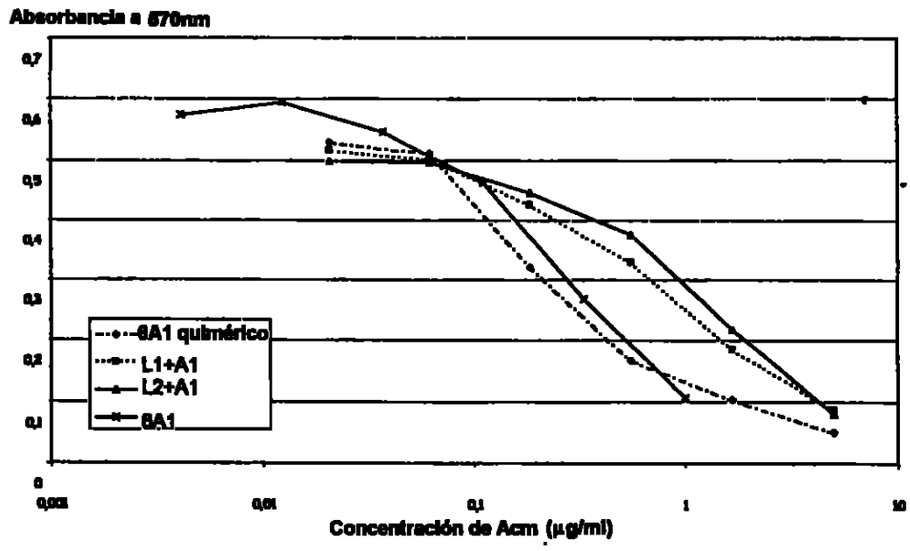

Absorbancia a 570nm
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0,001
0,01
0,1
1
10
6A1 quimérico
L1+A1
L2+A1
6A1
Concentración de Acm (µg/ml)

Figura 14a

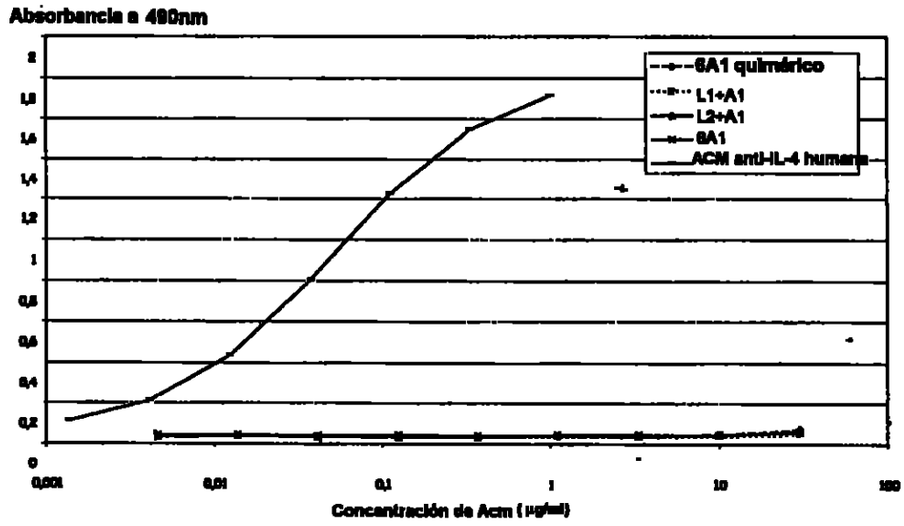

Absorbancia a 490nm
2
1,8
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Concentración de Acm (µg/ml)
6A1 quimérico
L1+A1
L2+A1
6A1
ACM anti-IL-4 humana

Figura 14b

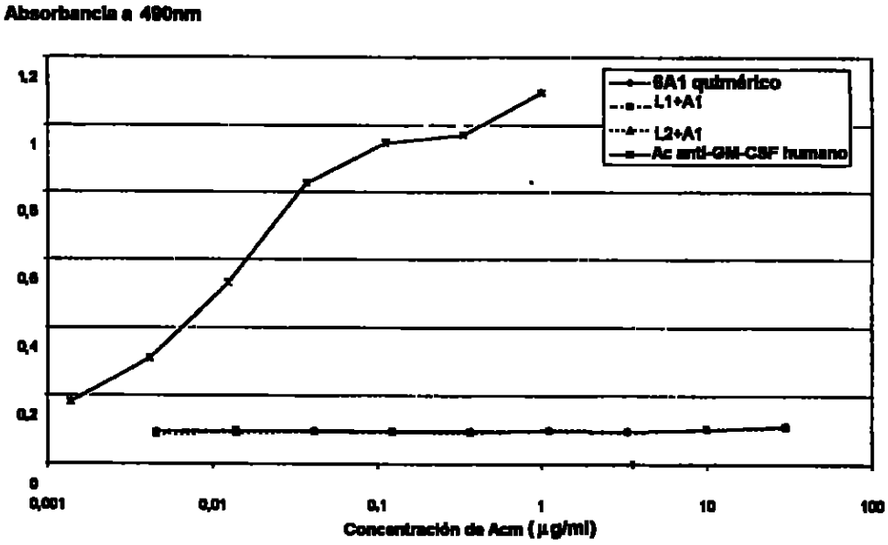

Absorbancia a 490nm
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Concentración de Acm (µg/ml)
SA1 quimérico
L1+A1
L2+A1
Ac anti-GM-CSF humano

Figura 14c

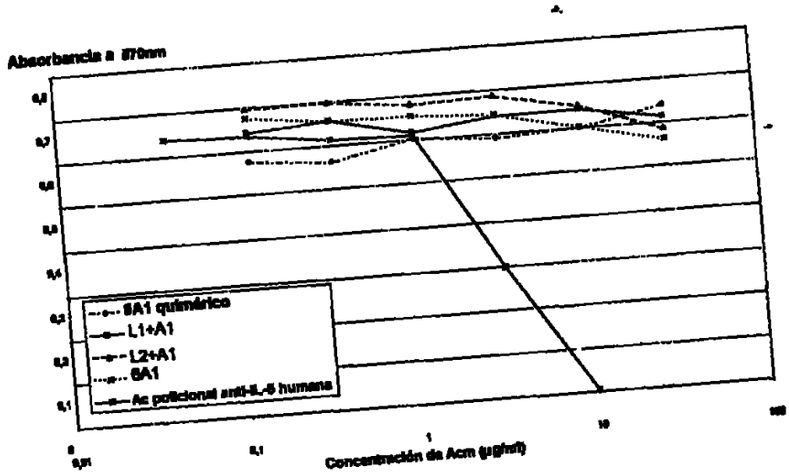

Absorbancia a 870nm
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0,01
0,1
1
10
100
Concentración de Acm (µg/ml)
8A1 químérico
L1+A1
L2+A1
8A1
Ac policlonal anti-IL-8 humana

Figura 15

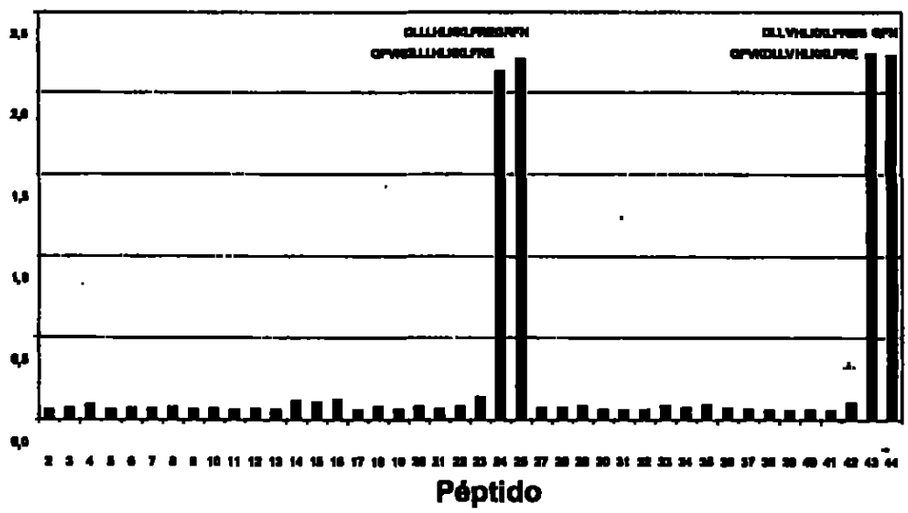


Figura 16a

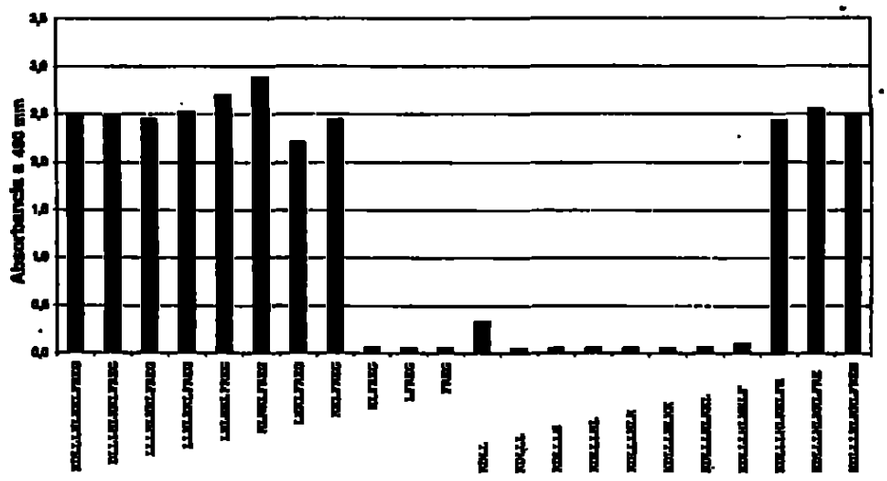


Figura 16b

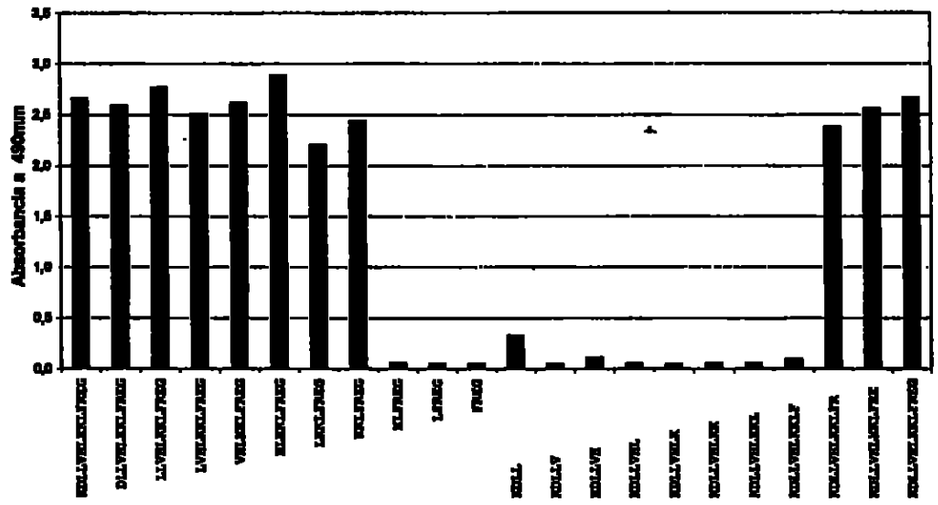


Figura 17a

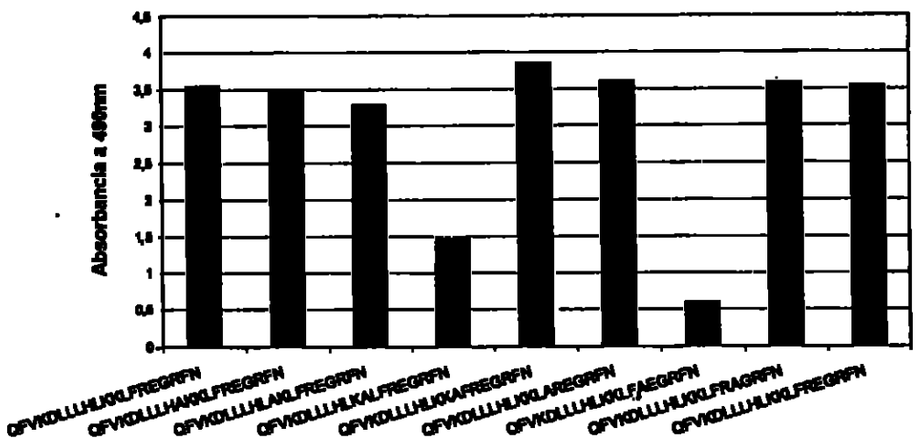

Absorbancia a 490nm
4,5
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
QFVKDLLLHLKKLFREGRFN
QFVKDLLLHAKKLFREGRFN
QFVKDLLLHLAKLFREGRFN
QFVKDLLLHLKALFREGRFN
QFVKDLLLHLKKAFREGRFN
QFVKDLLLHLKKLAREGRFN
QFVKDLLLHLKKLFAEGRFN
QFVKDLLLHLKKLFRAGRFN
QFVKDLLLHLKKLFREGRFN

Figura 17b

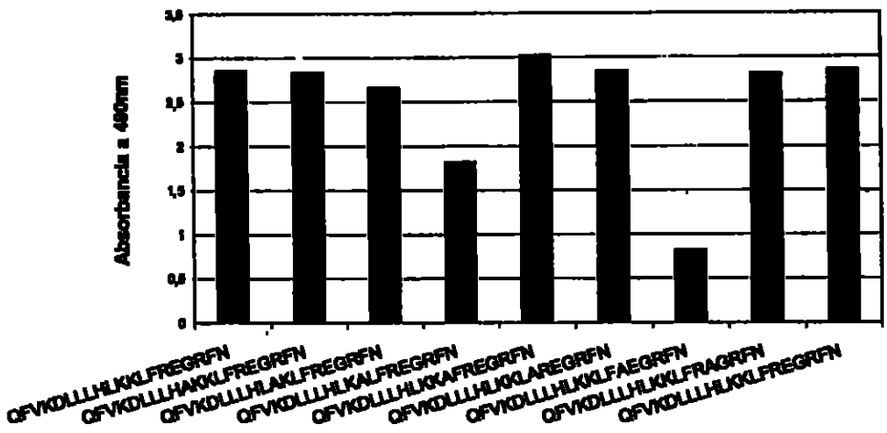

Absorbancia a 490nm
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
QFVKDLLLHLKKLFREGRFN
QFVKDLLLHAKKLFREGRFN
QFVKDLLLHLAKLFREGRFN
QFVKDLLLHLKALFREGRFN
QFVKDLLLHLKKAFREGRFN
QFVKDLLLHLKKLAREGRFN
QFVKDLLLHLKKLFAEGRFN
QFVKDLLLHLKKLFRAGRFN
QFVKDLLLHLKKLFREGRFN

Figura 17c

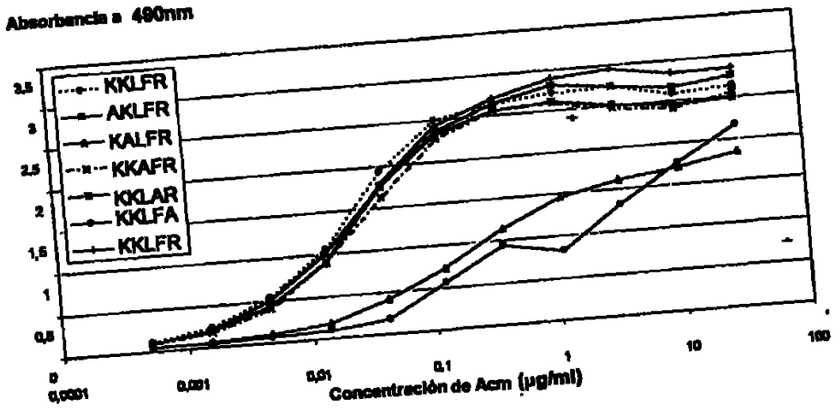
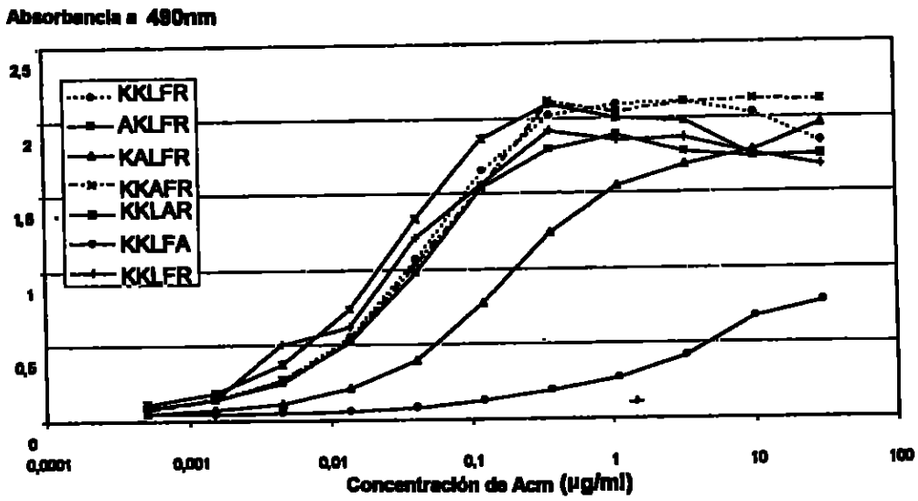

Absorbancia a 490nm
KKLFR
AKLFR
KALFR
KKAFR
KKLAR
KKLFA
KKLFR
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Concentración de Acm (µg/ml)

Figura 17d


Absorbancia a 490nm
2,5
2
1,5
1
0,5
0
KKLFR
AKLFR
KALFR
KKAFR
KKLAR
KKLFA
KKLFR
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Concentración de Acm (µg/ml)

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
12 January 2006 (12.01.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/003407 A3

4th
424

(51) International Patent Classification:
C07K 16/24 (2006.01) *A61P 37/08* (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01) *A61K 39/06* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/GB2005/002581

(22) International Filing Date: 30 June 2005 (30.06.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0414799.7 1 July 2004 (01.07.2004) GB
0423675.8 25 October 2004 (25.10.2004) GB

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: GLAXO GROUP LIMITED [GB/GB]; Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford, Middlesex UB6 0NN (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: ASHMAN, Claire [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB). CASSIDY, Martin, John [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB). ELLIS, Jonathan, Henry [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB). WATTAM, Trevor, Anthony, Kenneth [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB).

(74) Agent: NASH, Guy, Cameron; GlaxoSmithKline, Corporate Intellectual Property, 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS (GB).

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

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:
— *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))*
— *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))*
— *of inventorship (Rule 4.17(iv))*

Published:
— *with international search report*

(88) Date of publication of the international search report:
27 April 2006

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: CHIMERIC AND HUMANISED MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST INTERLEUKIN- 13

(57) Abstract: The present invention concerns immunoglobulins, particularly antibodies which specifically bind human Interleukin 13 (hIL-13). Antibodies of the invention may be used in the treatment of a variety of diseases or disorders responsive to modulation of the interaction between hIL-13 and the human IL-13 receptor. Such diseases include severe asthma, atopic dermatitis, COPD and various fibrotic diseases. Pharmaceutical compositions comprising said antibodies and methods of manufacture are also disclosed.

WO 2006/003407 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intl application No
PCT/GB2005/002581

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K16/24 A61P37/02 A61P37/08 A61K39/06

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

B. FIELDS SEARCHED

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

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PUNNONEN ET AL: "The relative contribution of IL-4 and IL-13 to human IgE synthesis induced by activated CD4<+> or CD8<+> T cells" JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, MOSBY - YEARLY BOOK, INC, US, vol. 100, no. 6, December 1997 (1997-12), pages 792-801, XP005138233 ISSN: 0091-6749 the whole document	1-73
X	US 6 468 528 B1 (MAK TAK W ET AL) 22 October 2002 (2002-10-22) column 2, line 37 - line 43 column 5, line 10 - line 50 claims; examples	1-67

-/---

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
18 January 2006	07/02/2006

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Rankin, R

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. nal application No
P(. 32005/002581

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2003/235555 A1 (SHEALEY DAVID ET AL) 25 December 2003 (2003-12-25) paragraph '0015! - paragraph '0020! claims; examples	1-67
A	WO 03/092610 A (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC; FURFINE, ERIC, S; STAHL, NEIL) 13 November 2003 (2003-11-13) paragraph '0006! - paragraph '0010! paragraph '0038! claims; examples	1-73
P,X	WO 2005/007699 A (CAMBRIDGE ANTIBODY TECHNOLOGY LIMITED; MONK, PHILLIP, DAVID; JERMUTUS,) 27 January 2005 (2005-01-27) page 1, line 24 - line 28 page 4, line 16 - line 22 claims; examples	1-73

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

tional application No.
PCT/GB2005/002581

427

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 49-58, 67-69 are directed to a method of treatment of the human body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search reportcovers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int ... al application No
Pt ... 32005/002581

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 6468528	B1	22-10-2002	NONE		
US 2003235555	A1	25-12-2003	NONE		
WO 03092610	A	13-11-2003	AU	2003243189 A1	17-11-2003
			CA	2480777 A1	13-11-2003
			EP	1499354 A2	26-01-2005
			JP	2005525404 T	25-08-2005
WO 2005007699	A	27-01-2005	GB	2403952 A	19-01-2005

429
22

Allergens, IgE, mediat rs, inflammat ry mechanisms

The relative contribution of IL-4 and IL-13 to human IgE synthesis induced by activated CD4+ or CD8+ T cells

Juha Punnonen, MD, PhD, Hans Yssel, PhD, and Jan E. de Vries, PhD
Palo Alto, Calif.

The relative contribution of IL-4 and IL-13 to the regulation of IgE synthesis has remained relatively poorly characterized, partially because of lack of suitable animal models. We have studied the roles of IL-4 and IL-13 in human IgE synthesis induced by supernatants derived from activated CD4+ or CD8+ T cell clones. Neutralizing anti–IL-4 and anti–IL-13 monoclonal antibodies (mAbs) inhibited IgE synthesis induced by anti-CD40 mAbs and supernatants from CD4+ T cells by an average 61% and 42%, respectively ($n = 25$). Recombinant IL-13 had additive effects on IL-4–induced IgE synthesis, but only when IL-4 was present at low concentrations. Accordingly, IL-4 was the dominant IgE synthesis–inducing cytokine derived from highly polarized T helper (Th)$_2$ cells. However, anti–IL-13 mAbs also significantly inhibited IgE synthesis induced by two of three supernatants derived from allergen-specific T_{H2}-like cell lines generated from the skin of patients with atopic dermatitis. Furthermore, anti–IL-13 mAbs almost completely inhibited IgE synthesis induced by supernatants from T_{H2} cells or CD8+ T cell clones. Taken together, these data indicate that IL-13, in addition to IL-4, contributes to IgE synthesis induced by all T helper cell subsets, including allergen-specific T_{H2} cells. Moreover, IL-13 appears to be the major IgE synthesis–inducing cytokine derived from T_{H2} cells or CD8+ T cells. (J Allergy Clin Immunol 1997;100:792-801.)

Key words: B lymphocytes, allergy, cytokines, isotype switching, T helper cells

The induction of IgE synthesis by B cells requires T cell help, which is mediated via soluble and membrane-bound molecules expressed by activated CD4+ T cells. The most important membrane-bound costimulatory molecule appears to be the ligand for CD40 (CD40L), which is expressed by activated CD4+ T cells and induces B cell proliferation and differentiation in the presence of cytokines.[1, 2] The importance of CD40L in the induction of Ig isotype switching and Ig synthesis was demonstrated in patients with hyper-IgM syndrome, who have no or minimal levels of IgG, IgA, and IgE in their sera due to mutations in their genes encoding CD40L.[3-5] The 26 kD membrane form of tumor necrosis factor-α, expressed on CD4+ T cells after activation, was also shown to be involved in the productive T-B cell interactions that are required for induction of IgE synthesis.[7-8] However, IgE synthesis induced by T cells derived from patients deficient in CD40L could not be blocked by neutralizing anti–tumor necrosis factor-α monoclonal antibodies (mAbs),[9] suggesting that additional surface-bound molecules are involved. One such a pair of molecules may be CD19 (which is constitutively expressed on B cells) and its putative ligand on T cells, because mice with CD19 deficiency have impaired T cell–dependent B cell responses.[10] In addition, CD22 and CD58 expressed on B cells have also been demonstrated to mediate interactions with T cells,[11, 12] further demonstrating the complexity and redundancy involved in the regulation of productive T-B cell interactions.

Both IL-4 and IL-13 induce IgE switching and IgE synthesis by human B cells activated by CD4+ T cells, Epstein-Barr virus transformation, or CD40 stimulation.[13-19] IL-4 and IL-13 are functionally and structurally related and they are most likely the results of gene duplication, because the genes encoding IL-4 and IL-13 are located only 12 kb from each other on chromosome 5q31.[20-24] IL-13 did not have any additive or synergistic effects on IL-4–induced IgE synthesis when both cytokines were added at saturating concentrations, suggesting similarities in the signaling pathways of these two cytokines.[18] Thereafter, a mutant form of IL-4 (hIL-

Abbreviations used

CD40L:	Ligand for CD40
FCS:	Fetal calf serum
IFN-γ:	Interferon-γ
IGF-1:	Insulin-like growth factor 1
mAbs:	Monoclonal antibodies
MNC:	Mononuclear cell
PBMC:	Peripheral blood mononuclear cell
T_{H0}, T_{H1}, T_{H2}:	T helper cell subsets

From the Human Immunology Department, DNAX Research Institute of Molecular and Cellular Biology, Inc., Palo Alto.
Supported by Schering-Plough Corporation and by the Academy of Finland (J.P.).
Received for publication March 7, 1997; revised June 17, 1997; accepted for publication July 2, 1997.
Reprint requests: Jan E. de Vries, PhD, Human Immunology Department, DNAX Research Institute of Molecular and Cellular Biology, Inc., 901 California Ave., Palo Alto, CA 94304-1104.
Copyright © 1997 by Mosby–Year Book, Inc.
0091-6749/97 $5.00 + 0 1/1/84508

4.Y124D) and mAbs specific for the IL-4R α-chain were shown to block the biological functions of both IL-4 and IL-13, indicating that the IL-4R α-chain is a component of both IL-4R and IL-13R complexes.[26-27] Recently, a specific IL-13 binding protein was cloned and sequenced, which, together with the IL-4R α-chain, is required for IL-13 signaling.[28,29] Despite these similarities, not all functions of IL-4 are shared with IL-13. The major differences are that IL-13, in contrast to IL-4, does not direct type 2 T helper cell (T_{H2}) differentiation or induce proliferation by human T cells.[30] Moreover, IL-4, but not IL-13, induces CD23 expression and germline ε transcription in purified human precursor B cells, suggesting differential expression of IL-4R and IL-13R complexes during B cell ontogeny and, hence, different roles for IL-4 and IL-13 in the regulation of B cell maturation.[31]

The relative contributions of IL-4 and IL-13 to the regulation of IgE synthesis have remained poorly characterized. These studies have been hampered by the lack of suitable animal models, because IL-13 has not been shown to act on murine B cells. However, early studies indicated that IgE synthesis induced by T cells from patients with atopy is partially independent of IL-4.[32] More recently, IL-13 was shown to be a primary IgE synthesis–inducing cytokine secreted by naive $CD4^+$, $CD45RO^-$ T cells.[33,34] In addition, IL-13, but not IL-4, was shown to be required for spontaneous IgE and IgG4 synthesis by PBMC derived from patients with nephrotic syndrome.[35] The aim of this study was to characterize the relative contribution of IL-4 and IL-13 to T cell–dependent IgE synthesis by human B cells. We show that both anti–IL-4 and anti–IL-13 mAbs significantly inhibit IgE synthesis induced by supernatants derived from activated human $CD4^+$ T cell clones or lines. Neutralizing anti–IL-13 mAbs also inhibited IgE synthesis induced by supernatants derived from type 1 T helper cells (T_{H1}) and $CD8^+$ T cell clones, and more importantly, IL-13 contributed to IgE synthesis induced by T_{H2}-like T cell lines generated from the skin of patients with atopy. These results suggest that IL-13, in addition to IL-4, is involved in the elevated IgE synthesis observed in such individuals.

METHODS

Reagents

Purified human recombinant IL-4 was provided by Schering-Plough Research Institute (Kenilworth, N.J.). Recombinant IL-13 was provided by Dr. Satish Menon (DNAX). Unconjugated, phycoerythrin-conjugated, and fluorescein isothiocyanate-conjugated mAbs specific for CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD20, CD56, and control antibodies with irrelevant specificities were obtained from Becton-Dickinson (San Jose, Calif.). The purified anti-CD40 mAb 89 (IgG1) was provided by Dr. J. Banchereau (Schering-Plough France, Dardilly, France). Neutralizing mAbs specific for IL-4 (25D2) and IL-13 (5A2) were provided by Dr. J. Abrams (DNAX). Neutralizing mAb specific for interferon-γ (IFN-γ) was purchased from R&D Systems (Minneapolis, Minn.).

Cell preparations

Blood samples and spleens were obtained from healthy volunteers or from patients undergoing splenectomy due to trauma, respectively. Spleen samples were obtained from four different donors. Mononuclear cells (MNCs) were isolated by centrifugation over Histopaque-1077 (Sigma, St. Louis, Mo.).

B cells were purified by negative selection by depleting T cells, monocytes, and natural killer cells. Briefly, splenic MNCs were stained with mAbs specific for CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, and CD56. After the cells were washed twice, they were incubated with magnetic beads coated with anti-mouse IgG mAbs (Dynabeads M-450, Dynal, Oslo) for 30 minutes at 4° C. Positive cells were removed by a magnetic field according to the manufacturer's instructions, and the remaining cells were washed twice and resuspended in Yssel's medium[36] supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). The purity of the remaining cells was analyzed by flow cytometry, and always >97% of these cells were $CD20^+$ (data not shown).

T cell clones and lines

Thirteen $CD4^+$ T cell clones, three $CD4^+$ T cell lines derived from the skin of patients with atopy, and two $CD8^+$ T cell clones were used in this study. Four of the $CD4^+$ T cell clones were derived from cord blood.

Three T cell lines were generated from skin biopsy specimens under conditions that do not require the addition of antigen-presenting cells.[26] The biopsy samples were taken from patients with atopic dermatitis 24 hours after a transdermal challenge with house dust mite allergen *Dermatophagoides pteronyssinus* group 1 (Der p 1).[37] The cells were expanded in Yssel's medium supplemented with 1% human AB serum, IL-2 (10 U/ml), and IL-4 (100 U/ml).

Four $CD4^+$ T cell clones were generated from naive $CD4^+$, $CD45RA^+$ cord blood T cells purified as described previously.[30] Two of these clones were generated in the presence of IL-12, which is known to favor differentiation of T_{H1} cells.[30,38,39] Nine $CD4^+$ T cell clones and two $CD8^+$ T cell clones were generated from the peripheral blood of healthy adult donors. All T cell clones were restimulated every other week by phytohemagglutinin and allogeneic feeder cells as described previously.[37]

Generation of supernatants of activated T cells

A total of 23 $CD4^+$ T cell supernatants and two $CD8^+$ T cell supernatants was generated. T cell clones or lines were stimulated in 24-well plates (Lindbro, McLean, Va.) with plate-bound anti-CD3 mAb and soluble anti-CD28 mAb. Briefly, the wells were coated with anti-CD3 mAb SPV-T3b[40] for 16 hours at 4° C, and washed twice before the addition of T cells and soluble anti-CD28 mAb L293 (a gift from Dr. L. Lanier, DNAX). The cells were cultured in Yssel's medium supplemented with 10% FCS at 2×10^6 cells/ml for 48 hours, and the supernatants were harvested, centrifuged, and stored at −80° C until used.

Induction of Ig synthesis in vitro

Unfractionated PBMC or purified B cells were cultured in quadruplicate in round-bottomed 96-well plates (Lindbro) at 10^5 cells/well at 37° C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2. All cultures were performed in 0.2 ml Yssel's medium supplemented with 10% FCS. Cytokines, T cell supernatants, and mAbs were added at the onset of the cultures. Ig levels in the culture supernatants were measured by specific ELISA after culture for 12 to 14 days.

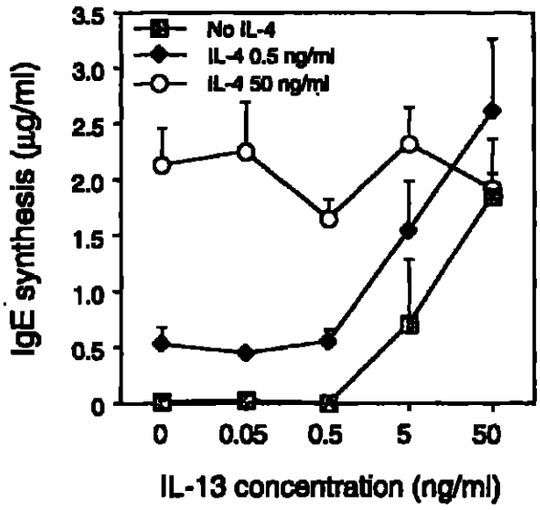


FIG. 1. IL-13 additively enhances IgE synthesis induced by suboptimal concentrations of IL-4. Human PBMC were cultured in the presence of IL-4 (0, 0.5, or 50 ng/ml) and increasing concentrations of IL-13 were added to cultures. IgE levels in culture supernatants were measured by ELISA after culture for 12 days. Data represent mean ± SEM IgE levels of quadruplicate cultures in a representative of four experiments.

Measurement of cytokine and Ig production

IL-4 and IL-13 levels were determined by ELISA as described by Chretien et al.[41] and de Waal Malefyt et al.,[42] respectively. The sensitivity of both ELISA protocols was 50 pg/ml.

IgM, total IgG, IgG4, IgA, and IgE secretions were determined by ELISA as described previously.[18] The sensitivities of IgM, total IgG, and IgA ELISAs were 0.5 ng/ml, and the sensitivities of IgG4 and IgE ELISAs were 0.2 ng/ml.

RESULTS

IL-13 has additive effects on IgE synthesis induced by suboptimal concentrations of IL-4

The effects of IL-13 on human IgE synthesis induced by increasing concentrations of IL-4 were investigated. IL-13 had no additive or synergistic effects on IL-4-induced IgE synthesis by human PBMC when IL-4 was added at saturating concentrations of 50 ng/ml (Fig. 1), which is consistent with previous results.[18] However, IL-13 significantly enhanced IL-4-induced IgE synthesis in a dose-dependent manner when IL-4 was present at a suboptimal concentration of 0.5 ng/ml (Fig. 1). These results suggest that both IL-4 and IL-13 can contribute to T cell–dependent human IgE synthesis.

Neutralizing anti–IL-4 and anti–IL-13 mAbs inhibit IgE synthesis induced by CD4+ T cell supernatants and anti-CD40 mAbs

To investigate directly the relative contribution of IL-4 and IL-13 to polyclonal human IgE synthesis, we studied the effects of neutralizing anti–IL-4 and anti–IL-13 mAbs on IgE synthesis induced in response to anti-CD40 mAbs and supernatants of activated $CD4^+$ T cell clones. Only supernatants inducing >10 ng/ml of IgE (17 of 23) were chosen for these studies, and a total of 25 experiments was performed with the use of purified splenic B cells from four different donors. Neutralizing anti–IL-4 and anti–IL-13 mAbs inhibited $CD4^+$ T cell supernatant-induced IgE synthesis by an average 61% and 42%, respectively (Fig. 2, *A*). In addition to IgE switching, IL-4 and IL-13 have also been shown to induce IgG4 synthesis by human B cells.[18, 43, 44] As shown for IgE production, anti–IL-4 mAbs inhibited IgG4 synthesis induced by T cell supernatants by 52%, whereas anti–IL-13 mAbs only slightly reduced the levels of IgG4 produced (Fig. 2, *A*). Neither anti–IL-4 mAbs nor anti–IL-13 mAbs had any significant effect on IgM or IgA synthesis under these culture conditions (Fig. 2, *B*). In addition, no effect on total IgG synthesis was observed (Fig. 2, *B*), which is likely because IgG4 represents only a small proportion of total IgG, and reduced IgG4 production may also be compensated for by increased synthesis of other IgG subclasses. The neutralizing anti–IL-4 and anti–IL-13 mAbs we used completely blocked IgE synthesis induced by recombinant forms of the corresponding cytokines, and nonspecific inhibitory effects on IgE synthesis were not observed (Fig. 2, *C*).

Correlations between the levels of IL-4, IL-13, and IFN-γ production and the capacities of the T cell supernatants to induce IgE synthesis

We next studied the correlations between the concentrations of IL-4 and IL-13 in the T cell supernatants and levels of IgE synthesis induced by these supernatants in the presence of anti-CD40 mAbs. In addition, the levels of IFN-γ production were measured, because IFN-γ has direct inhibitory effects on IL-4–or IL-13–induced germline ε transcription and IgE synthesis by purified B cells[31, 45] (Cocks et al., submitted for publication). As expected, the level of IgE synthesis induced by T cell supernatants positively correlated with the concentrations of both IL-4 and IL-13. However, the correlation between IL-4 concentrations and the levels of IgE produced was stronger ($r = 0.423$) than that between IL-13 concentrations and IgE synthesis ($r = 0.261$) (Fig. 3, *A* and *B*), whereas a strong inverse correlation was observed between the levels of IgE produced and the concentrations of IFN-γ in the supernatants ($r = 0.567$). Therefore, supernatants with relatively low IL-4 and IL-13 levels were able to induce strong IgE responses provided that the levels of IFN-γ also were low (data not shown).

Because IL-13 is also produced by T_{H1} cells secreting high levels of IFN-γ,[42] we determined the correlations between the levels of IL-4, IL-13, and IFN-γ in the supernatants. As shown in Fig. 3, *D*, there was an inverse correlation ($r = 0.312$) between the levels of IL-4 and IFN-γ in the supernatants, whereas no correlation ($r = 0.056$) between the concentrations of IL-13 and IFN-γ was observed (Fig. 3, *E*). These findings are consistent with the results indicating that IL-13 can be produced by

all T helper cell subsets.[42] However, a strong positive correlation existed between IL-4 and IL-13 production ($r = 0.646$) (Fig. 3, *F*), suggesting that IL-13 is primarily produced by T_{H2} cells, which is in line with a previous study indicating that most IL-4-producing cells also produce IL-13.[36] On the other hand, five of 23 supernatants contained >20 ng/ml of IL-13, but no or low levels (<2 ng/ml) of IL-4 (Fig. 3, *F*), further suggesting that IL-4 and IL-13 are partially produced by different T cell subsets and that the production of IL-4 and IL-13 is regulated by different mechanisms. Accordingly, a proportion of T cell supernatants with low levels of IL-4 induced relatively high levels of IgE synthesis (Fig. 3, *A*).

Contribution of IL-13 to IgE synthesis induced by T_{H2}-like T cell lines derived from the skin of patients with atopy

Because allergen-specific T cells generally belong to the T_{H2} subset, we studied the relative contribution of IL-4 and IL-13 to the induction of IgE synthesis by T cell lines generated from skin biopsy samples taken from patients with atopic dermatitis after a challenge with the house dust mite allergen Der p 1. Supernatants from T cell lines derived from three different patients contained 6.6 ± 3.6 (mean ± SD) ng/ml of IL-4 and 34.2 ± 9.0 ng/ml of IL-13 after activation with immobilized anti-CD3 and anti-CD28 mAbs. The production levels of IFN-γ were always <0.1 ng/ml, indicating that these cell lines were indeed highly polarized toward the T_{H2} phenotype (Fig. 4). Anti–IL-4 mAbs strongly inhibited IgE synthesis induced by all three supernatants. Neutralizing anti–IL-13 mAbs also had significant inhibitory effects on IgE synthesis induced by two of the three supernatants tested (Fig. 4, *A* and *B*). In addition, even when anti–IL-13 mAbs alone had no inhibitory effect, they could completely block the residual IgE synthesis induced by the T cell supernatant in the presence of anti–IL-4 mAbs (Fig. 4, *C*). These data suggest that IL-4 and IL-13 are the most relevant T cell–derived soluble molecules that can induce IgE synthesis by human B cells, and that IL-13, in addition to IL-4, contributes to IgE synthesis induced by allergen-specific T_{H2} cells from patients with atopy.

IL-13 is a major IgE synthesis–inducing cytokine derived from T_{H1} or $CD8^+$ T cell clones

Because IL-13, in contrast to IL-4, is also produced by T_{H1} cells,[42] we studied the capacity of T_{H1}-like T cell clones to induce polyclonal IgE synthesis. Supernatants were derived from two adult T_{H1}-like clones and two T cell clones that had been generated from naive $CD4^+$, $CD45RA^+$ cord blood T cells in the presence of IL-12, a cytokine known to favor T_{H1} differentiation.[30, 35, 39] Cytokine levels in the supernatants indicated that one clone derived from cord blood was a T_{H0} clone producing equal, but low, levels of IL-4 and IFN-γ (Fig. 5, *A*), whereas the other cord blood–derived and the two adult peripheral blood–derived $CD4^+$ T cell clones belonged to the T_{H1} subset with high IFN-γ/IL-4 production ratios

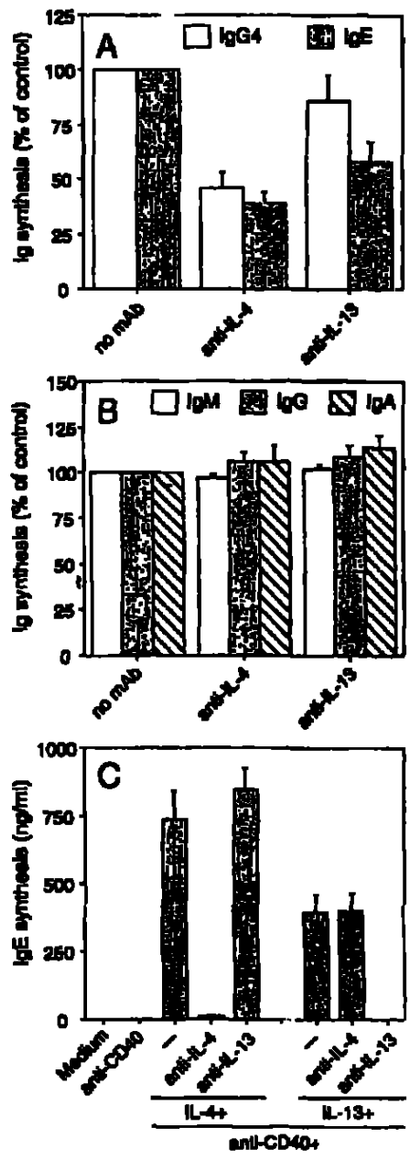


FIG. 2. Effects of neutralizing mAbs specific for IL-4 and IL-13 on IgE and IgG4 (A) or IgM, total IgG, and IgA (B) synthesis induced by supernatants of activated $CD4^+$ T cell clones, and effects of these mAbs on IgE synthesis induced by recombinant IL-4 or IL-13 (C). Supernatants (25% of final volume) of $CD4^+$ T cells activated by immobilized anti-CD3 and anti-CD28 mAbs (A and B), or recombinant IL-4 (100 ng/ml) or IL-13 (100 ng/ml) (C) were added to cultures of purified B cells stimulated with anti-CD40 mAbs (10 μg/ml) in the presence or absence of neutralizing anti–IL-4 or anti–IL-13 mAbs (10 μg/ml each) as indicated in the figure. Ig synthesis was studied after culture for 12 to 14 days by specific ELISAs. In A and B, 17 supernatants were studied with the use of splenic B cells from four different donors in a total of 28 experiments, and levels of Ig produced in the presence of neutralizing mAbs are expressed as percentages (mean ± SEM) of those produced in the absence of the mAbs. Mean levels of IgE, IgG4, IgM, total IgG, and IgA detected in these experiments were 230, 688, 1892, 2182, and 3588 ng/ml, respectively. In C, data represent mean (±SEM) IgE levels of quadruplicate cultures in a representative of four experiments.

433
A25

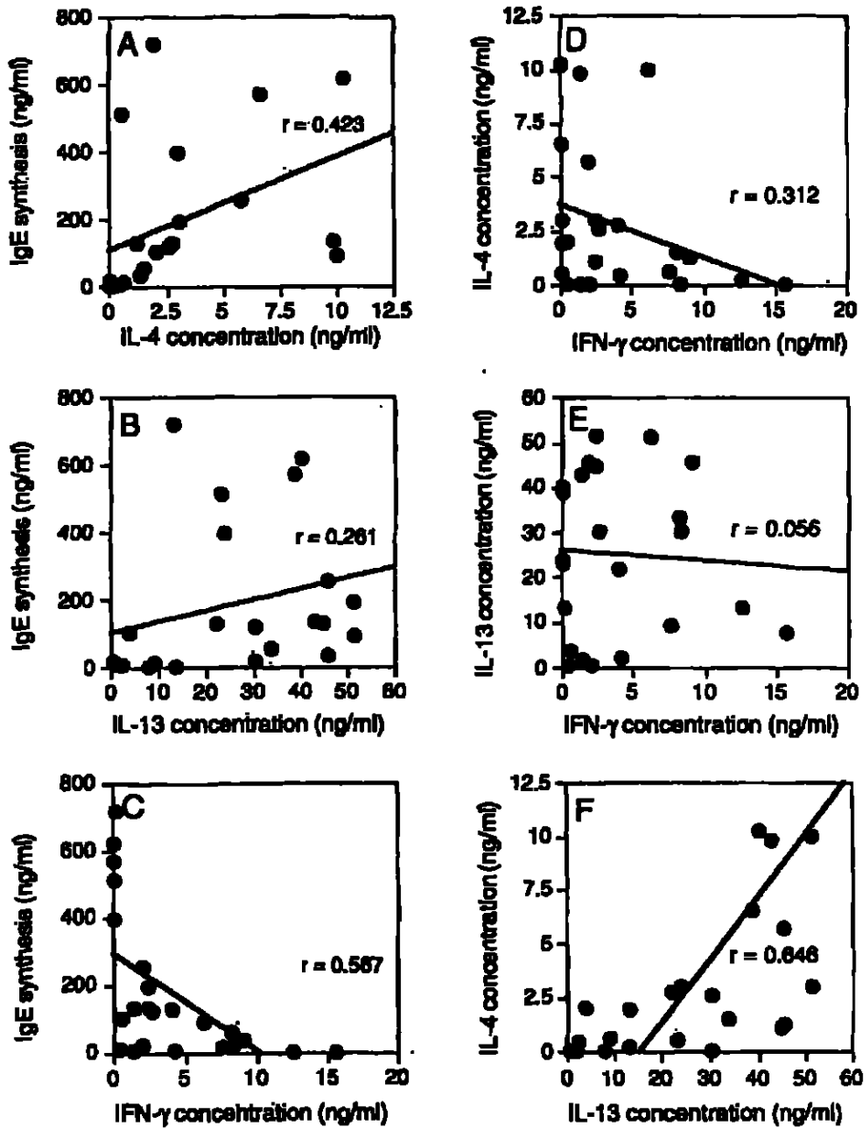


FIG. 3. Correlation of levels of IL-4 (A), IL-13 (B), and IFN-γ (C) in $CD4^+$ T cell supernatants with the amount of IgE induced by the supernatants, and production levels of IL-4, IL-13, and IFN-γ by activated $CD4^+$ T cells (D, E and F, respectively). Cytokine levels were studied by specific ELISAs in 23 supernatants derived from 15 different $CD4^+$ T cell clones activated with immobilized anti-CD3 and anti-CD28 mAbs and the capacities of the supernatants to induce IgE were studied. Purified B cells were cultured in the presence of anti-CD40 mAbs (10 μg/ml) and T cell supernatants (25% of final volume), and levels of IgE produced were studied after culture for 12 to 14 days.

(Fig. 5, *B*, *C*, and *D*). All four clones produced considerable levels of IL-13 (Fig. 5). Supernatants derived from these T_{H0} and T_{H1} clones were able to induce IgE synthesis by purified B cells cultured in the presence of anti-CD40 mAbs, but the levels of IgE synthesis were significantly lower than those induced by T_{H2} cells (Fig. 4). Anti–IL-13 mAbs strongly inhibited IgE production induced by all four supernatants, whereas anti–IL-4 mAbs had no or minimal inhibitory effects, except in Fig. 5, *B*. These results are consistent with the data on the levels of cytokines present in the supernatants, and indicate that IL-13 produced by T_{H0} and T_{H1} cells is a major contributor to the IgE synthesis induced by these cells.

A proportion of $CD8^+$ T cells isolated from patients with human immunodeficiency virus infection who had high serum IgE levels express CD40L and produce T_{H2}-type cytokines. Supernatants derived from these

CD8⁺ T cells induced IgE synthesis by normal B cells activated with anti-CD40 mAbs.[46, 47] As shown in Fig. 6, supernatants derived from activated CD8⁺ T cell clones obtained from healthy individuals also induced low levels of IgE synthesis by purified B cells activated with anti-CD40 mAbs. IL-4 production by these CD8⁺ T cell clones after activation with immobilized anti-CD3 and anti-CD28 mAbs was very low (<0.05 ng/ml), whereas relatively high levels of IL-13 were observed (mean 14.1 ng/ml, $n = 2$). In addition, these CD8⁺ T cells produced high levels of IFN-γ (mean 17.3 ng/ml). Accordingly, the levels of IgE produced in response to these supernatants were significantly increased when neutralizing anti–IFN-γ mAbs were included in the cultures (Fig. 6). Consistent with the results on cytokine levels in the CD8⁺ T cell supernatants, the addition of neutralizing anti–IL-4 mAbs had no significant effect, whereas anti–IL-13 mAbs virtually completely blocked IgE synthesis induced by anti-CD40 mAbs and these supernatants (Fig. 6). These data suggest that IL-13 plays a major role in the IgE synthesis induced by CD8⁺ T cell clones.

DISCUSSION

It is well documented that both IL-4 and IL-13 induce IgE synthesis by human B cells in vitro.[13-19] However, it has remained unclear whether both cytokines also contribute to IgE synthesis under physiological situations. Initially, it was reported that mice with IL-4 deficiency are completely unable to produce IgE in vivo,[48] suggesting that IL-4 is the only cytokine capable of inducing IgE synthesis. However, more recent studies have indicated that low levels of IgE are produced in mice deficient in IL-4 after infections with *Plasmodium chabaudi* or *Leishmania major*, indicating that an IL-4–independent mechanism of IgE switching is operational.[49, 50] However, whether this IgE synthesis is induced by IL-13 is not known, because IL-13 has not been reported to induce IgE switching in murine B cells. Mice deficient for Stat 6 also are unable to produce IgE in vivo.[51] However, Stat 6 is not only involved in IL-4 signaling, but it also appears to be an essential component of the IL-13–induced signaling pathway.[52] Consequently, no conclusions on the relative contribution of IL-4 and IL-13 to the regulation of human IgE synthesis can be drawn on the basis of the data obtained in these mouse models.

In this study, we have shown that IL-13 contributes to IgE synthesis induced by T_{H0}, T_{H1}, or T_{H2}-type CD4⁺ T cell clones, CD8⁺ T cells, and CD4⁺ T cells derived from the skin of patients with atopic dermatitis. Because recombinant IL-13 enhances IL-4–induced IgE synthesis only when IL-4 is present at suboptimal concentrations, these observations also suggest that the level of IL-4 production after T cell activation by immobilized anti-CD3 and anti-CD28 mAbs is insufficient to saturate all IL-4 receptors. However, because T cells express high-affinity IL-4R complexes, but no IL-13R complexes, it cannot be ruled out that the lower levels of IL-4 observed in the cultures were due to IL-4 consumption during T cell activation. In addition, whether the con-

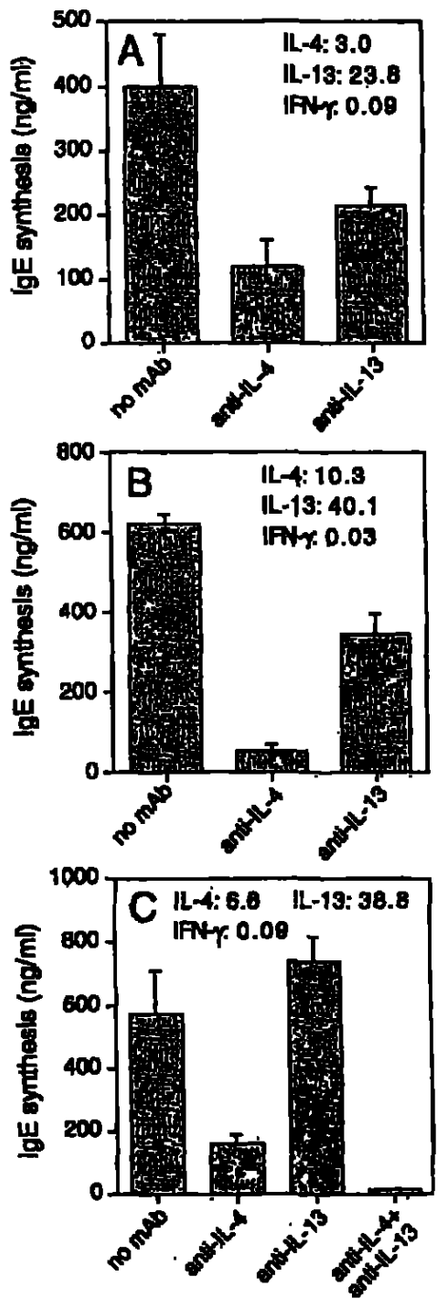


FIG. 4. Effects of neutralizing anti–IL-4 and anti–IL-13 mAbs on IgE synthesis induced in response to supernatants of CD4⁺ T cell lines derived from skin of patients with atopic dermatitis. Skin-derived T cell lines were generated after allergen challenge as described in Methods section and activated with immobilized anti-CD3 and anti-CD28 mAbs for 48 hours before harvesting the supernatants. Purified B cells (10^5/well) were cultured in the presence of T cell supernatant (25% of final volume), anti-CD40 mAbs (10 μg/ml), and anti–IL-4 and/or anti–IL-13 mAbs (10 μg/ml). IgE levels in culture supernatants were measured after culture for 12 days. IL-4, IL-13, and IFN-γ levels (ng/ml) detected in each supernatant are indicated in the figure.

435

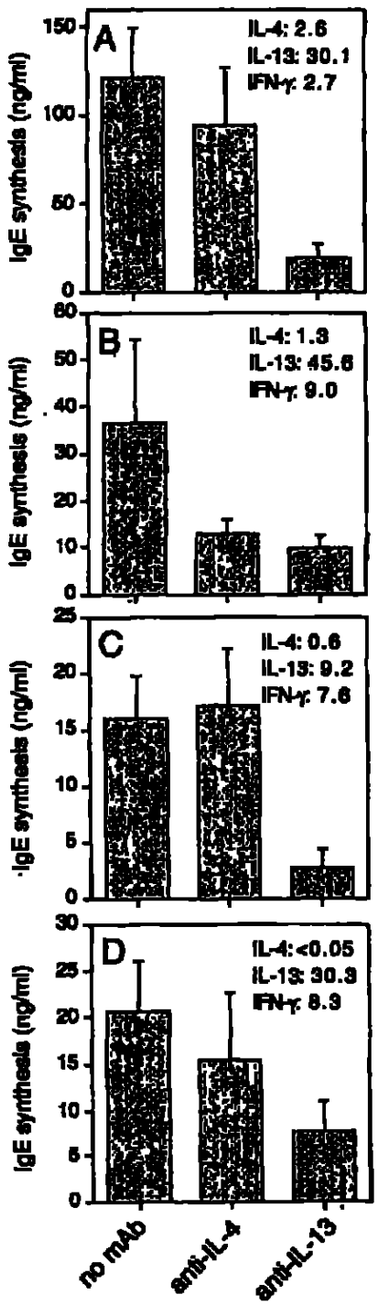


FIG. 8. Effects of neutralizing anti-IL-4 and anti-IL-13 mAbs on IgE synthesis induced in response to supernatants of T_{H1}-like T cell clones. Supernatants (25% of final volume) derived from T cell clones generated from CD4+ naive cord blood T cells in the presence of IL-12 (A and B) or adult T_{H1} clones (C and D) were cultured in the presence of purified B cells (10^4/well), anti-CD40 mAbs, and anti-IL-4 and/or anti-IL-13 mAbs (10 μg/ml). T cell clones were activated with immobilized mAbs anti-CD3 and anti-CD28 for 48 hours before harvesting the supernatants. IgE levels in the culture supernatants were measured after culture for 12 days. IL-4, IL-13, and IFN-γ levels (ng/ml) detected in each supernatant are indicated in the figure.

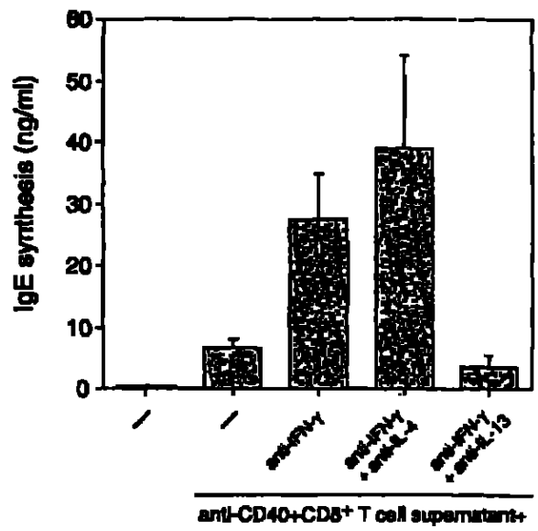


FIG. 9. Effects of neutralizing anti-IL-4 and anti-IL-13 mAbs on IgE synthesis induced by supernatants of $CD8^+$ T cell clones. $CD8^+$ T cell clones were activated with mAbs anti-CD3 and anti-CD28 for 48 hours before harvesting the supernatants. Purified B cells (10^4/well) were cultured in the presence of T cell supernatants (25% of final volume), anti-CD40 mAbs, anti-IFN-γ, anti-IL-4, and/or anti-IL-13 mAbs (10 μg/ml each). IgE levels in the culture supernatants were measured after culture for 12 days.

centrations of IL-4 and IL-13 required for optimal induction of IgE synthesis are similar in vitro and in vivo remains to be shown. Nevertheless, the observation that IL-4 and IL-13 have additive effects at suboptimal concentrations is consistent with studies indicating that there are two types of IL-4R complexes, one of which also acts as a high-affinity IL-13R complex. The specific high-affinity IL-4R complex comprises the common γ-chain and the IL-4R α-chain, whereas a receptor complex consisting of the IL-13R α-chain and the IL-4R α-chain acts as a receptor for both IL-4 and IL-13.[24, 26-29] The relative contribution of the two receptor complexes in IL-4 signaling is presently unknown, but it appears that IL-13 can bind only to the receptor complexes containing the IL-13R α-chain. IL-4-induced signaling through the IL-13R complex was demonstrated in patients with X-linked severe combined immunodeficiency disease, who have mutations in their gene encoding the common γ-chain. Although these patients have defective IL-4R complexes, both IL-4 and IL-13 induced high levels of IgE synthesis through signaling via the IL-13R complex on B cells.[23] Our data suggest that IL-4 produced after engagement of the T-cell receptor and CD28 does not saturate all IL-4R and IL-13R complexes, and that optimal IgE responses are only obtained when IL-13, in addition to IL-4, is present.

IL-4 and IL-13 appear to be the only T cell–derived molecules capable of inducing IgE synthesis by human B cells. Activated $CD4^+$ T cells have been previously shown to induce IgE synthesis even in the presence of anti–IL-4 mAbs.[32] In addition, T cell clones that did not

produce IL-4 could induce germline ε-transcription in human B cells.[34] In this study, anti–IL-13 mAbs could completely block the residual IgE synthesis observed in cultures treated with neutralizing anti–IL-4 mAbs, even in situations in which anti–IL-13 mAbs alone did not significantly inhibit T cell supernatant–induced IgE synthesis. However, growth hormone and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) have also been shown to induce IgE synthesis by surface IgE–B cells cultured in the presence of anti-CD40 mAbs.[35] Because alveolar macrophages secrete IGF-1 and the levels of both growth hormone and IGF-1 are elevated in the bronchoalveolar lavage of patients with asthma,[35] it remains possible that these molecules also play a role in IL-4–and IL-13–induced IgE synthesis in vivo.

IL-13 was produced at high levels by T cells derived from the skin of patients with atopy, and neutralizing anti–IL-13 mAbs inhibited IgE synthesis induced by supernatants of skin-derived T cells, suggesting that IL-13 plays an important role in the regulation of atopic and allergic responses. This conclusion is supported by a study indicating that IL-13 expression, like that of IL-4, is upregulated in the lungs of patients with asthma after allergen challenge.[36] However, IL-4 and IL-13 appear to be partially produced by different T cell subsets. In our study, 5 of 24 $CD4^+$ T cell supernatants contained >20 ng/ml of IL-13 but no or <2 ng/ml of IL-4, and several supernatants with high levels of IL-13 had high levels of IFN-γ. These findings are consistent with a previous study indicating that IL-13 is also produced by T_{H1} cells.[42] Moreover, in contrast to IL-4, IL-13 was produced by naive $CD45RA^+$ T cells.[33, 34] Despite the fact that both IL-4 and IL-13 were required for optimal IgE synthesis, the levels of IgE produced correlated more significantly with IL-4 levels than with IL-13 levels in the supernatants, which is in line with the observation that IL-13 is less potent than IL-4 in inducing IgE synthesis by human B cells.[18, 19] However, because IFN-γ produced by T_{H1} cell clones directly inhibits germline ε transcription and IgE synthesis[31, 43] (Cocks et al, submitted for publication), IL-13–induced IgE synthesis was probably downregulated by IFN-γ present at high levels in a proportion of the supernatants from T_{H0}/T_{H1} cells. Nevertheless, despite the largely overlapping effects of IL-4 and IL-13 on B cell function in vitro, IL-13 produced by T cell subsets not producing IL-4 may play a significant role in the regulation of allergic inflammation and IgE synthesis in vivo. More specifically, IL-13 is likely to play a major role in the induction of IgE synthesis during the initiation of allergic responses, because IL-13, in contrast to IL-4, is also produced by naive $CD45RA^+$ T cells and because the less IL-4 present, the more significant the relative contribution of IL-13.

Human $CD8^+$ T cell clones infected with human immunodeficiency virus express CD40L and induce IgE synthesis by purified B cells,[44, 47] and a subset of murine $CD8^+$ T cell clones provided help for B cell growth and differentiation.[37] Supernatants from $CD8^+$ T cell clones derived from healthy individuals could also induce IgE synthesis by human B cells. However, the cytokine production profile of these T cell clones more closely resembled that of T_{H1} cells, because high levels of IFN-γ and low levels of IL-4 were produced. Supernatants from these $CD8^+$ T cell clones induced low levels of polyclonal IgE synthesis by purified B cells, but the level of IgE synthesis could be significantly enhanced by neutralizing anti–IFN-γ mAbs. These supernatants contained relatively high levels of IL-13, and neutralizing anti–IL-13 mAbs completely blocked the capacity of the supernatants to induce IgE synthesis. $CD8^+$ T cells have also been shown to have inhibitory effects on IgE synthesis,[38] and therefore, the contribution of $CD8^+$ T cells to the induction and maintenance of IgE synthesis in vivo requires further study. Nevertheless, the present results suggest that IL-13 is a major $CD8^+$ T cell–derived cytokine that can induce IgE synthesis by human B cells.

Taken together, both IL-4 and IL-13 contribute to IgE production induced by activated $CD4^+$ or $CD8^+$ T cell clones. These data emphasize the potential of molecules that block the functions of both IL-4 and IL-13 as a means to prevent IgE synthesis in individuals with allergy. More specifically, IL-4R and IL-13R antagonists, such as the mutant IL-4 (hIL-4.Y124D),[24-26] may be superior to specific IL-4 antagonists, such as humanized anti–IL-4 mAbs or soluble IL-4R α-chain, in the treatment of patients with atopy.

We thank Drs. Gregorio Aversa and José M. Carballido for valuable discussions and Patricia Latchas for her expert assistance. We are grateful to Dr. Kristian Thestrup-Pedersen for providing patient samples and to Jo Ann Katheiner for careful secretarial help.

REFERENCES

1. Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, Sato TA, Clifford KN, Macduff BM, et al. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. Nature 1992;357:80-2.
2. Hollenbaugh D, Grosmaire LS, Kullas CD, Chalupny NJ, Braesch-Andersen S, Noelle RJ, et al. The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity. EMBO J 1992;11:4313-21.
3. Fuleihan RN, Ramesh N, Loh R, Jabara H, Rosen RS, Chatila T, et al. Defective expression of the CD40 ligand in X chromosome-linked immunoglobulin deficiency with normal or elevated IgM. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:2170-3.
4. Di Santo JP, Bonneffoy JY, Gauchat JF, Fischer A, De Saint Basile G. CD40 ligand mutations in X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. Nature 1993;361:541-3.
5. Allen RC, Armitage RJ, Conley ME, Rosenblatt H, Jenkins NA, Copeland NG, et al. CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. Science 1993;259:990-3.
6. Aruffo A, Farrington M, Hollenbaugh D, Li X, Milatovich A, Nonoyama S, et al. The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. Cell 1993;72:291-300.
7. Aversa G, Punnonen J, de Vries JE. The 26 kD transmembrane form of tumor necrosis factor alpha on activated $CD4^+$ T cell clones provides a costimulatory signal for human B cell activation. J Exp Med 1993;177:1575-85.
8. Macchia D, Almerigogna F, Parronchi P, Ravina A, Maggi E,

Romagnani S. Membrane tumour necrosis factor-alpha is involved in the polyclonal B-cell activation induced by HIV-infected human T cells. Nature 1993;363:464-6.
9. Life P, Gauchat JF, Schmuriger V, Estoppey S, Manzel G, Durandy A, et al. T cell clones from an X-linked hyper-Immunoglobulin (IgM) patient induce IgE synthesis in vitro despite expression of nonfunctional CD40 ligand. J Exp Med 1994;180:1775-84.
10. Rickert RC, Rajewsky K, Roes J. Impairment of T-cell–dependent B-cell responses and B-1 cell development in CD19-deficient mice. Nature 1995;376:352-5.
11. Stamenkovic I, Sgroi D, Aruffo A, Sy MS, Anderson T. The B lymphocyte adhesion molecule CD22 interacts with leukocyte common antigen CD45RO on T cells and alpha 2-6 sialyltransferase, CD75, on B cells. Cell 1991;66:1133-44.
12. Diaz-Sanchez, D, Chagini S, Zhang K, Saxon A. CD58 (LFA-3) stimulation provides a signal for human isotype switching and IgE production distinct from CD40. J Immunol 1994;153:10-20.
13. Pene J, Rousset F, Briere F, Chretien I, Bonnefoy JY, Spits H, et al. IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons gamma and alpha and prostaglandin E_2. Proc Natl Acad Sci USA 1988;85:6880-4.
14. Thyphronitis G, Tsokos GC, June CH, Levine AD, Finkelman FD. IgE secretion by Epstein-Barr virus-infected purified human B lymphocytes is stimulated by interleukin 4 and suppressed by interferon gamma. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:5580-4.
15. Vercelli D, Jabara HH, Arai K, Geha RS. Induction of human IgE synthesis requires interleukin 4 and T/B cell interactions involving the T cell receptor/CD3 complex and MHC class II antigens. J Exp Med 1989;169:1295-307.
16. Claassen JL, Levine AD, Buckley RH. Recombinant human IL-4 induces IgE and IgG synthesis by normal and atopic donor mononuclear cells. Similar dose response, time course, requirement for T cells, and effect of pokeweed mitogen. J Immunol 1990;144:2123-30.
17. Zhang K, Clark EA, Saxon A. CD40 stimulation provides an IFN-gamma–independent and IL-4-dependent differentiation signal directly to human B cells for IgE production. J Immunol 1991;146: 1836-42.
18. Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie AN J, Menon S, Zurawski G, et al. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:3730-4.
19. Punnonen J, de Vries JE. IL-13 induces proliferation, Ig isotype switching, and Ig synthesis by immature human fetal B cells. J Immunol 1994;152:1094-102.
20. McKenzie AN J, Li ANX, Largaespada DA, Sato A, Kaneda A, Zurawski SM, et al. Structural comparison and chromosomal localization of the human and mouse IL-13 genes. J Immunol 1993;150: 5436-44.
21. Smirnov DV, Smirnova MG, Korobko G, Frolova EL. Tandem arrangement of human genes for interleukin-4 and interleukin-13: resemblance in their organization. Gene 1995;155:277-81.
22. Minty A, Chalon P, Derocq JM, Dumont X, Guillemot JC, Kaghad M, et al. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. Nature 1993;362:248-50.
23. McKenzie ANJ, Culpepper JA, de Waal Malefyt R, Briere F, Punnonen J, Aversa G, et al. Interleukin 13, a T-cell–derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:3735-9.
24. Zurawski SM, Vega Jr F, Huyghe B, Zurawski G. Receptors for interleukin-13 and interleukin-4 are complex and share a novel component that functions in signal transduction. EMBO J 1993;12: 2663-70.
25. Kruse N, Tony HP, Sebald W. Conversion of human interleukin-4 into a high affinity antagonist by a single amino acid replacement. EMBO J 1992;11:3237-44.
26. Aversa G, Punnonen J, Cocks BG, de Waal Malefyt R, Vega Jr FJ, Zurawski SM, et al. An interleukin 4 (IL-4) mutant protein inhibits both IL-4 or IL-13-induced human immunoglobulin G4 (IgG4) and IgE synthesis and B cell proliferation: support for a common component shared by IL-4 and IL-13 receptors. J Exp Med 1993; 178:2213-8.
27. Zurawski SM, Chomarat P, Djossou O, Bidaud C, McKenzie ANJ, Miossec P, et al. The primary binding subunit of the human interleukin-4 receptor is also a component of the interleukin-13 receptor. J Biol Chem 1995;270:13869-78.
28. Hilton DJ, Zhang JG, Metcalf D, Alexander WS, Nicola NA, Willson TA. Cloning and characterization of a binding subunit of the interleukin 13 receptor that is also a component of the interleukin 4 receptor. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:497-501.
29. Caput D, Laurent P, Kaghad M, Lefias JM, Lefort S, Vita N, et al. Cloning and characterization of a specific interleukin (IL)-13 binding protein structurally related to the IL-5 receptor alpha-chain. J Biol Chem 1996;271:16921-6.
30. Sornasse T, Larenas PV, Davis KA, de Vries JE, Yssel H. Differentiation and stability of T helper 1 and 2 cells derived from naive human neonatal CD4$^+$ T cells, analyzed at the single-cell level. J Exp Med 1996;184:473-83.
31. Punnonen J, Cocks BG, de Vries JE. IL-4 induces germline IgE heavy chain gene transcription in human fetal pre-B cells: evidence for differential expression of functional IL-4 and IL-13 receptors during B cell ontogeny. J Immunol 1995;155:4248-54.
32. Zhang X, Polla B, Hauser C, Zubler RH. T cells from atopic individuals produce IgE-inducing activity incompletely blocked by anti–interleukin-4 antibody. Eur J Immunol 1992;22:829-33.
33. Brinkmann V, Kristofic C. TCR-stimulated naive human CD4$^+$ 45RO-T cells develop into effector cells that secrete IL-13, IL-5, and IFN-gamma, but no IL-4, and help efficient IgE production by B cells. J Immunol 1995;154:3078-87.
34. Jung T, Wijdenes J, Neumann C, de Vries JE, Yssel H. Interleukin-13 is produced by activated human CD45RA$^+$ and CD45RO$^+$ T cells: modulation by interleukin-4 and interleukin-12. Eur J Immunol 1996;26:571-7.
35. Kimata H, Fujimoto M, Furusho K. Involvement of interleukin (IL)-3, but not IL-4, in spontaneous IgE and IgG4 production in nephrotic syndrome. Eur J Immunol 1995;25:1497-501.
36. Kalloft K, Hansen BH, Pedersen CB, Pedersen S, Thestrup-Pedersen K. Common clonal chromosome aberrations in cytokine-dependent continuous human T-lymphocyte cell lines. Cancer Genet Cytogenet 1995;85:68-71.
37. Yssel H, Johnson KE, Schneider PV, Widmann J, Terr A, Kanteleis R, et al. T cell activation–inducing epitopes of the house dust mite allergen Der p I. Proliferation and lymphokine production patterns by Der p I–specific CD4$^+$ T cell clones. J Immunol 1992;148:738-45.
38. Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni MP, Maggi E, Trinchieri G, et al. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. J Exp Med 1993;177:1199-1204.
39. Marshall JD, Secrist H, De Kruyff RH, Wolf SF, Umetsu DT. IL-12 inhibits the production of IL-4 and IL-10 in allergen-specific human CD4$^+$ T lymphocytes. J Immunol 1995;155:111-7.
40. Spits H, Keizer G, Borst J, Terhorst C, Hekman A, de Vries JE. Characterization of monoclonal antibodies against cell surface molecules associated with cytotoxic activity of natural and activated killer cells and cloned CTL lines. Hybridoma 1983;2:423.
41. Chretien I, Van Kimmenade A, Pearce M, Banchereau J, Abrams JS. Development of polyclonal and monoclonal antibodies for immunoassay and neutralization of human interleukin-4. J Immunol Methods 1989;117:6781.
42. de Waal Malefyt R, Abram JS, Zurawski SM, Lecron JC, Mohan-Peterson S, Sanjanwala B, et al. Differential regulation of IL-13 and IL-4 production by human CD8$^+$ and CD4$^+$ Th0, Th1 and Th2 T cell clones and EBV-transformed B cells. Int Immunol 1995;7:1405-16.
43. Gascan H, Gauchat JF, Roncarolo MG, Yssel H, Spits S, de Vries JE. Human B cell clones can be induced to proliferate and to switch to IgE and IgG4 synthesis by interleukin 4 and a signal provided by activated CD4$^+$ T cell clones. J Exp Med 1991;173:747-50.
44. Lundgren M, Persson U, Larsson P, Magnusson C, Smith CI, Hammarstrom L, et al. Interleukin 4 induces synthesis of IgE and IgG4 in human B cells. Eur J Immunol 1989;19:1311-5.
45. Xu L, Rothman P. IFN-gamma represses epsilon germline transcription and subsequently down-regulates switch recombination to epsilon. Int Immunol 1994;6:515-21.

46. Paganelli R, Scala E, Ansotegui IJ, Ausiello CM, Habpi E, Fanales-Belasio E, et al. CD8+ T lymphocytes provide helper activity for IgE synthesis in human immunodeficiency virus-infected patients with hyper-IgE. J Exp Med 1995;181:423-8.
47. Maggi E, Giudizi MG, Biagioni R, Annunziato F, Manetti R, Piccinni MP, et al. Th2-like CD8+ T cells showing B cell helper function and reduced cytolytic activity in human immunodeficiency virus type 1 infection. J Exp Med 1994;180:489-95.
48. Kuhn R, Rajewsky K, Muller W. Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. Science 1991;254:707-10.
49. vonder Weid T, Kopf M, Kohler G, Langhorne J. The immune response to *Plasmodium chabaudi* malaria in interleukin-4-deficient mice. Eur J Immunol 1994;24:2285-93.
50. Noben-Trauth N, Kropf P, Muller I. Susceptibility to *Leishmania major* infection in interleukin-4-deficient mice. Science 1996;271: 987-90.
51. Shimoda K, Kvan Deursen J, Sangster MY, Sarawar SR, Carson RT, Tripp RA, et al. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat 6 gene. Nature 1996;380:630-3.
52. Lin JX, Migone TS, Tsang M, Friedmann M, Weatherbee JA, Zhou L, et al. The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-5. Immunity 1995;2:331-9.
53. Matthew DJ, Clark PA, Herbert J, Morgan G, Armitage RJ, Kinnon C, et al. Function of the interleukin-2 (IL-2) receptor gamma-chain in biologic responses of X-linked severe combined immunodeficient B cells to IL-2, IL-4, IL-1 3, and IL-15. Blood 1995;85:38-42.
54. Gauchat JF, Lebman DA, Coffman RL, Gascan H, de Vries JE. Structure and expression of germline epsilon transcripts in human B cells induced by interleukin 4 to switch to IgE production. J Exp Med 1990;172:463-73.
55. Kimata H, Fujimoto M. Growth hormone and insulin-like growth factor I induce immunoglobulin (Ig)E and IgG4 production by human B cells. J Exp Med 1994;180:727-32.
56. Huang SK, Xiao HQ, Kleine-Tebbe J, Paciotti G, Marsh DG, Lichtenstein LM, et al. IL-13 expression at the sites of allergen challenge in patients with asthma. J Immunol 1995;155:2688-94.
57. Cronin DC, Stack R, Fitch FW. IL-4-producing CD8+ T cell clones can provide B cell help. J Immunol 1995;154:3118-27.
58. Kemeny DM, Noble A, Holmes EJ, Diaz-Sanchez D. Immune regulation: a new role for the CD8+ T cell. Immunol Today 1994;15:107-10.

Your comprehensive reference to valuable research information...

Now you can have easy access to research information with the five-year cumulative author and subject index to Volumes 87-96 of *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*.

The Cumulative Index is your comprehensive reference guide, including a list of every article in the Journal from 1991 through 1995. All articles are indexed both by subject and by author.

The Cumulative Index features:

- Offset and bold Subject Headings that make searching for subject entries easier
- Subject Entries containing complete article title, author(s), year of publication, volume, and page
- Author Entries listing author(s), article title, author-to-author referral, year of publication, volume, and page



Mosby

YES! Please send me the Five-Year Cumulative Index to *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* (1991-1995). I've indicated my method of payment below. All prices include shipping.

☐ $55.00 U.S ☐ $63.88 Canada* ☐ $59.50 International
* Includes Canadian GST.

Payment must accompany your order.

☐ Check enclosed (U.S. funds, payable to *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*)
☐ MasterCard ☐ VISA ☐ Discover

Credit Card # _____ Exp. Date _____
Signature _____
Name _____
Institution _____
Address _____
City _____ State _____
ZIP _____ Country _____

☎ To order, just call
1-800-453-4351
Outside the U.S.: 314-453-4351
Fax: 314-453-1187

Or return coupon to:
Mosby-Year Book, Inc.
Journal Subscription Services
11830 Westline Industrial Dr.
St. Louis, MO 63146 U.S.A.

JI019672

439

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-129582- -00000-0000
Fec: 2006-12-27 17:00:20 Dep: 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTEIYII
Cla: 375 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 439

lo
iA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION [X] MODELO DE UTILIDAD [ ]

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente [X]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [X]
- Descripción de la invención [X]
- Dibujos de ser estos pertinentes [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [X]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de 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 [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica del esquema trazado [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

Ecbal Navarro

Firma Responsable

27-12-2006

Fecha

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

440

REPUBLICA DE COLOMBIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
RAISBECK J. IAN
Apoderado(a) y/o Representante de
GLAXO GROUP LIMITED

REFERENCIA	Radicación No.	06 129582
	Solicitud internacional	PCT/GB2005/002581
	Fecha inicio fase nacional	01/02/2007
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	1522

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. 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. (Art. 26-k) Decisión 486.

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.

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.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 02 FEB. 2007
adpa10