

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-125972- -00007-0000

Fecha: 2011-07-13 16:49:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 208

Doctor

José Luis Salazar

Jefe de División de Nuevas Creaciones

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

Referencia: Expediente No. 06.125.972

Solicitud de Patente de Invención titulada: "Agentes que se unen a IL-13"

Solicitante: Wyeth

RESPUESTA AL AUTO NOTIFICADO POR FIJACIÓN EN LISTA NO. 170**DEL 6 DE MAYO DE 2011, OFICIO NO. 07547 (EXAMEN DE FONDO)**

ÁLVARO CORREA ORDÓÑEZ, mayor de edad y vecino de Bogotá D.C., identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de la sociedad en referencia, doy respuesta al auto emanado por ese Despacho dentro del término legal:

1. Objeciones del Examinador**1.1 De la solicitud de patente****Reivindicaciones**

Considera su Despacho que el último capítulo reivindicatorio allegado carece de concisión y claridad por cuanto:

- 1) Varias reivindicaciones se refieren al anticuerpo o al ácido nucleico y se

caracterizan por las secuencias. Sin embargo estas secuencias están caracterizadas por un porcentaje de homología respecto a otra secuencia. Se considera que este tipo de definición no permite conocer la secuencia específica y, además, no es técnicamente correcta por que el cambio de un aminoácido afecta su afinidad, por lo tanto no serían equivalentes.

2) Se considera que la reivindicación 21 carece de sustento por cuanto no todas las alternativas poseen actividades probadas.

3) Se considera que el capítulo reivindicatorio aún reclama ácidos nucleicos que podrían producir fragmentos del anticuerpo descrito. Sin embargo, de acuerdo con su Despacho estos ácidos no hacen parte de la invención que se refiere a un anticuerpo IL-13.

Adicionalmente, su despacho objeta las reivindicaciones 16 a 18 se refieren realmente a un uso.

Finalmente se concluye con relación al estado de la técnica que no existen documentos que afecten los requisitos de patentabilidad de la presente solicitud, lo que se traduce en que la presente solicitud posee tanto novedad como nivel inventivo.

2. Argumentos a favor de la patentabilidad de la solicitud

2.1 Reivindicaciones.

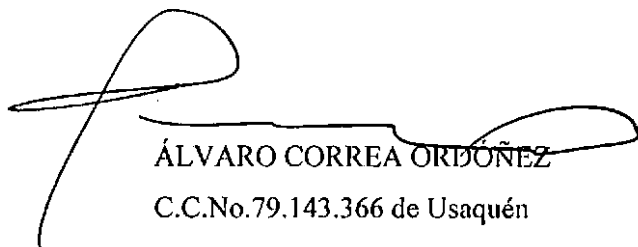
En respuesta a las observaciones de su Despacho el solicitante ha decidido presentar un nuevo capítulo reivindicatorio mucho más limitado y en donde se han eliminado las reivindicaciones 16 a 18 y 21 y las dirigidas a ácidos nucleicos, además de otras, y, adicionalmente, se ha eliminado los porcentajes de homología, con el fin de hacer expedito el trámite y que se proceda a la concesión de la presente invención.

De acuerdo con lo anterior en nuevo capítulo reivindicatorio solo posee 18 reivindicaciones.

Por otro lado el solicitante ha decidido presentar una solicitud divisional que esta dirigida específicamente a las reivindicaciones que pretender proteger los ácidos nucleicos.

En virtud de lo anterior, solicito que se acepten las razones expuestas en el presente documento y en consecuencia, se otorgue el privilegio de patente de invención para el invento que se tramita en este expediente.

Atentamente,



ÁLVARO CORREA ORDÓÑEZ
C.C.No.79.143.366 de Usaquén
T.P.20.281

Anexos: Capítulo reivindicatorio modificado
 Recibo por presentación de solicitud divisional
 Formulario solicitud divisional
 Una solicitud divisional

RAC/BOGDMS-747106-V1-P2006_000264-0820.DOC

REIVINDICACIONES (Original)

1. Un anticuerpo aislado que se une a un IL-13 con un KD de menos de 10^{-7} que comprende regiones variables de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera, caracterizado porque:

La cadena pesada comprende una región determinante complementaria (CDR) 1 pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácido mostrada en la SEQ ID No.: 15, una VH CDR2 que tiene la secuencia de aminoácido que se muestra en la SEQ ID No.: 16, y una VH CDR3 que tiene la secuencia de aminoácido que se muestra en la SEQ ID No.: 17, o una secuencia de aminoácido que difiere en menos de tres sustituciones, inserciones, o supresiones de la secuencia de aminoácido de la SEQ ID Nos.: 15 a 17; y

la cadena ligera comprende una CDR1 ligera variable (VL) que tiene la secuencia de aminoácido mostrada en la SEQ ID No.: 18, una VL CDR2 que tiene la secuencia de aminoácido que se muestra en la SEQ ID No.: 19, y una VL CDR3 que tiene la secuencia de aminoácido que se muestra en la SEQ ID No.: 20, o una secuencia de aminoácido que difiere en menos de tres sustituciones, inserciones, o supresiones de la secuencia de aminoácido de la SEQ ID No.: 18 a 20.

2. El anticuerpo de la reivindicación 1, caracterizado porque las sustituciones comprenden una sustitución conservadora en una o más de las posiciones del aminoácido 2, 3, ó 9 de la SEQ ID No.: 15; 1, 5, 12 o 13 de la SEQ ID No.: 16; 1, 6, 10, 13 o 16 de la SEQ ID No.: 18; 2, 4, 5 o 6 de la SEQ ID No.: 19; o 2, 3, o 4 de la SEQ ID No.: 20.

3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque la región VH comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que

consiste de la SEQ ID Nos.: 50 – 82, 130, 143, 147, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173 y 175.

4. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la región VL comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID Nos.: 30 – 38, 133, 145, 149 y 153.

5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la región VH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No.: 173 y la región VL comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID No.: 153.

6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 caracterizado porque comprende regiones de estructura de las regiones de estructura VH FR1, FR2 y FR3 codificadas mediante el gen de la línea germinal DP-54 o DPK-9.

7. El anticuerpo de la reivindicación 3 o 4, caracterizado porque el anticuerpo tiene sustituciones conservadoras en una o mas de las siguientes posiciones Kabat: 2, 4, 6, 25, 36, 37, 39, 47, 48, 93, 94, 103, 104, 106 y 107 de la SEQ ID No.: 173.

8. El anticuerpo de una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el anticuerpo es un Fab, F(ab')₂, Fv, o scFv.

9. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el anticuerpo es humanizado, humano o quimérico.

10. El anticuerpo de una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque el anticuerpo comprende, además, una región constante de inmunoglobulina.

11. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la cadena pesada comprende, además, la secuencia de aminoácido de la SEQ ID No.: 128.

12. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque la cadena ligera comprende, además, la secuencia de aminoácido de los residuos 134-219 de las SEQ ID No.: 177.

13. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque comprende un anticuerpo humanizado que consiste de una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácido de las SEQ ID No.: 176 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácido de la SEQ ID No.: 177.

14. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque el anticuerpo reconoce un epítipo en el IL-13 humano que comprende los residuos de aminoácido 116, 117, 118, 122, 123, 124, 125, 126, 127 y 128 del IL-13 humano (SEQ ID No.: 178).

15. Un fragmento que se une a antígeno del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque el fragmento se une al IL-13 humano con un KD de menos de 10^{-7} M.

16. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende un anticuerpo o un fragmento que se une a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y un portador farmacéuticamente aceptable.

17. La composición farmacéutica de la reivindicación 16, caracterizada porque se adapta a administración subcutánea, inhalación o tópica.

18. Un método para detectar la presencia de IL-13 en una muestra, el método caracterizado porque comprende:

- a. poner en contacto la muestra con el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15; y
- b. detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo y la muestra, en donde la formación del complejo en la muestra es indicativa de la presencia de IL-13 en la muestra.

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

FORMULARIO UNICO DE CONVERSION, DIVISION Y FUSION DE
SOLICITUDES
2000-14

①

SOLICITUD DE

☐ Conversión

☒ División

☐ Fusión

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Registro de Diseño Industrial

☐ Esquema de trazado para Circuitos Integrados

②

SOLICITANTE

Nombre: Wyeth
Dirección: Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940
Estados Unidos
Teléfono: _____ Fax: _____
E-Mail: _____
Domicilio: Estados Unidos

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Número _____

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: Alvaro Correa Ordoñez
Dirección: Avenida 82 No. 10-62 Piso 6
Bogotá, Colombia
Teléfono: 6341500 Fax: 3762211
E-Mail: office.bogota@bakernet.com

IDENTIFICACION

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Número 79143366 TP 28281

④

CONVERSION

Expediente No. _____
De: _____
A: _____

⑤

DIVISION

Expediente No. 06.125.972
No. De divisionales 1

⑥

FUSION

Expediente No. _____
Expediente No. _____

⑦

Comprobante de pago No. 11-0064197, 11-0053590, 11-53596, 11-64117 Fecha: 02-06-2011, 01-07-2011, 02-06-2011, 01-07-2011

⑧

Anexos:

☒ Comprobante de pago de la tasa

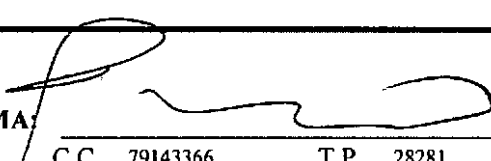
☐ Poderes, si fuere el caso

☐ Certificado de existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas

☐ Copia de la solicitud divisional

⑨

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

FIRMA: 

C.C. 79143366

T.P. 28281

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

2011/0119

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0064197

Bogotá D.C., Julio 01 de 2011 - 14:27 42

RECIBIDO DE : BAKER & MCKENZIE NI 900.034.906

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325065742	01/07/2011	95.266.009.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	6.000.00	6.000.00
				\$6.000.00

SON: **SEIS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-125972- -00007-0000

Fecha: 2011-07-13 16:49:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 208

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

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

Julio 1 de 2011 - 14:42:44

2011/0090

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
-/-

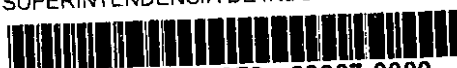
Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 0053590
		Bogotá D.C., Junio 02 de 2011 - 16:48:12

RECIBIDO DE : BAKER & MCKENZIE					NI 900.034.906	
*** Soporte del Pago ***						
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VB PAGO	
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	403018361	02/06/2011	62.503.000.00	

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-08	PRORROGA DE TERMINOS	1608 N.CREACION PRORROGA DE TERMINOS O PLAZO ADICIONAL	86.000.00	86.000.00
				\$86.000.00
=====				

SON: **OCHENTA Y SEIS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 06-125972- -00007-0000
Fecha: 2011-07-13 16:49:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 208

2011/0094

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 0053596
		Bogotá D.C., Junio 02 de 2011 - 16:48:12

RECIBIDO DE : BAKER & MCKENZIE					NI 900.034.906	
*** Soporte del Pago ***						
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO	
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	403018361	02/06/2011	62.503.000.00	
*** Conceptos Pagados ***						
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		Vr. LINDITARIO	Vr. CONCEPTO	
1 50005-01-03	CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICACIONES	EN CREACION CORRECCION A SOLICITUD EN TRAMITE / MODIFICA		118.000.00	118.000.00	
					\$118.000.00	
=====						

SON: **CIENTO DIECIOCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 06-125972- -00007-0000
Fecha: 2011-07-13 16:49:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 208

2011/0112

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 0064117
		Bogotá D.C., Julio 01 de 2011 - 14:27:42

RECIBIDO DE : BAKER & MCKENZIE NI 900.034.906

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325065742	01/07/2011	95.266.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1642 S.DISTINTIVO CAMBIOO TITULARIDAT-TRANSFERENCIA INSCRIPC	361.000.00	361.000.00
			\$361.000.00

SON: **TRESCIENTOS SESENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 06-125972- -00007-0000
Fecha: 2011-07-13 16:49:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 208

ANTICUERPOS QUE SE UNEN A IL-13

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La interleucina-13 (IL-13) es una citosina secretada por
5 los linfocitos T y las células cebada (McKenzie et al. (1993)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 3735-39; Bost et al. (1996)
Immunology 87: 633-41). IL-13 comparte varias actividades
biológicas con la IL-4. Por ejemplo, la IL-4 ó IL-13 pueden
causar que el isotipo IgE se intercambie en las células B
10 (Tomkinson et al. (2001) *J. Immunol.* 166: 5792-5800). Además,
los niveles aumentados de la superficie celular CD23 y el
CD23 sérico (sCD23) se han reportado en pacientes asmáticos
(Sanchez-Guerrero et al. (1994) *Allergy* 49: 587-92; DiLorenzo
et al. (1999) *Allergy Asthma Proc.* 20:119-25). Además, la IL-
15 4 ó IL-13 pueden sobre-regular la expresión de la clase II de
MHC y el receptor de IgE de baja afinidad (CD23) sobre las
células B y los monocitos, lo que resulta en la presentación
del antígeno mejorada y la función del macrofago regulada
(Tomkinson et al., *supra*). De manera importante, la IL-4 ó
20 IL-13 pueden elevar la expresión de VCAM-1 sobre las células
endoteliales, lo que facilita el restablecimiento
preferencial de los eosinófilos (y las células T) a los
tejidos del conducto aéreo (Tomkinson et al., *supra*). La IL-4
ó IL-13 también pueden elevar la secreción de mucosa del
25 conducto aéreo, lo que puede exacerbar la sensibilidad del

conducto aéreo (Tomkinson et al., *supra*). Estas observaciones sugieren que aunque la IL-13 no es necesaria para, o aun incapaz de, inducir el desarrollo de Th2, la IL-13 puede ser un papel clave en el desarrollo de eosinofilia del conducto
5 aéreo y AHR (Tomkinson et al., *supra*, Wills-Karp et al., (1998) *Science* 282:2258-61).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Se ha descubierto, *inter alia*, agentes que se unen a IL-
10 13, en particular, moléculas de anticuerpos anti-IL-13 que se unen al IL-13 de humano y/o IL-13 de mono cinomolgo, con elevada afinidad y especificidad. En una modalidad, las moléculas del anticuerpo reducen por lo menos la actividad asociada con IL-13, por ejemplo, modulación de una afección
15 inflamatoria. Por ejemplo, las moléculas del anticuerpo anti-IL-13 pueden unirse a IL-13 y modular, por ejemplo, inhibir, una interacción (por ejemplo, unión) entre IL-13 y un receptor de IL-13, por ejemplo, receptor $\alpha 1$ de IL-13 ("IL-13R $\alpha 1$ "), receptor $\alpha 2$ de IL-13 ("IL-13R $\alpha 2$ ") y/o la cadena alfa
20 del receptor de interleucina-4 ("IL-4R α "), por lo que se reduce o previene la transducción de señal.

Un agente de unión de IL-13, tal como una molécula de anticuerpo de anti-IL-13 puede usarse para modular (por ejemplo inhibir) por lo menos una actividad asociada con IL-
25 13 *in vivo*. Los agentes de unión de la IL-13 pueden usarse

para tratar o prevenir un trastorno asociado con la IL-13 o para mejorar por lo menos un síntoma del mismo. Ejemplos de los trastornos asociados con la IL-13 incluyen trastornos inflamatorios (por ejemplo, inflamación pulmonar), trastornos respiratorios (por ejemplo, asma, incluyendo asma alérgica y no alérgica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD)), así como las condiciones que involucran la inflamación del conducto aéreo, eosinofilia, trastornos fibróticos (por ejemplo, fibrosis quística, fibrosis hepática y fibrosis pulmonar), esclerodermia, producción de moco en exceso; trastornos atópicos (por ejemplo, dermatitis atópica, urticaria, eczema, rinitis alérgica y enterogastritis alérgica), un cáncer asociado con IL-13 (por ejemplo, una leucemia, glioblastoma o linfoma, por ejemplo, linfoma de Hodgkin), trastornos gastrointestinales (por ejemplo, enfermedades del intestino inflamatorias), trastornos hepáticos (por ejemplo, cirrosis) e infecciones virales.

Un agente de unión de IL-13 puede ser una proteína, por ejemplo, una molécula de anticuerpo, un péptido, o un dominio de andamiaje, que interactúa con, por ejemplo, se une a e/o inhibe IL-13, en particular, IL-13 de mamífero, por ejemplo, IL-13 de humano o primate no humano. La molécula de anticuerpo puede ser una molécula de anticuerpo aislado. En una modalidad, el agente de unión es un antagonista, por ejemplo, un agente de unión que neutraliza, reduce e/o inhibe

00127

una o más actividades asociadas con IL-13, incluyendo, pero no se limitan a, la inducción de la expresión de CD23; producción de IgE por las células B humanas; fosforilación de un factor de transcripción, por ejemplo, proteína STAT (por ejemplo, proteína STAT6); eosinofilia inducida por antígeno *in vivo*; broncoconstricción inducida por antígeno *in vivo*; o hiper-reactividad de las vías respiratorias inducidas por fármacos *in vivo*, entre otras. Por ejemplo, el agente de unión tiene un efecto estadísticamente significativo en una o más de las pruebas descritas en la presente. Además de las moléculas de anticuerpo anti-IL-13, otros agentes de unión de la IL-13 que pueden usarse incluyen fusiones Fc del receptor de IL-13, otras formas solubles del receptor IL-13, formas solubles de IL-4R α , anticuerpos que unen a IL-13R y otras moléculas que inhiben la interacción entre la IL-13 y uno de sus receptores.

En un aspecto, la invención caracteriza un agente de unión de IL-13 que une a la IL-13, por ejemplo, con una afinidad que corresponde a una K_D menor de $5 \times 10^{-7} M$, $1 \times 10^{-7} M$, 5×10^{-8} , 1×10^{-8} , 5×10^{-9} , 1×10^{-9} , más típicamente menor de 5×10^{-10} , 1×10^{-10} , $5 \times 10^{-11} M$, $1 \times 10^{-11} M$ o mejor. El agente de unión de IL-13 puede ser, por ejemplo, una molécula de anticuerpo que incluye la primera y segunda secuencias del dominio variable de inmunoglobulina que puede incluir por lo menos una porción suficiente de un dominio variable de inmunoglobulina para

formar un sitio de unión al antígeno que se une a IL-13. Normalmente, la primera y segunda secuencias del dominio variable de inmunoglobulina corresponden a secuencias del dominio variable de inmunoglobulina de una cadena pesada y ligera, por ejemplo, una cadena pesada y ligera compatible de otro modo o aparejada.

En una modalidad, el agente de unión de la IL-13 une a uno o más de los siguientes péptidos:

FVKDLLVHLKKLFREGQ₁₃₀FN (SEC ID NO: 1),

10 FVKDLLVHLKKLFREGR₁₃₀FN (SEC ID NO: 2),

FVKDLLLHLKKLFREGQ₁₃₀FN (SEC ID NO: 3),

FVKDLLLHLKKLFREGR₁₃₀FN (SEC ID NO: 4),

FVKDLLVHLKKLFREG (SEC ID NO: 5), y

15 FVKDLLLHLKKLFREG (SEC ID NO: 6), por ejemplo, como péptidos aislados, o a un aminoácido dentro de tal péptido cuando el péptido está doblado en la estructura de una proteína de IL-13 madura.

Por ejemplo, el agente de unión de la IL-13 puede unirse a un péptido o a IL-13 con afinidad comparable (por ejemplo, 20 afinidades que difieren por menos de un factor de 8.5, 4 ó 2) sin importar si R ó Q está presente en la posición 130. En particular, el agente de unión de IL-13 puede unirse con igual afinidad al péptido o a la IL-13 sin considerar si R ó Q está presente en la posición 130.

25 El agente de unión de la IL-13 puede unirse a uno o más

de los siguientes péptidos:

KDLLVHLKKLFREGQFN (SEC ID NO: 7),

KDLLVHLKKLFREGRFN (SEC ID NO: 8),

KDLLLHLKKLFREGQFN (SEC ID NO: 9),

5 KDLLLHLKKLFREGRFN (SEC ID NO: 10),

KDLLVHLKKLFRE (SEC ID NO: 11),

KDLLLHLKKLFRE (SEC ID NO: 12), y

HLKKLFRE (SEC ID NO: 13), por ejemplo, como péptidos
aislados, o a un aminoácido dentro de tal péptido cuando el
10 péptido está doblado en la estructura de una proteína de IL-
13 madura. El agente de unión de la IL-13 puede unirse a un
epítipo sobre IL-13 que incluye por lo menos (por ejemplo,
uno, dos, tres o cuatro) residuos de aminoácidos de una
secuencia peptídica descrita en la presente, o un péptido
15 correspondiente que difiere en, por lo menos, aunque no más
de uno, dos o tres residuos de aminoácidos, por ejemplo, un
péptido correspondiente de IL-13 de humano.

En una modalidad, el agente de unión de la IL-13 hace
contacto (por ejemplo, hace un contacto de van der Waals con)
20 un residuo de aminoácido en la hélice D (residuos de
aminoácido 114-130) de IL-13 de longitud total (SEC ID NO: 24
ó SEC ID NO: 178), por ejemplo, uno o más de los siguientes
residuos de aminoácidos: 116, 117, 118, 122, 123, 124, 125,
126, 127 ó 128 de la SEC ID NO: 24 o la SEC ID NO: 178. En
25 una modalidad, el agente de unión de IL-13 se une a un

epítopo sobre la hélice D, o un epítopo que incluye por lo menos un aminoácido (por ejemplo, por lo menos, dos, tres, o cuatro) en la hélice D y/o puede inhibir la interacción de IL-13 con uno o ambos de IL-13R α 1 y/o IL-13R α 2. La hélice D
5 corresponde a los residuos de aminoácido 95-111 de IL-13 madura, procesada (SEC ID NO: 14 o SEC ID NO: 124).

En una modalidad, el agente de unión de IL-13 se une en forma específica a un epítopo, por ejemplo, un epítopo lineal o conformacional, de IL-13, por ejemplo, en particular, IL-13
10 de mamífero, por ejemplo, de humano. Por ejemplo, el agente de unión de IL-13 compite con MJ 2-7 y/o C65 por la unión a IL-13, por ejemplo, a la IL-13 humana. El agente de unión de IL-13 puede inhibir en forma competitiva la unión de MJ 2-7 y/o C65 a IL-13. El agente de unión de la IL-13 puede unirse
15 en forma específica por lo menos a un aminoácido en un epítopo definido por la unión de MJ 2-7 a la IL-13 humana o un epítopo definido por la unión de C65 a la IL-13 humana. En una modalidad, el agente de unión de la IL-13 puede unirse a un epítopo que se superpone con la de MJ 2-7 ó C65, por
20 ejemplo, incluye por lo menos, dos, tres o cuatro aminoácidos en común, o un epítopo que, cuando se une, previene estéricamente la interacción con MJ 2-7 ó C65.

Incluso en otra modalidad, el agente de unión de IL-13 se une en forma específica por lo menos a un aminoácido en un
25 epítopo definido por IL-13R α 1 que se une a la IL-13 humana o

un epítopo definido por IL-13R α 2 que se une a la IL-13 humana, o un epítopo que se superpone con tales epítopos. La proteína puede competir con IL-13R α 1 y/o IL-13R α 2 por la unión a IL-13, por ejemplo, a la IL-13 humana. La proteína
5 puede inhibir en forma competitiva la unión de IL-13R α 1 y/o IL-13R α 2 a IL-13. El agente de unión de IL-13 puede interactuar con un epítopo sobre IL-13 que, cuando se une, previene estéricamente la interacción con IL-13R α 1 y/o IL-13R α 2.

10 En una modalidad, agente de unión de IL-13 tiene una actividad funcional comparable a IL-13R α 2, por ejemplo, el agente de unión de IL-13 reduce o inhibe la interacción de IL-13 con IL-13R α 1. El agente de unión de IL-13 puede evitar la formación de un complejo entre IL-13 y IL-13R α 1 o separar
15 o desestabilizar un complejo entre IL-13 y IL-13R α 1. En una modalidad, el agente de unión de IL-13 inhibe la formación de complejos ternarios, por ejemplo, la formación de un complejo entre IL-13, IL-13R α 1 e IL4-R.

20 En una modalidad, agente de unión de IL-13 puede inhibir una o más actividades asociadas con IL-13 con una IC₅₀ de aproximadamente 50 nM a 5 pM, normalmente aproximadamente 100 a 250 pM o menos, es decir, mejor inhibición. Los agentes que inhiben por lo menos una actividad de la IL-13 se consideran antagonistas de IL-13. En una modalidad, agente de unión de
25 IL-13 puede asociarse con IL-13 con una cinética en el

intervalo de 10^3 a 10^8 $M^{-1}s^{-1}$, normalmente 10^4 a 10^7 $M^{-1}s^{-1}$. Incluso en otra modalidad, el agente de unión de IL-13 tiene una cinética de disociación en el intervalo de 10^{-2} a 10^{-6} s^{-1} , normalmente 10^{-2} a 10^{-5} s^{-1} . En una modalidad, el agente de unión de IL-13 se une a IL-13, por ejemplo, IL-13 humana, con una afinidad y/o cinética similar al anticuerpo monoclonal MJ 2-7 ó C65, o sus formas modificadas, por ejemplo, formas quiméricas o sus formas humanizadas (por ejemplo, una forma humanizada descrita en la presente). La afinidad y la unión cinética del anticuerpo anti-IL-13 o su fragmento puede evaluarse usando, por ejemplo, tecnología de biosensor (BIAcore™).

El agente de unión de IL-13 puede ser una molécula de anticuerpo, por ejemplo, fragmento que se une al antígeno de un anticuerpo (tal como Fab, F(ab')₂, Fv o un fragmento de Fv de cadena simple) o un anticuerpo que incluye un dominio Fc. Normalmente, una molécula de anticuerpo anti-IL-13 es monoclonal o una mono específica.

El agente de unión de IL-13, particularmente una molécula de anticuerpo anti-IL-13, puede ser efectivamente humano, humano, humanizado, con injerto de CDR, quimérico, mutado, maduro con afinidad, desinmunizado, sintético o anticuerpo generado *in vitro* de otro modo. En una modalidad, el agente de unión de IL-13 es un anticuerpo humanizado. En una modalidad, el agente de unión de IL-13 no es antigénico

en los humanos o no causa una respuesta HAMA.

En una modalidad, la molécula del anticuerpo IL-13 incluye una cadena pesada y ligera. Las cadenas pesada y ligera de una molécula de anticuerpo anti-IL-13 pueden ser

5 sustancialmente de cadena completa (por ejemplo, una molécula de anticuerpo puede incluir por lo menos una, y con preferencia dos, cadenas pesadas completas, y por lo menos, y de preferencia dos, cadenas ligeras completas) o puede incluir un fragmento que se une al antígeno (por ejemplo, a

10 Fab, F(ab')₂, Fv o un fragmento de Fv de cadena simple). Incluso en otras modalidades, la molécula de anticuerpo tiene una región constante de cadena pesada elegida de, por ejemplo, las regiones constantes de cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD e IgE; en particular,

15 elegidas de, por ejemplo, las regiones constantes de cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, más en particular, las regiones constantes de cadena pesada IgG1 (por ejemplo, IgG1 de humano). Normalmente la región constante de cadena pesada es una forma humana o modificada de una región constante

20 humana (por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 5). En otra modalidad, el anticuerpo tiene una región constante de cadena ligera elegida de, por ejemplo, las regiones constantes de cadena ligera de kappa o lambda, de preferencia kappa (por ejemplo, kappa humana). En una modalidad, la

25 región constante está alterada, por ejemplo, mutada, para

modificar las propiedades de la molécula de anticuerpo (por ejemplo, para aumentar o disminuir uno o más de: unión al receptor de Fc, glucosilación del anticuerpo, el número de residuos de cisteína, función de la célula efectora, o
5 función de complemento). Por ejemplo, la región constante de IgG1 humana puede estar mutada en uno o más residuos, por ejemplo, uno o más de residuos 234 y 237, como se describe en el Ejemplo 5.

En una modalidad, el agente de unión de IL-13 (por
10 ejemplo, la molécula de unión de anti-IL-13) incluye por lo menos, dos y de preferencia tres CDR de la región variable de cadena ligera o pesada de un anticuerpo descrito en la presente, por ejemplo, MJ 2-7. Por ejemplo, la proteína incluye una o más de las siguientes secuencias dentro de la
15 región CDR:

GFNIKDTYIH (SEC ID NO: 15),

RIDPANDNIKYDPKFQG (SEC ID NO: 16),

SEENWYDFFDY (SEC ID NO: 17),

RSSQSIVHSNGNTYLE (SEC ID NO: 18),

20 KVSNRFS (SEC ID NO: 19), y

FQGSHIPYT (SEC ID NO: 20), o un CDR que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere por no más de 4, 3, 2.5, 2, 1.5, 1 ó 0.5 alteraciones (por ejemplo, sustituciones, inserciones o eliminaciones) por cada 10 aminoácidos (por ejemplo, el
25 número de diferencias es proporcional a la longitud del CDR)

relativa a una secuencia mencionada con anterioridad, por ejemplo, por lo menos una alteración aunque no más de dos, tres, o cuatro por cada CDR.

Por ejemplo, el agente de unión de IL-13 puede incluir, en la secuencia de dominio variable de la cadena ligera, por lo menos una, dos o tres de las siguientes secuencias dentro de una región de CDR:

RSSQSIVHSNGNTYLE (SEC ID NO: 18),
KVSNRFS (SEC ID NO: 19), y

10 FQGSHIPYT (SEC ID NO: 20), o una secuencia de aminoácidos que difiere por no más de 4, 3, 2.5, 2, 1.5, 1 ó 0.5 sustituciones, inserciones o eliminaciones por cada 10 aminoácidos con relación a una secuencia mencionada con anterioridad.

15 El agente de unión de IL-13 puede incluir, en la secuencia del dominio variable de cadena pesada, por lo menos una, dos o tres de las siguientes secuencias dentro de una región de CDR:

GFNIKDTYIH (SEC ID NO: 15),

20 RIDPANDNIKYDPKFQG (SEC ID NO: 16), y
SEENWYDFFDY (SEC ID NO: 17), o una secuencia de aminoácidos que difiere por no más de 4, 3, 2.5, 2, 1.5, 1 ó 0.5 sustituciones, inserciones o eliminaciones por cada 10 aminoácidos relativa a una secuencia mencionada con anterioridad. La región de CDR3 de cadena pesada puede ser

25

menor de 13 o menor de 12 aminoácidos de longitud, por ejemplo, 11 aminoácidos de longitud (ya sea usando numeración de Chothia o de Kabat)

En otro ejemplo, el agente de unión de IL-13 puede incluir, en la secuencia de dominio variable de la cadena ligera, por lo menos una, dos o tres de las siguientes secuencias dentro de una región de CDR (los aminoácidos entre paréntesis representan alternativas para una posición particular):

10 (i) (RK)-S-S-Q-S-(LI)-(KV)-H-S-(ND)-G-N-(TN)-Y-L-(EDNQYAS) (SEC ID NO: 25) ó (RK)-S-S-Q-S-(LI)-(KV)-H-S-(ND)-G-N-(TN)-Y-L-E (SEC ID NO: 26), o (RK)-S-S-Q-S-(LI)-(KV)-H-S-N-G-N-T-Y-L-(EDNQYAS) (SEC ID NO: 21),

(ii) K-(LVI)-S-(NY)-(RW)-(FD)-S (SEC ID NO: 27), o K-
15 (LV)-S-(NY)-R-F-S (SEC ID NO: 22), y

(iii) Q-(GSA)-(ST)-(HEQ)-I-P (SEC ID NO: 28), o F-Q-(GSA)-(SIT)-(HEQ)-(IL)-P (SEC ID NO: 23) o Q-(GSA)-(ST)-(HEQ)-I-P-Y-T (SEC ID NO: 193) o F-Q-(GSA)-(SIT)-(HEQ)-(IL)-P-Y-T (SEC ID NO: 29).

20 En una modalidad preferida, el agente de unión de IL-13 incluye la totalidad de seis CDR de MJ 2-7 o CDR estrechamente relacionado, por ejemplo, CDR que son idénticos o que tienen por lo menos una alteración de aminoácidos, aunque no más de dos, tres o cuatro alteraciones (por
25 ejemplo, sustituciones, eliminaciones, o inserciones). La

proteína puede incluir por lo menos dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete residuos de aminoácidos que ponen en contacto IL-13 de MJ 2-7.

Incluso en otro ejemplo, el agente de unión de IL-13 incluye por lo menos una, dos, o tres regiones de CDR que tienen las mismas estructuras canónicas y las regiones de CDR correspondientes de MJ 2-7, por ejemplo, por lo menos CDR1 y CDR2 de los dominios variables de cadena pesada y/o ligera de MJ 2-7.

10 El agente de unión de IL-13 puede incluir una de las siguientes secuencias:

· DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQS
PQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
FQGSHIPYT SEC ID NO: 30)

15 · DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWFQQRPGQS
PRRLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
FQGSHIPYT (SEC ID NO: 31)

· DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQS
PQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
20 FQGSHIPYT (SEC ID NO. 32)

· DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQP
PQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
FQGSHIPYT (SEC ID NO: 33)

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQS
25 PQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC

FQGSHIPYT (SEC ID MO: 34)

· DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWLQQRPGQP
PRLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC

FQGSHIPYT (SE ID NO: 35)

5 · DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSIVHSNGNTYLEWYQQKPGKA
PKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC

FQGSHIPYT (SEC ID NO: 36)

· DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQS
PRRLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC

10 FQGSHIPYT (SEC ID NO: 37)

· DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQS
PKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC

FQGSHIPYT (SEC ID NO: 38)

o una secuencia que tiene menos de ocho, siete, seis,
15 cinco, cuatro, tres o dos alteraciones (por ejemplo,
sustituciones, inserciones o eliminaciones, por ejemplo,
sustituciones conservadoras o una sustitución para un residuo
de aminoácidos en una posición correspondiente en MJ 2-7).
Ejemplos de las sustituciones se encuentran en una de las
20 siguientes posiciones de Kabat: 2, 4, 6, 35, 36, 38, 44, 47,
49, 62, 64-69, 85, 87, 98, 99, 101, y 102. Las sustituciones
pueden, por ejemplo, sustituir un aminoácido en una posición
correspondiente de MJ 2-7 en una región de marco humano.

El agente de unión de IL-13 también puede incluir una de
25 las siguientes secuencias:

· DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISISC - (RK) - S-S-Q-S - (LI) - (KV) - H-S -
(ND) - G-N - (TN) - Y-L - (EDNQYAS) WYLQKPGQSPQLLIYK - (LVI) - S - (NY) -
(RW) - (FD) - SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC F-Q - (GSA) - (SIT) -
(HEQ) - (IL) - P (SEC ID NO: 39)

5 · DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC - (RK) - S-S-Q-S - (LI) - (KV) - H-S -
(ND) - G-N - (TN) - Y-L - (EDNQYAS) WFQQRPGQSPRRLIYK - (LVI) - S - (NY) -
(RW) - (FD) - SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCF-Q - (GSA) - (SIT) -
(HEQ) - (IL) - P (SEC ID NO: 40)

10 · DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC - (RK) - S-S-Q-S - (LI) - (KV) - H-S -
(ND) - G-N - (TN) - Y-L - (EDNQYAS) WYLQKPGQSPQLLIYK - (LVI) - S - (NY) -
(RW) - (FD) - SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCF-Q - (GSA) - (SIT) -
(HEQ) - (IL) - P (SEC ID NO: 41)

15 · DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC (RK) - S-S-Q-S - (LI) - (KV) - H-S -
(ND) - G-N - (TN) - Y-L - (EDNQYAS) WYLQKPGQPPQLLIYK - (LVI) - S - (NY) -
(RW) - (FD) - SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCF-Q - (GSA) - (SIT) -
(HEQ) - (IL) - P (SEC ID NO: 42)

20 · DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISISC (RK) - S-S-Q-S - (LI) - (KV) - H-S -
(ND) - G-N - (TN) - Y-L - (EDNQYAS) WYLQKPGQSPQLLIYK - (LVI) - S - (NY) -
(RW) - (FD) - SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCF-Q - (GSA) - (SIT) -
(HEQ) - (IL) - P (SEC ID NO: 43)

· DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISC (RK) - S-S-Q-S - (LI) - (KV) - H-S -
(ND) - G-N - (TN) - Y-L - (EDNQYAS) WLQQRPGQPPRLLIYK - (LVI) - S - (NY) -
(RW) - (FD) - SGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCF-Q - (GSA) - (SIT) -
(HEQ) - (IL) - P (SEC ID NO: 44)

25 · DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (RK) - S-S-Q-S - (LI) - (KV) - H-S -

(ND) -G-N- (TN) -Y-L- (EDNQYAS) WYQQKPGKAPKLLIYK- (LVI) -S- (NY) -
 (RW) - (FD) -SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCF-Q- (GSA) - (SIT) -
 (HEQ) - (IL) -P (SEC ID NO. 45)

5 DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISC (RK) -S-S-Q-S- (LI) - (KV) -H-S-
 (ND) -G-N- (TN) -Y-L- (EDNQYAS) WYLQKPGQSPKLLIYK- (LVI) -S- (NY) -
 (RW) - (FD) -SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCF-Q- (GSA) - (SIT) -
 (HEQ) - (IL) -P (SEC ID NO: 46)

o una secuencia que tiene menos de ocho, siete, seis, cinco, cuatro, tres, o dos alteraciones (por ejemplo, sustituciones, inserciones o eliminaciones, por ejemplo, sustituciones conservadoras o una sustitución para un residuo de aminoácidos en una posición correspondiente en MJ 2-7) en la región del marco. Ejemplos de las sustituciones se encuentran en uno o más de las siguientes posiciones de
 15 Kabat: 2, 4, 6, 35, 36, 38, 44, 47, 49, 62, 64-69, 85, 87, 98, 99, 101 y 102. Las sustituciones pueden, por ejemplo, sustituir un aminoácido en una posición correspondiente de MJ 2-7 en una región de marco humano. Las secuencias también pueden seguirse mediante el dipéptido Tyr-Thr. La región FR4
 20 puede incluir, por ejemplo, la secuencia FGGGTKVEIKR (SEC ID NO: 47).

En otro ejemplo, el agente de unión de IL-13 puede incluir, en la secuencia del dominio variable de cadena pesada, por lo menos uno, dos o tres de las siguientes
 25 secuencias dentro de una región de CDR (los aminoácidos entre

paréntesis representan alternativas para una posición particular):

- (i) G-(YF)-(NT)-I-K-D-T-Y-(MI)-H (SEC ID NO: 48),
- (ii) (WR)-I-D-P-(GA)-N-D-N-I-K-Y-(SD)-(PQ)-K-F-Q-G (SEC ID NO: 49), y
- (iii) SEENWYDFFDY (SEC ID NO: 17).

La proteína puede incluir una de las siguientes secuencias:

- QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIHWVRQAPGQGLEWM
10 GRIDPANDNIKYDPKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSLRSDDTAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 50)
- QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIHWVRQAPGQRLEWM
GRIDPANDNIKYDPKFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED TAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 51)
- 15 • QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIHWVRQATGQGLEWM
GRIDPANDNIKYDPKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSED TAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 53)
- QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIHWVRQAPGQGLEWM
20 GRIDPANDNIKYDPKFQGRVTMTEDTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYC
ATSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 54)
- QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDTYIHWVRQAPGQALEWM
GRIDPANDNIKYDPKFQGRVTITRDRSMSTAYMELSSLRSED TAMY YC
ARSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 55)
- QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGFNKDTYIHWVRQAPGKGLEWM
25 GRIDPANDNIKYDPKFQGRVTMTEDTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYC

ARSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 56)

QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCASGFNIKDTYIHWVRQARGORLEWI

GRIDPANDNIKYDPKFQGRVTITRDMSTSTAYMELSSLRSED TAVYYC

AASEENWYDFFDY (SEC ID NO: 57)

5 · EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV

ARIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYC

ARSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 58)

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV

SRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYC

10 AKDSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 59)

· QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWIRQAPGKGLEWV

SRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYC

ARSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 60)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV

15 GRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTED TAVYYC

TTSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 61)

· EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV

SRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYC

ARSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 62)

20 · EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV

SRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYC

ARSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 63)

EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV

SRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYC

25 AKSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 64)

· QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
ARIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDNŠKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
AKSEENWYDFFDY (SEC ID NO. 65)

5

· QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
ARIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDNŠKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 66)

· EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
SRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDNŠKNSLYLQMNSLRTEDTALYYC
AKDSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 67)

10

· EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA~GFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
SRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDNŠKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEC ID NO. 68)

15

· EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFNIKDTYIHWFRQAPGKGLEWV
GRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDGSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYC
TRSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 69)

· EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEVY
SRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDNŠKNTLYLQMGSLRAEDMAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 70)

20

· EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWI
GRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDNŠKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 71)

· EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
ARIDPANDNIKYDPKFQGKATISRDNŠKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 72)

25

· EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV

ARIDPANDNIKYDPKFQGRFTISADNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEC ID NO. 73)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
GRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
5 ARSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 74)

· EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
ARIDPANDNIKYDPKFQGRFTISADNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 75)

· EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWI
10 GRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISADNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 76)

· EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
GRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISADNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 77)

· EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
15 ARIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDNKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 78)

· EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
GRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISADNAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYC
20 ARSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 79)

· EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWI
GRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISADNAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 80)

· EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTGSGFNKDTYIHWVRQAPGKGLEWI
25 GRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISADNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC

ARSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 81)

· EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLEWI

GRIDPANDNIKYDPKFQ GKATITADTSSNTAYLQLNSLTSED TAVYYC

ARSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 82)

5 o una secuencia que tiene menos de ocho, siete, seis, cinco, cuatro, tres, o dos alteraciones (por ejemplo, sustituciones, inserciones o eliminaciones, por ejemplo, sustituciones conservadoras o una sustitución para un residuo de aminoácidos en una posición correspondiente en MJ 2-7).

10 Ejemplos de las sustituciones se encuentran en una o más de las siguientes posiciones de Kabat: 2, 4, 6, 25, 36, 37, 39, 47, 48, 93, 94, 103, 104, 106, y 107. Las sustituciones ejemplificativas también pueden encontrarse en una o más de las siguientes posiciones (de acuerdo con la numeración

15 secuencial): 48, 49, 67, 68, 72, y 79. Las sustituciones pueden, por ejemplo, sustituir un aminoácido en una posición correspondiente de MJ 2-7 en una región de marco humano. En una modalidad la secuencia incluye (de acuerdo con la numeración secuencial) uno o más de los siguientes: ILe en

20 48, Gly en 49, Lys en 67, Ala en 68, Ala en 72 y Ala en 79; de preferencia, por ejemplo, ILe en 48, Gly en 49, Ala en 72, y Ala en 79.

Además, los marcos de la secuencia de dominio variable de cadena pesada pueden incluir: (i) en una posición
25 correspondiente a 49, Gly; (ii) en una posición

correspondiente a 72, Ala; (iii) en las posiciones correspondientes a 48, Ile, y a 49, Gly; (iv) en las posiciones correspondientes a 48, Ile, a 49, Gly y a 72, Ala; (v) en las posiciones correspondientes a 67, Lys, a 68, Ala y a 72, Ala; y/o (vi) en las posiciones correspondientes a 48, Ile, a 49, Gly, a 72, Ala, a 79, Ala.

La proteína también puede incluir una de las siguientes secuencias:

- QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG- (YF) - (NT) - I-K-D-T-Y- (MI) -
10 H, WVRQAPGQGLEWMG (WR) - I-D-P- (GA) - N-D-N-I-K-Y- (SD) - (PQ) - K-F-Q-
GRVTMTRDTSISTAYMELSLRSDDTAVYYCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO: 83)
- QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG- (YF) - (NT) - I-K-D-T-Y- (MI) -
H, WVRQAPGQRLWMG (WR) - I-D-P- (GA) - N-D-N-I-K-Y- (SD) - (PQ) - K-F-Q-
GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO: 84)
- 15 • QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG- (YF) - (NT) - I-K-D-T-Y- (MI) -
H, WVRQATGQGLEWMG (WR) - I-D-P- (GA) - N-D-N-I-K-Y- (SD) - (PQ) - K-F-Q-
GRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO: 85)
- QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG- (YF) - (NT) - I-K-D-T-Y- (MI) -
H, WVRQAPGQGLEWMG (WR) - I-D-P- (GA) - N-D-N-I-K-Y- (SD) - (PQ) - K-F-Q-
20 GRVTMTTDTSTSTAYMELSLRSDDTAVYYCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO: 86)
- QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSG- (YF) - (NT) - I-K-D-T-Y- (MI) -
H, WVRQAPGKGLEWMG (WR) - I-D-P- (GA) - N-D-N-I-K-Y- (SD) - (PQ) - K-F-Q-
GRVTMTEDTSTDVAYMELSSLRSEDVAVYYCAT SEENWYDFFDY (SEC ID NO: 87)
- QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASG- (YF) - (NT) - I-K-D-T-Y- (MI) -

page

H, WVRQAPGQALEWMG (WR) - I - D - P - (GA) - N - D - N - I - K - Y - (SD) - (PQ) - K - F - Q -
GRVTITRDRSMSTAYMELSSLRSED TAMY YCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO: 88)

· QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASG - (YF) - (NT) - I - K - D - T - Y - (MI) -
H, WVRQAPGQGLEWMG (WR) - I - D - P - (GA) - N - D - N - I - K - Y - (SD) - (PQ) - K - F - Q -

5 GRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVY YCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO: 89)

· QMQLVQSGPEVKKPGTSVKV SCKASG - (YF) - (NT) - I - K - D - T - Y - (MI) -
H, WVRQARGQORLEWIG (WR) - I - D - P - (GA) - N - D - N - I - K - Y - (SD) - (PQ) - K - F - Q -
GRVTITRDMSTSTAYMELSSLRSED TAVY YCAA SEENWYDFFDY (SEC ID NO: 90)

· EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASG - (YF) - (NT) - I - K - D - T - Y - (MI) -
10 H, WVRQAPGKGLEWVA (WR) - I - D - P - (GA) - N - D - N - I - K - Y - (SD) - (PQ) - K - F - Q -
GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAED TAVY YCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO: 91)

· EVQLVESGGGLVQPGRSLRLS CAASG - (YF) - (NT) - I - K - D - T - Y - (MI) -
H, WVRQAPGKGLEWVS (WR) - I - D - P - (GA) - N - D - N - I - K - Y - (SD) - (PQ) - K - F - Q -
GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAED TALY YCAK DSEENWYDFFDY (SEC ID NO:

15 92)

· QVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASG - (YF) - (NT) - I - K - D - T - Y - (MI) -
H, WVRQAPGKGLEWVS (WR) - I - D - P - (GA) - N - D - N - I - K - Y - (SD) - (PQ) - K - F - Q -
GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAED TAVY YCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO: 93)

· EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASG - (YF) - (NT) - I - K - D - T - Y - (MI) -
20 H, WVRQAPGKGLEWVG (WR) - I - D - P - (GA) - N - D - N - I - K - Y - (SD) - (PQ) - K - F - Q -
GRFTISRDD SKNTLYLQMNSLKTED TAVY YCTT SEENWYDFFDY (SEC ID NO: 94)

· EVQLVESGGGVVRPGGSLRLS CAASG - (YF) - (NT) - I - K - D - T - Y - (MI) -
H, WVRQAPGKGLEWVS (WR) - I - D - P - (GA) - N - D - N - I - K - Y - (SD) - (PQ) - K - F - Q -
GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAED TALY HCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO: 95)

25 · EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASG - (YF) - (NT) - I - K - D - T - Y - (MI) -

H, WVRQAPGKGLEWVS (WR) - I - D - P - (GA) - N - D - N - I - K - Y - (SD) - (PQ) - K - F - Q -
GRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO: 96)

· EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASG - (YF) - (NT) - I - K - D - T - Y - (MI) -

H, WVRQAPGKGLEWVS (WR) - I - D - P - (GA) - N - D - N - I - K - Y - (SD) - (PQ) - K - F - Q -
5 GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK SEENWYDFFDY (SEC ID NO: 97)

· QVQLVES GGGVVQPGRSLRLSCAASG - (YF) - (NT) - I - K - D - T - Y - (MI) -

H, WVRQAPGKGLEWVA (WR) - I - D - P - (GA) - N - D - N - I - K - Y - (SD) - (PQ) - K - F - Q -
GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK SEENWYDFFDY (SEC ID NO: 98)

· QVQLVES GGGVVQPGRSLRLSCAASG - (YF) - (NT) - I - K - D - T - Y - (MI) -

10 H, WVRQAPGKGLEWVA (WR) - I - D - P - (GA) - N - D - N - I - K - Y - (SD) - (PQ) - K - F - Q -
GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO: 99)

· EVQLVES GGGVVVQPGGSLRLSCAASG - (YF) - (NT) - I - K - D - T - Y - (MI) -

H, WVRQAPGKGLEWVS (WR) - I - D - P - (GA) - N - D - N - I - K - Y - (SD) - (PQ) - K - F - Q -
GRFTISRDN SKNSLYLQMNSLRTE DTALYYCAK DSEENWYDFFDY (SEC ID NO:

15 100)

· EVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASG - (YF) - (NT) - I - K - D - T - Y - (MI) -

H, WVRQAPGKGLEWVS (WR) - I - D - P - (GA) - N - D - N - I - K - Y - (SD) - (PQ) - K - F - Q -
GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO:
101)

20 · EVQLVES GGGLVQPGRSLRLSCTASG - (YF) - (NT) - I - K - D - T - Y - (MI) -

H, WVRQAPGKGLEWVG (WR) - I - D - P - (GA) - N - D - N - I - K - Y - (SD) - (PQ) - K - F - Q -
GRFTISR DGSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCTR SEENWYDFFDY (SEC ID NO:
102)

· EVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASG - (YF) - (NT) - I - K - D - T - Y - (MI) -

25 H, WVRQAPGKGLEWVS (WR) - I - D - P - (GA) - N - D - N - I - K - Y - (SD) - (PQ) - K - F - Q -

GRFTISRDN SKNTLYLQM GSLRAEDMAVYYCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO:
103)

· EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASG- (YF) - (NT) - I-K-D-T-Y- (MI) -
H, WVRQAPGKGLEWIG (WR) - I-D-P- (GA) - N-D-N-I-K-Y- (SD) - (PQ) - K-F-Q-

5 GRFTISRDN AKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO:
104)

· EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASG- (YF) - (NT) - I-K-D-T-Y- (MI) -
H, WVRQAPGKGLEWVA (WR) - I-D-P- (GA) - N-D-N-I-K-Y- (SD) - (PQ) - K-F-Q-

GKATISRDN AKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO:
105)

· EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASG- (YF) - (NT) - I-K-D-T-Y- (MI) -
H, WVRQAPGKGLEWVA (WR) - I-D-P- (GA) - N-D-N-I-K-Y- (SD) - (PQ) - K-F-Q-

GRFTISADN AKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO.
106)

15 · EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASG- (YF) - (NT) - I-K-D-T-Y- (MI) -
H, WVRQAPGKGLEWVG (WR) - I-D-P- (GA) - N-D-N-I-K-Y- (SD) - (PQ) - K-F-Q-

GRFTISRDN AKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO.
107)

· EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASG- (YF) - (NT) - I-K-D-T-Y- (MI) -
20 H, WVRQAPGKGLEWVA (WR) - I-D-P- (GA) - N-D-N-I-K-Y- (SD) - (PQ) - K-F-Q-

GKATISADN AKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO:
108)

· EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASG- (YF) - (NT) - I-K-D-T-Y- (MI) -
H, WVRQAPGKGLEWIG (WR) - I-D-P- (GA) - N-D-N-I-K-Y- (SD) - (PQ) - K-F-Q-

25 GRFTISADN AKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO:

109)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG- (YF) - (NT) - I-K-D-T-Y- (MI) -
H, WVRQAPGKGLEWVG (WR) - I-D-P- (GA) - N-D-N-I-K-Y- (SD) - (PQ) - K-F-Q-
GRFTISADNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO:

5 110)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG- (YF) - (NT) - I-K-D-T-Y- (MI) -
H, WVRQAPGKGLEWVA (WR) - I-D-P- (GA) - N-D-N-I-K-Y- (SD) - (PQ) - K-F-Q-
GRFTISRDNKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO:

111)

10

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG- (YF) - (NT) - I-K-D-T-Y- (MI) -
H, WVRQAPGKGLEWVG (WR) - I-D-P- (GA) - N-D-N-I-K-Y- (SD) - (PQ) - K-F-Q-
GRFTISADNAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO:

112)

15

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG- (YF) - (NT) - I-K-D-T-Y- (MI) -
H, WVRQAPGKGLEWIG (WR) - I-D-P- (GA) - N-D-N-I-K-Y- (SD) - (PQ) - K-F-Q-
GRFTISADNAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO:

113)

20

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTGSG- (YF) - (NT) - I-K-D-T-Y- (MI) -
H, WVRQAPGKGLEWIG (WR) - I-D-P- (GA) - N-D-N-I-K-Y- (SD) - (PQ) - K-F-Q-
GRFTISADNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO:

114)

25

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSG- (YF) - (NT) - I-K-D-T-Y- (MI) -
H, WVKQRPEQGLEWIG (WR) - I-D-P- (GA) - N-D-N-I-K-Y- (SD) - (PQ) - K-F-Q-
GKATITADTSSNTAYLQLNSLTSED TAVYYCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO:

115)

o una secuencia que tiene menos de ocho, siete, seis, cinco, cuatro, tres o dos alteraciones (por ejemplo, sustituciones, inserciones o eliminaciones, por ejemplo, sustituciones conservadoras o una sustitución para un residuo de aminoácidos en una posición correspondiente en MJ 2-7) en la región del marco. Ejemplos de las sustituciones se encuentran en uno o más de las siguientes posiciones de Kabat: 2, 4, 6, 25, 36, 37, 39, 47, 48, 93, 94, 103, 104, 106 y 107. Las sustituciones pueden, por ejemplo, sustituir un aminoácido en una posición correspondiente de MJ 2-7 en una región de marco humano. La región FR4 puede incluir, por ejemplo, la secuencia WGQGTTTLTVSS (SEC ID NO: 116) ó WGQGTLLTVSS (SEC ID NO: 117).

En una modalidad, la secuencia de dominio variable de cadena pesada es por lo menos 90, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% idéntica o idéntica al dominio variable de la cadena pesada de V2.1, V2.2, V2.3, V2.4, V2.5, V2.6, V2.7 ó V2.11. En una modalidad, la secuencia de dominio variable de cadena pesada incluye una secuencia de dominio variable que comprende una secuencia codificada por un ácido nucleico que se hibrida en condiciones de rigurosidad alta al complemento de un ácido nucleico que codifica la región variable de la cadena pesada de V2.1, V2.2, V2.3, V2.4, V2.5, V2.6, V2.7 ó V2.11. En una modalidad, la secuencia de dominio variable de cadena ligera es por lo menos 90, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98,

99% idéntica o idéntica al dominio variable de la cadena pesada de V2.11. En una modalidad, la secuencia de dominio variable de cadena ligera comprende una secuencia codificada por un ácido nucleico que se hibrida en condiciones de rigurosidad alta al complemento de un ácido nucleico que codifica el dominio variable de cadena ligera de V2.11 u otro dominio variable de cadena ligera de la presente.

En una modalidad el marco de cadena pesada (por ejemplo, FR1, FR2, FR3, en forma individual, o una secuencia que abarca FR1, FR2, y FR3, aunque sin incluir CDR) incluye una secuencia de aminoácidos, que es por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o más idéntica al marco de cadena pesada de una de las siguientes secuencias del segmento V de la línea germinal: DP-25, DP-1, DP-12, DP-9, DP-7, DP-31, DP-32, DP-33, DP-58 ó DP-54, u otro gen V que es compatible con la clase de estructura canónica 1-3 (ver, por ejemplo, Chothia et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227:799-817; Tomlinson et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227:776-798). Otros marcos compatibles con la clase de estructura canónica 1-3 incluyen marcos con uno o más de los siguientes residuos de acuerdo con la numeración de Kabat: Ala, Gly, Thr o Val en la posición 26; Gly en la posición 26; Tyr, Phe o Gly en la posición 27; Phe, Val, Ile o Leu en la posición 29; Met, Ile, Leu, Val, Thr, Trp o Ile en la posición 34; Arg, Thr, Ala, Lys en la posición 94; Gly, Ser, Asn o Asp en la posición 54; y Arg en

la posición 71.

En una modalidad el marco de cadena ligera (por ejemplo, FR1, FR2, FR3, en forma individual, o una secuencia que abarca FR1, FR2, y FR3, aunque sin incluir CDR) incluye una
5 secuencia de aminoácidos, que es por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 99% o más idéntica al marco de cadena ligera de una secuencia de la línea germinal del subgrupo V κ II o una de las siguientes secuencias del segmento V de la línea germinal: A17, A1, A18, A2, A19/A3 o A23 u otro gen V que es
10 compatible con la clase de estructura canónica 4-1 (ver, por ejemplo, Tomlinson et al. (1995) *EMBO J.* 14:4628). Otros marcos compatibles con la clase de estructura canónica 4-1 incluyen marcos con uno o más de los siguientes residuos de acuerdo con la numeración de Kabat: Val o Leu o Ile en la
15 posición 2; Ser o Pro en la posición 25; Ile o Leu en la posición 29; Gly en la posición 31d; Phe o Leu en la posición 33; y Phe en la posición 71.

En otra modalidad, el marco de cadena ligera (por ejemplo, FR1, FR2, FR3, en forma individual, o una secuencia
20 que abarca FR1, FR2, y FR3, aunque sin incluir CDR) incluye una secuencia de aminoácidos, que es por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 99% o más idéntica al marco de cadena ligera de una secuencia de la línea germinal del subgrupo V κ II, por ejemplo, una secuencia de DPK9.

25 En otra modalidad, el marco de cadena pesada (por

ejemplo, FR1, FR2, FR3, en forma individual, o una secuencia que abarca FR1, FR2 y FR3, aunque sin incluir CDR) incluye una secuencia de aminoácidos, que es por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 99% o más idéntica al marco de cadena
5 ligera de una secuencia de la línea germinal del subgrupo VH I, por ejemplo, una secuencia de DP-25 o una secuencia de la línea germinal del subgrupo de VH III, por ejemplo, una secuencia de DP-54.

En una modalidad, el agente de unión de IL-13 incluye
10 por lo menos una, dos y con preferencia tres CDR de la región variable de cadena ligera o pesada de un anticuerpo descrito en la presente, por ejemplo, C65. Por ejemplo, el agente de unión de la IL-13 incluye una o más de las siguientes secuencias dentro de una región de CDR:

15 QASQGTSINLN (SEC ID NO: 118)

GASNLED (SEC ID NO: 119), y

LQHSYLPWT (SEC ID NO: 120)

GFSLTGYGVN (SEC ID NO: 121),

IIWGDGSTDYNSAL (SEC ID NO: 122), y

20 DKTFYYDGFYRGRMDY (SEC ID NO: 123), o un CDR que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere por no más de 4, 3, 2.5, 2, 1.5, 1 ó 0.5 sustituciones, inserciones o eliminaciones por cada 10 aminoácidos (por ejemplo, el número de diferencias es proporcional a la longitud del CDR)
25 relativa a una secuencia mencionada con anterioridad, por

ejemplo, por lo menos alteración aunque no más de dos, tres, o cuatro por cada CDR. Por ejemplo, la proteína puede incluir, en la secuencia de dominio variable de la cadena ligera, por lo menos, dos, o tres de las siguientes

5 secuencias dentro de una región de CDR:

QASQGTSINLN (SEC ID NO: 118),

GASNLED (SEC ID NO: 119) y

LQHSYLPWT (SEC ID NO: 120), o una secuencia de aminoácidos que difiere por no más de 4, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, ó

10 0.5 sustituciones, inserciones o eliminaciones por cada 10 aminoácidos con relación a una secuencia mencionada con anterioridad.

El agente de unión de IL-13 puede incluir, en la secuencia del dominio variable de cadena pesada, por lo menos

15 una, dos o tres de las siguientes secuencias dentro de una región de CDR:

GFSLTGYGVN (SEC ID NO: 121),

IIWGDGSTDYNSAL (SEC ID NO: 122), y

DKTFYVDGFYRGRMDY (SEC ID NO: 123), o una secuencia de

20 aminoácidos que difiere por no más de 4, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, ó 0.5 sustituciones, inserciones o eliminaciones por cada 10 aminoácidos con relación a una secuencia mencionada con anterioridad.

En una modalidad preferida, agente de el enlace IL-13 incluye la

25 totalidad de seis CDR de C65 ó CDR estrechamente relacionado,

45

por ejemplo, CDR que son idénticos o que tienen por lo menos alteración de aminoácidos, aunque no más de dos, tres o cuatro alteraciones (por ejemplo, sustituciones, eliminaciones, o inserciones).

5 Incluso en otra modalidad, el agente de unión de IL-13 incluye por lo menos una, dos o tres regiones de CDR que tienen las mismas estructuras canónicas y la correspondiente región de Chothia de CDR de C65, por ejemplo, por lo menos CDR1 y CDR2 de los dominios variables de cadena pesada y/o

10 ligera de C65.

 En una modalidad, el marco de cadena pesada (por ejemplo, FR1, FR2, FR3, en forma individual, o una secuencia que abarca FR1, FR2, y FR3, aunque sin incluir CDR) incluye una secuencia de aminoácidos, que es por lo menos 80%, 85%,

15 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o más idéntica al marco de cadena pesada de una de las siguientes secuencias del segmento V de la línea germinal: DP-71 o DP-67 u otro gen V que es compatible con la clase de estructura canónica de C65 (ver, por ejemplo, Chothia et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227:799-817;

20 Tomlinson et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227:776-798).

 En una modalidad, el marco de cadena ligera (por ejemplo, FR1, FR2, FR3, en forma individual, o una secuencia que abarca FR1, FR2, y FR3, aunque sin incluir CDR) incluye una secuencia de aminoácidos, que es por lo menos 80%, 85%,

25 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o más idéntica al marco de cadena

ligera de secuencia de la línea Terminal DPK-1 o DPK-9 u otro gen V que es compatible con la clase de estructura canónica de C65 (ver, por ejemplo, Tomlinson et al. (1995) *EMBO J.* 14:4628).

5 En otra modalidad, el marco de cadena ligera (por ejemplo, FR1, FR2, FR3, en forma individual, o una secuencia que abarca FR1, FR2, y FR3, aunque sin incluir CDR) incluye una secuencia de aminoácidos, que es por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o más idéntica al marco de cadena
10 ligera de una secuencia de la línea germinal del subgrupo V κ I; por ejemplo, una secuencia DPK-9 ó DPK-1.

 En otra modalidad, el marco de cadena pesada (por ejemplo, FR1, FR2, FR3, en forma individual, o una secuencia que abarca FR1, FR2, y FR3, aunque sin incluir CDR) incluye
15 una secuencia de aminoácidos, que es por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o más idéntica al marco de cadena ligera de una secuencia de la línea germinal del subgrupo V μ IV, por ejemplo, una secuencia DP-71 ó DP-67.

 En una modalidad el marco variable de cadena ligera o
20 pesada (por ejemplo, la región que abarca por lo menos FR1, FR2, FR3, y en forma opcional FR4) puede elegirse de: (a) un marco variable de cadena ligera o pesada que incluye por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% ó 100% de los residuos de aminoácidos de un marco variable de cadena ligera o pesada
25 humana, por ejemplo, un residuo del marco variable de cadena

ligera o pesada de un anticuerpo maduro humano, una secuencia de la línea germinal humana, una secuencia de consenso humana, o un anticuerpo humano descritos en la presente; (b) un marco variable de cadena ligera o pesada que incluye desde 5 20% hasta 80%, 40% hasta 60%, 60% hasta 90% ó 70% hasta 95% de los residuos de aminoácidos de un marco variable de cadena ligera o pesada humana, por ejemplo, un residuo del marco variable de cadena ligera o pesada de un anticuerpo maduro humano, una secuencia de la línea germinal humana, una 10 secuencia de consenso humana; (c) un marco no humano (por ejemplo, un marco de roedor); o (d) un marco no humano que ha sido modificado, por ejemplo, para eliminar determinantes antigénicos o citotóxicos, por ejemplo, desinmunizado, o parcialmente humanizado. En una modalidad, la secuencia de 15 dominio variable de cadena pesada incluye residuos humanos o residuos de secuencia de consenso humano en una o más de las siguientes posiciones (con preferencia por lo menos cinco, diez, doce, o todas): (en el FR del dominio variable de la cadena ligera) 4L, 35L, 36L, 38L, 43L, 44L, 58L, 46L, 62L, 20 63L, 64L, 65L, 66L, 67L, 68L, 69L, 70L, 71L, 73L, 85L, 87L, 98L y/o (en el FR del dominio variable de la cadena pesada) 2H, 4H, 24H, 36H, 37H, 39H, 43H, 45H, 49H, 58H, 60H, 67H, 68H, 69H, 70H, 73H, 74H, 75H, 78H, 91H, 92H, 93H y/o 103H (de acuerdo con la numeración de Kabat).

25 En una modalidad, el agente de unión de IL-13 incluye

por lo menos CDR no humano, por ejemplo, un CDR murino, por ejemplo, un CDR de MJ 2-7 ó C65, o uno de sus mutantes, y por lo menos un marco que difiere de un marco de MJ 2-7 ó C65 en por lo menos un aminoácido, por ejemplo, por lo menos 5, 8, 10, 12, 15 ó 18 aminoácidos. Por ejemplo, las proteínas incluyen uno, dos, tres, cuatro, cinco, o seis de tales CDR no humanos e incluye por lo menos una diferencia de aminoácidos en por lo menos tres de HC FR1, HC FR2, HC FR3, LC FR1, LC FR2 y LC FR3.

10 En una modalidad, la secuencia de dominio variable de cadena pesada o ligera de la proteína incluye una secuencia de aminoácidos, que es por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o más idéntica a una secuencia de dominio variable de un anticuerpo descrito aquí, por ejemplo, MJ 2-7 o C65; o
15 que difiere en por lo menos 1 ó 5 residuos, aunque menos de 40, 30, 20 ó 10 residuos, de una secuencia de dominio variable de un anticuerpo descrito en la presente, por ejemplo, MJ 2-7 ó C65. En una modalidad, la secuencia de dominio variable de cadena pesada o ligera de la proteína
20 incluye una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácidos nucleicos descrita aquí o un ácido nucleico que se hibrida a una secuencia de ácidos nucleicos descrita en la presente o su complemento, por ejemplo, en condiciones de rigurosidad baja, rigurosidad media,
25 rigurosidad alta, o rigurosidad muy alta.

En una modalidad uno o ambos del dominio variable incluyen posiciones de aminoácidos en la región del marco que derivaron en forma variada tanto de un anticuerpo no humano (por ejemplo, un anticuerpo murino tal como mAb13.2) y un anticuerpo humano o secuencia de línea germinal. Por ejemplo, una secuencia de dominio variable puede incluir un número de posiciones en las cuales el residuo de aminoácido es idéntico tanto al anticuerpo no humano y el anticuerpo humano (o secuencia de línea germinal humana) dado que los dos son idénticos en esta posición. De las posiciones de marco restantes donde el humano y el no humano difieren, por lo menos 50, 60, 70, 80 ó 90% de las posiciones del dominio variable son, de preferencia, idénticas al anticuerpo humano (o secuencia de línea germinal humana) en lugar de la no humana. Por ejemplo, ninguna, o por lo menos una, dos, tres, o cuatro de tales posiciones de marco restantes pueden ser idénticas al anticuerpo no humano en lugar del humano. Por ejemplo, en HC FR1, una o dos de tales posiciones pueden ser no humanas; en HC FR2, una o dos de tales posiciones pueden ser no humanas; en FR3, uno, dos, tres, o cuatro de tales posiciones pueden ser no humanas; en LC FR 1, uno, dos, tres, o cuatro de tales posiciones pueden ser no humanas; en LC FR2, una o dos de tales posiciones pueden ser no humanas; en LC FR3, una o dos de tales posiciones pueden ser no humanas.

El agente de unión de IL-13, por ejemplo, la molécula

del anticuerpo anti-IL-13, puede derivarse o ligarse a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido u otra proteína (por ejemplo, un fragmento Fab). Por ejemplo, el agente de unión puede ligarse de manera funcional (por ejemplo, por
5 acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más entidades moleculares, tales como un anticuerpo (por ejemplo, para formar un anticuerpo bio-específico o multi-específico), toxinas, radioisótopos, agentes citotóxicos o citostáticos, entre
10 otros.

En otra modalidad, el agente de unión de IL-13, por ejemplo, la molécula del anticuerpo anti-IL-13, interfiere con la interacción de la IL-13 con el receptor IL-13R α 1. En una modalidad, el agente de unión de IL-13 puede interferir
15 con la interacción de Phe107 de IL-13 (SEC ID NO: 124; FIGURA 13A) con una bolsa hidrofóbica de IL-13R α 1 formada por las cadenas laterales de los residuos Leu319, Cys257, Arg256 y Cys320 (SEC ID NO: 125; FIGURA 13B), por ejemplo, por la unión directa a estos residuos o impedimento estérico. En
20 otra modalidad, el agente de unión de IL-13 puede interferir con las interacciones de van der Waals entre los residuos de aminoácidos Ile254, Ser255, Arg 256, Lys318, Cys320 y Tyr321 de IL-13 (SEC ID NO: 125) y los residuos de aminoácido Arg11, Glu12, Leu13, Ile14, Glu15, Lys104, Lys105, Lys106 y Phe107 y
25 Arg108 de IL-13 (SEC ID NO: 124), por ejemplo, por la unión

directa a estos residuos o impedimento estérico.

En una modalidad, el agente de unión de IL-13, por ejemplo, la molécula del anticuerpo anti-IL-13, no tiene reactividad cruzada cuando se selecciona contra por lo menos
5 la mitad, dos tercios, tres cuartos, 90% o todos los tejidos en la "lista sugerida de los tejidos humanos que se usarán para las investigaciones inmunohistoquímicas de la reactividad cruzada" en el Anexo II de la Guía DC CPMP III/5271/94 Versión 5, "Producción y control de calidad de
10 los anticuerpos monoclonales" y por lo menos la mitad, dos tercios, tres cuartos, 90% o todos los tejidos recomendados en la Tabla 2 del 1997 US FDA/CBER "Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use".

15 En una modalidad, el agente de unión de IL-13, por ejemplo, el anticuerpo IL-13, une específicamente a IL-13, por ejemplo, una IL-13 de mamífero, por ejemplo, IL-13 de primate humano o no humano. Por ejemplo, el agente de unión une a la IL-13 con una afinidad que es por lo menos dos
20 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces o mejor (K_d más pequeña) que su afinidad para la unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) además de IL-13, o con una afinidad que es por lo menos dos veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces o mejor (K_d más pequeña) que su afinidad para la
25 unión a otra interleucina humana además de IL-13. En algunas

00193

modalidades, el agente de unión de la IL-13 únicamente detecta una sola banda prominente cuando se mancha contra la muestra cruda de la IL-13 humana descrita en el Ejemplo 1 ("Selección Cuaternaria"). En algunas modalidades, un
5 precipitado realizado extrayendo las proteínas de tal muestra cruda usando cuentas a las que se inmoviliza el agente de unión de la IL-13, es una composición en la que la IL-13 es por lo menos 5%, 10%, 50% u 80% pura.

En otro aspecto, el agente de unión de IL-13, por
10 ejemplo, una molécula del anticuerpo anti-IL-13 o una composición farmacéutica de la misma, se administra para tratar o prevenir un trastorno asociado con la IL-13. El tratamiento se refiere a mejorar o mantener (o de esta manera intentar) la condición del paciente). En un caso típico, el
15 tratamiento mejora la condición del paciente hasta un grado discernible por un médico o evita el empeoramiento de la condición. Ejemplos de los trastornos asociados con la IL-13 incluyen, pero no se limitan a, los trastornos elegidos de uno o más de los trastornos respiratorios, por ejemplo, asma
20 (por ejemplo, asma alérgica y no alérgica (por ejemplo, asma producida por infección con, por ejemplo, virus sincitial respiratorio (VSR), por ejemplo, en niños de menor edad)), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD, por sus siglas en inglés), y otras condiciones relacionadas con inflamación
25 de las vías respiratorias, eosinofilia, fibrosis y excesiva

producción de mucosidad, por ejemplo, fibrosis cística y fibrosis pulmonar; trastornos atópicos, por ejemplo, que son el resultado de una mayor sensibilidad a IL-13, (por ejemplo, dermatitis atópica, urticaria, eczema, rinitis alérgica y enterogastritis alérgica); condiciones inflamatorias y/o autoinmunes de, la piel (por ejemplo, dermatitis atópica), trastornos gastrointestinales (por ejemplo, enfermedades inflamatorias intestinales (IBD), tales como colitis ulcerativa y/o enfermedad de Crohn), hepáticas (por ejemplo, cirrosis, carcinoma hepatocelular), y esclerodermia; tumores o cánceres (por ejemplo, tumores del tejido blando o sólido), tales como leucemia, glioblastoma, y linfoma, por ejemplo, linfoma de Hodgkin; infecciones virales (por ejemplo, de HTLV-1); fibrosis de otros órganos, por ejemplo, fibrosis del hígado, (por ejemplo, fibrosis causada por un virus de la hepatitis B y/o C); y supresión de la expresión de respuestas inmunes protectoras del tipo 1, (por ejemplo, durante la vacunación), como se describe en la presente.

El agente de unión de IL-13 (por ejemplo, la molécula del anticuerpo IL-13, tal como se describe en la presente) puede administrarse en una cantidad efectiva para tratar o prevenir el trastorno. En el caso del uso profiláctico (por ejemplo, para prevenir el inicio o retrasar el inicio), el paciente puede o no tener uno o más síntomas del trastorno. La cantidad también puede seleccionarse para ser efectiva

para mejorar por lo menos un síntoma del trastorno. De preferencia, el paciente es un mamífero, por ejemplo, un humano que sufre de un trastorno asociado con la IL-13 como se describe en la presente. Para los trastornos
5 respiratorios, por ejemplo, asma, el agente de unión de la IL-13 puede liberarse por inhalación.

En una modalidad, el método incluye administrar dosis de una molécula de anticuerpo que se una a IL-13. Por ejemplo, la molécula de anticuerpo inhibe o neutraliza la IL-13. En
10 una modalidad, cada dosis se administra subcutáneamente, por ejemplo, en una cantidad de aproximadamente 0.5-10 mg/kg (por ejemplo, 0.7-3.3 mg/kg) a una frecuencia no mayor de una vez por semana, por ejemplo, cada semana o una vez o dos veces por mes. En una modalidad, el anticuerpo es un anticuerpo
15 descrito en la presente. Por ejemplo, el anticuerpo es un anticuerpo que inhibe la unión de IL-13R α 1. El anticuerpo, por ejemplo, puede conferir un efecto protector post-inyección contra la exposición al antígeno *Ascaris* en un modelo de oveja de por lo menos 6 semanas después de la
20 inyección.

En una modalidad, el agente de unión de la IL-13 se administra en combinación con otro agente terapéutico. La terapia de combinación puede incluir un agente de unión de IL-13, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-IL-13,
25 co-formulado con y/o co-administrado con uno o más agentes

terapéuticos adicionales, por ejemplo, uno o más inhibidores de citosina y factor de crecimiento, inmunosupresores, agentes antiinflamatorios (por ejemplo, agentes antiinflamatorios sistémicos), inhibidores metabólicos, 5 inhibidores enzimáticos, y/o agentes citotóxicos o citostáticos, como se describe en más detalle en la presente. El agente de unión de IL-13 y el otro terapéutico también pueden administrarse de forma separada.

Ejemplos de agentes terapéuticos adicionales preferidos 10 que pueden co-administrarse y/o co-formularse con un agente de unión de IL-13 incluyen: esteroides inhalados; beta-agonistas, por ejemplo, beta-agonistas de acción inmediata o de acción prolongada; antagonistas de leucotrienos o receptores de leucotrieno; fármacos combinados tales como 15 ADVAIR®; inhibidores de IgE, por ejemplo, anticuerpos anti-IgE (por ejemplo, XOLAIR®); inhibidores de fosfodiesterasa (por ejemplo, inhibidores de PDE4); xantinas; fármacos anticolinérgicos; agentes estabilizadores de las células cebada tales como cromolyn; inhibidores de IL-4; inhibidores 20 de IL-5; inhibidores de eotaxina/CCR3; y antihistaminas. Estas combinaciones pueden usarse para tratar el asma y otros trastornos respiratorios. Ejemplos adicionales de agentes terapéuticos que pueden co-administrarse y/o co-formularse con un agente de unión de IL-13 incluyen uno o más de: 25 antagonistas de TNF (por ejemplo, un fragmento soluble de un

p0197

receptor del TNF, por ejemplo, receptor del TNF p55 ó p75 humano o sus derivados, por ejemplo, TNFR-IgG de 75 kd (proteína de fusión del receptor del TNF-IgG de 75 kD, ENBRELTM)); antagonistas de la enzima de TNF, por ejemplo, 5 inhibidores de la enzima conversora del TNF α (TACE); antagonistas del receptor muscarínico; antagonistas de TGF- β ; interferón gamma; perfenidona; agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, metotrexato, leflunomida o un sirolimo (rapamicina) o uno de sus análogos, por ejemplo, CCI-779; 10 COX2 e inhibidores de cPLA2; NSAIDs; inmunomoduladores; inhibidores de p38, inhibidores de TPL-2, Mk-2 y NF κ B, entre otros.

En otro aspecto, esta solicitud provee composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas, que incluyen un 15 vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico y por lo menos un antagonista de IL-13, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-IL-13. En una modalidad, las composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas, comprenden una combinación de dos o más de uno de los agentes 20 de unión de IL-13, por ejemplo, moléculas de anticuerpos anti-IL-13. También pueden usarse combinaciones del agente de unión de IL-13, por ejemplo, la molécula del anticuerpo anti-IL-13, y un fármaco, por ejemplo, un agente terapéutico (por ejemplo, una o más citosinas e inhibidores del factor de 25 crecimiento, inmunosupresores, agentes antiinflamatorios (por

ejemplo, agentes antiinflamatorios sistémicos), inhibidores metabólicos, inhibidores enzimáticos y/o agentes citotóxicos o citostáticos, como se describe en la presente.

Esta solicitud caracteriza, además, a los ácidos
5 nucleicos que comprenden secuencias nucleotídicas que codifican un agente de unión de IL-13 descrito en la presente o un componente del mismo, por ejemplo, una secuencia de dominio variable de cadena pesada y/o ligera de una molécula de anticuerpo anti-IL-13, por ejemplo, una molécula de
10 anticuerpo descrita en la presente. Por ejemplo, la solicitud caracteriza una primera y segunda secuencias de dominio variable de cadena pesada y ligera que codifican ácidos nucleicos, respectivamente, de un anticuerpo anti-IL-13 elegida de uno o más de, por ejemplo, MJ 2-7 ó C65, por
15 ejemplo, como se describe en la presente. En otro aspecto, la solicitud caracteriza células huésped y vectores que contienen los ácidos nucleicos descritos en la presente.

La invención caracteriza, además, el epítipo de IL-13, por ejemplo, IL-13 humana, reconocido por uno o más de, por
20 ejemplo, MJ 2-7 o C65. Por ejemplo, las proteínas y péptidos que incluyen el epítipo pueden usarse para generar o seleccionar otros compuestos de unión que interactúan con el epítipo, por ejemplo, proteínas tales como anticuerpos o moléculas pequeñas. Por ejemplo, un péptido que incluye el
25 epítipo puede usarse como un inmunógeno o como blanco para

seleccionar una biblioteca de expresión. Es posible, además, evaluar los compuestos para determinar la capacidad de interactuar con el péptido, o, mediante mapeo o determinación de estructura, para evaluar los compuestos para determinar la capacidad de interactuar con el epítipo, por ejemplo, en el contexto de una IL-13 madura.

En otro aspecto, esta solicitud caracteriza un método para modular, por ejemplo, interferir con (por ejemplo, inhibir, bloquear o reducir de otro modo), una interacción, por ejemplo, unión, entre la IL-13 y una proteína de unión a IL-13 cognado, por ejemplo, un complejo del receptor de IL-13, por ejemplo, un complejo que comprende IL-13R α 1 e IL-4R α , o una sub-unidad de éstos. La modulación puede efectuarse *in vivo* o *in vitro*. En otras modalidades, el antagonista de IL-13, por ejemplo, la molécula de anticuerpo anti-IL-13, se une a IL-13 e interfiere con (por ejemplo, inhibe, bloquea o reduce de otro modo) una interacción, por ejemplo, unión, entre IL-13 y una sub-unidad del complejo receptor de IL-13, por ejemplo, IL-13R α 1 ó IL-4R α , en forma individual. Incluso en otra modalidad, el agente de unión de IL-13, por ejemplo, la molécula de anticuerpo anti-IL-13, se une a IL-13 e interfiere con (por ejemplo, inhibe, bloquea o reduce de otro modo) una interacción, por ejemplo, unión, entre IL-13 y IL-13R α 1. En otra modalidad, el agente de unión de IL-13, por ejemplo, la molécula de anticuerpo anti-IL-13, se une a IL-13

5 e interfiere con (por ejemplo, inhibe, bloquea o reduce de otro modo) una interacción, por ejemplo, unión, entre IL-13 y IL-13R α 1. Normalmente, el la molécula de anticuerpo anti-IL-13 interfiere con (por ejemplo, inhibe, bloquea o reduce de otro modo) una interacción, por ejemplo, unión, de IL-13 y IL-13R α 1.

10 En otro aspecto, esta solicitud caracteriza un método para modular la interacción entre IL-13 y una proteína del receptor de IL-13, por ejemplo, IL-13R α 1 ó IL-13R α 2. Por ejemplo, un agente de unión de IL-13, por ejemplo, un agente descrito en la presente, puede usarse para reducir o inhibir la unión, entre IL-13 y IL-13R α 1 o IL-13R α 2, o para reducir la formación de un complejo que incluye IL-13R α 1 e IL-4R α (por ejemplo, un complejo como se describe en la presente).
15 El método comprende poner en contacto IL-13 o un complejo que contiene IL-13 con un agente de unión de IL-13, por ejemplo, una proteína descrita en la presente.

20 Los métodos de la invención pueden usarse sobre las células *in vitro* (por ejemplo, en un sistema sin células), en cultivo, por ejemplo *in vitro* o *ex vivo*. Por ejemplo, las células que expresan el receptor de IL-13 pueden cultivarse *in vitro* en medio de cultivo y la etapa de poner en contacto puede efectuarse agregando un agente de unión de IL-13 al medio de cultivo. En forma alternativa, el método puede
25 realizarse sobre las células presentes en un sujeto, por

00101

ejemplo, como parte de un protocolo *in vivo* (por ejemplo, terapéutico o profiláctico). Por ejemplo, el antagonista de IL-13 puede administrarse en forma local o en forma sistémica.

5 El método puede incluir poner en contacto IL-13 con el complejo del receptor de IL-13, o una sub-unidad de éste, en condiciones que permiten que ocurra una interacción entre IL-13 y el complejo del receptor de IL-13, o una sub-unidad de éste, para formar de esta manera una mezcla de IL-13/receptor
10 de IL-13. En general, el agente de unión de IL-13 se proporciona en una cantidad efectiva, por ejemplo, de tal modo que el contacto de la mezcla de IL-13/receptor de IL-13 modula, por ejemplo, interfiere con (por ejemplo, inhibe, bloquea o reduce de otro modo) la interacción entre IL-13 y
15 la proteína receptora o por lo menos la función de IL-13, por ejemplo, señalización mediada por IL-13.

En otro aspecto, esta solicitud proporciona un método para detectar la presencia de IL-13 en una muestra *in vitro* (por ejemplo, una muestra biológica, tal como suero, plasma,
20 tejido, biopsia). El método principal puede usarse para diagnosticar un trastorno, por ejemplo, un trastorno asociado con las células inmunes. El método incluye: (i) poner en contacto una muestra o una muestra de control con un agente de unión de IL-13, por ejemplo, una molécula de anticuerpo de
25 anti-IL-13, por ejemplo, como se describe en la presente; y

(ii) detectar la formación de un complejo entre el agente de unión de IL-13 y la muestra o la muestra de control, en donde un cambio estadísticamente significativo en la formación del complejo en la muestra con relación a la muestra de control es indicativo de la presencia de la IL-13 en la muestra.

En aún otro aspecto, esta solicitud proporciona un método para detectar la presencia de IL-13 *in vivo* (por ejemplo, formación de imagen *in vivo* en un paciente). El método principal puede usarse para diagnosticar un trastorno, por ejemplo, un trastorno asociado con la IL-13. El método incluye: (i) administrar un agente de unión de IL-13, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-IL-13, por ejemplo, como se describe en la presente, a un paciente o a un paciente de control, bajo condiciones que permiten la unión del agente de unión a IL-13; y (ii) detectar la formación de un complejo entre el agente de unión y la IL-13, en donde un cambio estadísticamente significativo en la formación del complejo en el paciente con relación al paciente de control es indicativo de la presencia de IL-13.

Por ejemplo, la molécula del anticuerpo se marca directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o no unido. Las sustancias detectables apropiadas incluyen diferentes enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos.

También se describen métodos para liberar o dirigir un agente, por ejemplo, un terapéutico o un agente citotóxico, a una célula que expresa IL-13 *in vivo*.

En otro aspecto, la invención caracteriza un polipéptido que comprende la secuencia o un fragmento funcional de la misma:

SPVPPSTALKELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGVYCAALESLINVSGCSA
IEKTQRM LN GF CPHKVSAGQFSSLRVRDTKIEVAQFVKDLLVHLKKLFREGQFN (SEC
ID NO: 14).

El polipéptido puede incluir, además:

MALLLT MVIALTCLGGFASP (SE ID NO: 127), por ejemplo, como secuencia de señal N-terminal. Por ejemplo, el polipéptido es una proteína IL-13 de mono cinomolgo (en la presente, "NHP-IL-13"). La NHP-IL-13 puede ser una proteína de IL-13 madura o una proteína de IL-13 de longitud completa sin procesar. Los péptidos de la secuencia anterior, por ejemplo, péptidos que difieren de los péptidos correspondientes en la IL-13 humana, pueden usarse, por ejemplo, como un inmunógeno o compuesto blanco.

Se caracterizan, además, polipéptidos relacionados que difieren de IL-13 humana en uno o más de las posiciones en negrita anteriores aunque son idénticos a la IL-13 humana en las posiciones que no están en negrita anteriores. Por ejemplo, una o más de las posiciones en negrita pueden ser una alanina, o una sustitución conservadora del residuo

correspondiente en la secuencia de cinomolgo (anterior) o el correspondiente residuo en la secuencia humana. La invención también caracteriza péptidos, por ejemplo, de por lo menos 5 ó 6 aminoácidos de la secuencia anterior. Los péptidos pueden 5 incluirse en una proteína heteróloga (por ejemplo, una proteína distinta de una IL-13), una proteína quimérica (por ejemplo, una IL-13 humana) o puede encontrarse en un péptido aislado, por ejemplo, una que no incluye otras secuencias. Los péptidos pueden fusionarse además o conjugarse a otros 10 compuestos, por ejemplo, un vehículo. En una modalidad, el péptido incluye por lo menos residuos de aminoácidos que difiere de IL-13 humana. Ejemplos de los péptidos se describen a continuación.

Se caracterizan, además, ácidos nucleicos que codifican 15 la secuencia IL-13 cinomolga y sus variantes. El polipéptido puede usarse para proveer un agente de unión de IL-13 que une la IL-13 de mono cinomolgo, y, en forma opcional, también una proteína IL-13 de otra especie, por ejemplo, una IL-13 humana.

20 En un aspecto, la invención caracteriza un método para proveer una molécula de unión blanco que se une en forma específica a una proteína blanco humana. Por ejemplo, la molécula de unión blanco es una molécula de anticuerpo. El método incluye: proveer una proteína blanco que comprende por 25 lo menos una porción de una proteína no humana, la porción es

homóloga a (por lo menos 70, 75, 80, 85, 87, 90, 92, 94, 95, 96, 97 ó 98% idéntica a) una porción correspondiente de una proteína blanco humana, pero difiere en por lo menos un aminoácido (por ejemplo, por lo menos uno, dos, tres, cuatro, 5 cinco, seis, siete, ocho, o nueve aminoácidos); obtener un agente de unión que se une en forma específica al antígeno; y evaluar si el agente de unión se une en forma específica a la proteína blanco humana o evaluar la eficacia del agente de unión en la modulación de la actividad de la proteína blanco humana. El método puede incluir además administrar el agente 10 de unión (por ejemplo, una molécula de anticuerpo) o un derivado (por ejemplo, una molécula de anticuerpo humanizada) a un paciente humano. En una modalidad, la proteína blanco humana es una citosina, por ejemplo, una interleucina, por ejemplo, IL-13 ó IL-4. La proteína no humana puede ser de un 15 primate no humano, por ejemplo, un mono cinomolgo o un macaco cola de cerdo.

En una modalidad, la etapa de obtener comprende usar una biblioteca de proteínas de expresión, por ejemplo, una 20 biblioteca de visualización de fago o ribosoma. Por ejemplo, la biblioteca visualiza moléculas de anticuerpos, tales como Fab's o scFv's. En una modalidad, la etapa de obtener comprende inmunizar un animal usando el antígeno como un inmunógeno. Por ejemplo, el animal puede ser un roedor, por 25 ejemplo, un ratón o una rata. El animal puede ser un animal

transgénico que tiene por lo menos un gen de inmunoglobulina humana.

Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en la presente se
5 incorporan por referencia en su totalidad.

DEFINICIONES

El término "agente de unión de IL-13", como se usa en la presente, se refiere a cualquier compuesto, tal como una
10 proteína (por ejemplo, un polipéptido multi-cadena, un polipéptido) o un péptido, que incluye una interfase que une a una proteína de IL-13, por ejemplo, una IL-13 de mamífero, en particular una IL-13 de humano o primate no humano. En general, el agente de unión se une con una Kd menor de 5×10^{-7}

15 M. Un ejemplo de un agente de unión de IL-13 es una proteína que incluye un sitio de unión de antígeno, por ejemplo, una molécula de anticuerpo.

Como se usa en la presente, el término "molécula de anticuerpo" se refiere a una proteína que comprende por lo
20 menos una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina. El término molécula de anticuerpo incluye, por ejemplo, anticuerpos maduros de longitud total, y fragmentos de unión de antígeno de un anticuerpo. Por ejemplo, una molécula de anticuerpo puede incluir una secuencia de dominio variable de
25 cadena pesada (H) (abreviado en la presente como VH) y una

secuencia de dominio variable de cadena ligera (L) (abreviado en la presente VL). En otro ejemplo, una molécula de anticuerpo incluye dos secuencias de dominio variable de cadena pesada (H) y dos secuencias de dominio variable de cadena ligera (L), por lo que se forman dos sitios de unión de antígeno. Ejemplos de los fragmentos de unión de antígeno incluyen: (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente de disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste de los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste de los dominios VL y VH de un sólo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb, que consiste de un dominio VH; (vi) un dominio variable camelido o camelizado y (vii) una cadena Fv simple (scFv).

Las regiones VH y VL pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, llamadas "regiones de determinación de complementariedad" (CDR), esparcidas con regiones que son más conservadas, llamadas "regiones de marco" (FR). El grado de la región del marco y CRDs se han definido precisamente por un número de métodos' (ver, Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Chothia, C. et al., (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; y la definición de AbM

usada por los elementos de programación de modelado del anticuerpo AbM de Oxford Molecular. Ver, en general, por ejemplo, *Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains*. En: *Antibody Engineering Lab Manual* (Ed.:
5 Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). En general, a menos que se especifique lo contrario, se usan las siguientes definiciones: definición AbM de CDR1 del dominio variable de cadena pesada y las definiciones de Kabat para los otros CDRs. Además, las modalidades de la invención
10 descritas con respecto a Kabat o AbM CDRs también pueden implementarse usando las espiras hipervariables de Chothia. Cada VH y VL incluye por lo regular tres CDRs y cuatro FRs, arreglados del término amino al término carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

15 Como se usa en la presente, una "secuencia de dominio variable de inmunoglobulina" se refiere a una secuencia de aminoácido que puede formar la estructura de un dominio variable de inmunoglobulina. Por ejemplo, la secuencia puede incluir todo o parte de la secuencia de aminoácido de un
20 dominio variable que se presenta naturalmente. Por ejemplo, la secuencia puede o no incluir, uno, dos o más aminoácidos N- o C terminales, o puede incluir otras alteraciones que son compatibles con la formación de la estructura proteínica.

El término "sitio de unión de antígeno" se refiere a la
25 parte de un agente de unión de IL-13 que comprende

determinantes que forman una interfase que une a la IL-13, por ejemplo, una IL-13 de mamífero, por ejemplo, IL-13 de primate humano o no humano, o un epítipo de la misma. Con respecto a las proteínas (o miméticos proteínicos), el sitio
5 de unión de antígeno incluye por lo regular uno o más espiras (de por lo menos cuatro aminoácidos o miméticos de aminoácidos) que forman una interfase que se une a IL-13. Por lo regular, el sitio de unión de antígeno de una molécula de anticuerpo incluye por lo menos uno o dos CDRs, o más
10 típicamente por lo menos tres, cuatro, cinco o seis CDRs.

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpos de una sola composición molecular. Una composición de anticuerpo
15 monoclonal exhibe una especificidad y afinidad de unión simple para un epítipo particular. Un anticuerpo monoclonal puede elaborarse por tecnología de hibridoma o por lo métodos que no usan tecnología de hibridoma (por ejemplo, métodos recombinantes).

20 Una proteína "humana efectivamente" es una proteína que no provoca una neutralización de la respuesta del anticuerpo, por ejemplo, la respuesta del anticuerpo anti-murino humano (HAMA). HAMA puede ser problemático en un número de circunstancias, por ejemplo, si la molécula de anticuerpo se
25 administra repetidamente, por ejemplo, en el tratamiento de

una condición de enfermedad crónica o recurrente. Una respuesta HAMA puede hacer la administración del anticuerpo repetida potencialmente inefectiva debido a un aumento en la clarificación del anticuerpo del suero (ver, por ejemplo, 5 Saleh et al., *Cancer Immunol, Immunother.*, 32:180-190 (1990)) y también debido a las reacciones alérgicas potenciales (ver, por ejemplo, LoBuglio et al., *Hybridoma*, 5:5117-5123 (1986)).

El término "aislado" se refiere a una molécula que está sustancialmente libre de su ambiente natural. Por ejemplo, 10 una proteína aislada está sustancialmente libre del material celular u otras proteínas de la fuente celular o de tejido de la que se deriva. El término se refiere a preparaciones en donde la proteína aislada está suficientemente pura para administrarse como una composición terapéutica, o por lo 15 menos 70% a 80% (p/p) pura, más preferentemente, por lo menos 80%-90% (p/p) pura, aún más preferentemente, 90-95% pura; y, más preferentemente, por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% ó 100% (p/p) pura. Un compuesto "separado" se refiere a un compuesto que se remueve de por lo menos 90% de por lo menos un 20 componente de una muestra de la cual se obtuvo el compuesto. Puede proporcionarse cualquier compuesto descrito en la presente como un compuesto aislado o separado.

Un "epítopo" se refiere al sitio sobre un compuesto blanco que se une mediante un agente de unión, por ejemplo, 25 una molécula de anticuerpo. Un epítopo puede ser un epítopo

lineal o conformacional o una combinación de los mismos. En el caso donde el compuesto blanco es una proteína, por ejemplo, un epítipo puede referirse a los aminoácidos que se unen mediante un agente de unión. Los epítipos superpuestos
5 incluyen por lo menos un residuo de aminoácido común.

Como se usa en la presente, el término "hibrida bajo condiciones de severidad baja, severidad media, severidad alta o severidad muy alta" describe condiciones para la hibridación y el lavado. La guía para realizar las reacciones
10 de hibridación puede encontrarse en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Los métodos acuosos y no acuosos se describen en tal referencia y puede usarse cualquiera. Las condiciones de hibridación específicas referidas en la presente son como
15 sigue: 1) condiciones de hibridación de baja severidad en cloruro de sodio 6X/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido de dos lavados en SSC 0.2X, SDS al 0.1% y por lo menos 50°C (la temperatura de los lavados puede aumentarse a 55°C para las condiciones de baja severidad); 2)
20 condiciones de hibridación de severidad media en SSC 6X a aproximadamente 45°C, seguido de uno o más lavados en SSC 0.2X, SDS al 0.1% a 60°C; 3) condiciones de hibridación de alta severidad en SSC 6X a aproximadamente 45°C, seguido por uno o más lavados en SSC 0.2X, SDS al 0.1% a 65°C; y de
25 preferencia 4) condiciones de hibridación de muy alta

severidad son fosfato de sodio 0.5M, SDS al 7% a 65°C, seguido de uno o más lavados a SSC 0.2X, SDS al 1% a 65°C. Las condiciones de muy alta severidad (4) son las condiciones preferidas y las que se usan a menos que se especifique lo contrario.

Un "trastorno asociado con la IL-13" es uno en el que la IL-13 contribuye a una patología o síntoma del trastorno. Por lo tanto, el agente de unión de IL-13, por ejemplo, un agente de unión de IL-13 que es un antagonista de una o más de las actividades asociadas con la IL-13, puede usarse para tratar o prevenir el trastorno.

El término "IL-13" incluye la forma sin procesar de longitud completa de las citosinas conocidas en la técnica como IL-13 (sin tomar en consideración el origen de la especie, e incluyen mamíferos, por ejemplo, IL-13 de primate humano y no humano) así como las formas maduras, procesadas de las mismas, así como cualquier fragmento (de por lo menos 5 aminoácidos) o una variante de tales citosinas. Las posiciones dentro de la secuencia de IL-13 pueden designarse de acuerdo con la numeración para la longitud completa, la secuencia de IL-13 humana sin procesar. Para un ejemplo de la IL-13 de mono de longitud total, ver la SEC ID NO: 24; para la IL-13 de mono madura, procesada, ver la SEC ID NO: 14; para la IL-13 humana de longitud total, ver la SEC ID NO: 178, y para la IL-13 humana madura, procesada, ver la SEC ID

NO: 124. Un ejemplo de la secuencia se menciona como sigue:

MALLLTTVIALTCLGGFASPGPVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVW
SINLTAGMYCAALESLINVSGCSAIEKTQRMMSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTK
IEVAQFVKDLLLHLKKLFREGRFN (SEC ID NO: 178).

5 Por ejemplo, la posición 130 es un sitio de un polimorfismo común.

Ejemplos de las secuencias de las proteínas del receptor de IL-13 (por ejemplo, IL-13R α 1 y IL-13R α 2) se describen, por ejemplo, en Donaldson et al., (1998) *J Immunol.* 161:2317-24;
10 U.S. 6,214,559; U.S. 6,248,714 y U.S. 6,268,480.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1A es una alineación de IL-13 humana y de mono cinomolgo, SEC ID NO: 178 y SEC ID NO: 14, respectivamente.

15 La Figura 1B es un ejemplo del listado de péptidos de IL-13 de mono cinomolgo (SEC ID NOs: 179-188 respectivamente).

La Figura 2 es una gráfica que representa la neutralización de la actividad de NHP IL-13 por diferentes
20 agente de unión de IL-13, medidos como el porcentaje de monocitos CD23⁺ (eje y).

La concentración de MJ2-7 (Δ), C65 ($\diamond$) y sIL-13R α 2-Fc ($\bullet$) se indican en el eje x.

La Figura 3 es una gráfica que representa la

neutralización de la actividad de NHP IL-13 por MJ2-7 (murino; •) o MJ2-7 v2.11 humanizado (O). La actividad de NHP IL-13 se midió por la fosforilación de STAT6 (eje y) como una función de la concentración del anticuerpo (eje x).

5 La Figura 4 es una gráfica que representa la neutralización de la actividad de NHP IL-13 por MJ2-7 v2.11 (O) o sIL-13R α 2-Fc (▲). La actividad de NHP IL-13 se midió por la fosforilación de STAT6 (eje y) como una función de la concentración del antagonista (eje x).

10 La Figura 5 es una gráfica que representa la neutralización de la actividad de NHP IL-13 por MJ2-7 (▲), C65 (◆) o sIL-13R α 2-Fc (•). La actividad de NHP IL-13 se midió por la fosforilación de STAT6 (eje y) como una función de la concentración del antagonista (eje x).

15 La Figura 6A es una gráfica que representa la inducción de la producción de tenascina (eje y) por la IL-13 humana nativa (eje x).

La Figura 6B es una gráfica que representa la neutralización de la actividad de NHP IL-13 por MJ2-7,
20 conforme se midió por la inhibición de la producción de tenascina (eje y) como una función de la concentración del anticuerpo (eje x).

La Figura 7 es una gráfica que representa la unión de

79

MJ2-7 o los anticuerpos de control a NHP-IL-13 unido a sIL-13R α 2-Fc acoplado a una memoria SPR.

La Figura 8 es una gráfica que representa la unión de concentraciones variadas (0.09-600 nM) de NHP IL-13 al anticuerpo hMJ2-7 V2-11 capturado.

La Figura 9 es una gráfica que representa la neutralización de la actividad de NHP IL-13 por MJ2-7 de ratón (•) o anticuerpos humanizados versión 1 (○), versión 2 (♦) o versión 3 (▲). La actividad de NHP IL-13 se midió por fosforilación de STAT6 (eje y) como una función de la concentración del anticuerpo (eje x).

La Figura 10 es una gráfica que representa la neutralización de la actividad de NHP IL-13 por anticuerpos que incluyen MJ2-7 VH y VL de ratón (•), VH de ratón y VL versión 2 humanizado (▲) o VH y VL versión 2 (♦). La actividad de NHP IL-13 se midió por fosforilación de STAT6 (eje y) como una función de la concentración del anticuerpo (eje x).

Las Figuras 11A y 11B son gráficas que representan la inhibición de la unión de IL-13 al receptor IL-13 inmovilizado por el anticuerpo MJ2-7, conforme se midió por ELISA. La unión se representa como la absorbancia a 450 nm (eje y). La concentración del anticuerpo MJ2-7 se representa

en el eje x. La Figura 11A representa la unión a IL-13R α 1. La Figura 11B representa la unión a IL-13R α 2.

La Figura 12 es una alineación de la secuencia de aminoácido de la línea germinal de DPK18 (SEC ID NO: 193) y
5 VL de MJ2-7 humanizado versión 3 (SEC ID NO: 190).

La Figura 13A es una secuencia de aminoácido (SEC ID NO: 124) de IL-13 humana, madura, procesada.

La Figura 13B es una secuencia de aminoácido (SEC ID NO: 125) de IL-13R α 1 humana.

10

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se describen agentes de unión (por ejemplo, moléculas de anticuerpos anti-IL-13) que se unen en forma específica a IL-13 y modulan la capacidad de IL-13 de interactuar con los
15 receptores de IL-13 y mediadores de señalización. Los agentes pueden usarse para modular (por ejemplo, inhibir) una o más actividades asociadas con IL-13. Los agentes de unión de IL-13, por ejemplo, como se describe en la presente, pueden usarse para modular una o más actividades asociadas con la
20 IL-13, por ejemplo, *in vivo*, por ejemplo, para tratar o prevenir los trastornos mediados por IL-13 (por ejemplo, asma, inflamación de las vías respiratorias, trastornos atópicos, respuestas alérgicas, eosinofilia, fibrosis y cánceres asociados con IL-13).

25

Moléculas de anticuerpos anti-IL-13

Se encuentran disponibles numerosos métodos para obtener moléculas de anticuerpos. Un método ejemplificativo incluye seleccionar bibliotecas de expresión de proteínas, por ejemplo, bibliotecas de visualización de fago o ribosoma. La visualización de fago se describe, por ejemplo, en Ladner et al., Patente U.S. No. 5,223,409; Smith (1985) *Science* 228:1315-1317; WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690 y WO 90/02809. Además del uso de bibliotecas de visualización, pueden usarse otros métodos para obtener una molécula de anticuerpo que se une a IL-13. Por ejemplo, la proteína de IL-13 o un péptido de ésta pueden usarse como antígeno en un animal no humano, por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón, hámster o rata.

En una modalidad, el animal no humano incluye por lo menos una parte de un gen de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, es posible diseñar cepas de ratones con deficiencia de producción de anticuerpo de ratón con grandes fragmentos del locus de Ig humana. Usando la tecnología del hibridoma, los anticuerpos monoclonales específicos del antígeno derivados de los genes con la especificidad deseada pueden producirse y seleccionarse. Ver, por ejemplo, XENOMOUSE™, Green et al. (1994) *Nature Genetics* 7:13-21, US 2003-0070185, WO 96/34096, publicada el 31 de octubre de 1996, y Solicitud

de PCT No. PCT/US96/05928, presentada el 29 de abril de 1996.

En otra realización, se obtiene un anticuerpo monoclonal del animal no humano, y luego se modifica, por ejemplo, se humaniza o deshumaniza. Winter describe un método de injerto de CDR ejemplificativo que puede usarse para preparar los anticuerpos humanizados descritos en la presente (Patente U.S. No. 5,225,539). Todos los CDR de un anticuerpo humano particular pueden reemplazarse con por lo menos una porción de un CDR no humano o sólo parte del CDR puede reemplazarse con CDR no humano. Solo es necesario reemplazar el número de CDR requerido para la unión del anticuerpo humanizado por un antígeno predeterminado.

Los anticuerpos humanizados pueden generarse mediante el reemplazo de las secuencias de la región variable de Fv que no están involucradas directamente en la unión del antígeno con secuencias equivalentes de las regiones variables de Fv humano. Los métodos generales para generar anticuerpos humanizados se proveen por Morrison (1985) *Science* 229:1202-1207, por Oi et al. (1986) *BioTechniques* 4:214, y por US 5,585,089; US 5,693,761; US 5,693,762; US 5,859,205; y US 6,407,213. Estos métodos incluyen aislar, manipular y expresar las secuencias de ácido nucleico que codifican la totalidad o parte de las regiones variables de Fv de inmunoglobulina de por lo menos de una cadena pesada o ligera. Los ácidos nucleicos pueden obtenerse de un hibridoma

que produce un anticuerpo contra un blanco predeterminado, como se describió anteriormente, así como de otras fuentes. El ADN recombinante que codifica la molécula del anticuerpo humanizado puede clonarse luego en un vector de expresión
5 apropiado.

Una molécula de anticuerpo que se une a IL-13 puede modificarse también por eliminación específica de epítomos de las células T humanas o "desinmunización" a través de los métodos descritos en la WO 98/52976 y WO 00/34317, cuyos
10 contenidos se incorporan en forma específica a modo de referencia en la presente. En síntesis, las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo pueden analizarse para determinar la presencia de péptidos que se unen a MHC Clase II; estos péptidos representan epítomos
15 potenciales de las células T (como se define en la WO 98/52976 y WO 00/34317). Para la detección de epítomos potenciales de las células T, puede aplicarse un método de modelado por computadora denominado "enroscado peptídico", y además una base de datos de péptidos de unión a MHC humano de
20 clase II pueden buscarse para determinar los radicales presentes en las secuencias V_H y V_L , como se describe en la WO 98/52976 y WO 00/34317. Estos radicales se unen a cualquiera de los 18 alotipos mayores de MHC clase II DR, y de este modo constituyen epítomos potenciales de las células T. Los
25 epítomos potenciales de las células T detectados pueden

eliminarse sustituyendo pequeños números de los residuos de aminoácidos en las regiones variables, o con preferencia, mediante sustituciones de aminoácidos individuales. En tanto sea posible, se realizan sustituciones conservadoras. A menudo, aunque no en forma exclusiva, puede usarse un aminoácido común a una posición en las secuencias de anticuerpos de línea germinal humana. Las secuencias de línea germinal humanas, por ejemplo, se describen en Tomlinson, et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227:776-798; Cook, G. P. et al. (1995) *Immunol. Today* Vol. 16(5): 237-242; Chothia, O. et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227:799-817 y Tomlinson et al. (1995) *EMBO J.* 14:4628-4638. El directorio V BASE provee un directorio comprensible de secuencias de la región variable de inmunoglobulina humana (compilado por Tomlinson, I.A. et al. MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK). Estas secuencias pueden usarse como fuente de la secuencia humana, por ejemplo, para regiones de marco y CDRs. Las regiones de marco humano de consenso también pueden usarse, por ejemplo, como se describe en US 6,300,064.

En forma adicional, los anticuerpos quiméricos, humanizados, y de cadena simple descritos en la presente (por ejemplo, que comprenden ambas porciones humanas y no humanas), pueden producirse usando técnicas de ADN recombinantes estándares. Los anticuerpos humanizados también pueden producirse, por ejemplo, usando ratones transgénicos

que expresan genes humanos de cadena pesada y ligera, pero que son incapaces de expresar los genes de inmunoglobulina endógena de cadena pesada y ligera.

Además, los anticuerpos descritos en la presente también incluyen los que se unen a IL-13, interfieren con la formación de una función del complejo de señalización de IL-13, y tienen mutaciones en las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera. En ocasiones se desea mutar e inactivar ciertos fragmentos de la región constante. Por ejemplo, las mutaciones en la región constante pesada pueden realizarse para producir anticuerpos con unión reducida al receptor de Fc (FcR) y/o complemento; estas mutaciones se conocen bien en la técnica. Un ejemplo de tal mutación en la secuencia de amino de la región constante de la cadena pesada de IgG se provee en la SEC ID NO: 128. Algunos fragmentos activos de las sub-unidades CL y CH (por ejemplo, CH1) se unen en forma covalente entre sí. Un aspecto adicional provee un método para obtener un dominio de unión al antígeno del anticuerpo específico para el dominio de IL-13 que asiste en la formación de una función del complejo de señalización de IL-13.

Ejemplos de los anticuerpos pueden incluir las secuencias de las cadenas de VL como se indica en las SEC ID NOS: 30-46, y/o de cadenas de VH como se indica en las SEC ID NOS: 50-115, aunque también pueden incluir variantes de estas

secuencias que mantienen habilidad de unión al antígeno. Tales variantes pueden derivar de las secuencias provistas usando las técnicas conocidas en la técnica. Las sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos, pueden realizarse tanto en los FR o como en CDR. Mientras que los cambios en las regiones del marco se diseñan usualmente para mejorar la estabilidad y reducir la inmunogenicidad de la molécula de anticuerpo, los cambios en los CDR se diseñan a menudo para aumentar la afinidad de la molécula de anticuerpo por su blanco. Tales cambios de aumento de afinidad normalmente se determinan en forma empírica alterando la región de CDR y la evaluación de la molécula de anticuerpo. Estas alteraciones pueden realizarse de acuerdo con los métodos descritos en Antibody Engineering, 2nd. ed. (1995), ed. Borrebaeck, Oxford University Press.

Un ejemplo de un método para obtener una secuencia de dominio variable de cadena pesada, que es una variante de la secuencia de dominio variable de cadena pesada descrita en la presente, comprende adicionar, eliminar, sustituir o insertar uno o más aminoácidos en la secuencia de dominio variable de cadena pesada descrita en la presente, combinar en forma opcional la secuencia de dominio variable de cadena pesada con una o más secuencias de dominio variable de cadena ligera, y evaluar una proteína que incluye la secuencia de dominio de cadena pesada modificada para la unión específica

a IL-13, y (de preferencia) evaluar la capacidad de tal dominio de unión al antígeno para modular una o más actividades asociadas con IL-13. Un método análogo puede emplearse usando una o más variantes de secuencia de una
5 secuencia de dominio variable de cadena ligera descrita en la presente.

Pueden prepararse variantes de las moléculas de anticuerpo creando bibliotecas con uno o más CDR variados y seleccionando las bibliotecas para encontrar los elementos
10 que se unen a IL-13, por ejemplo, con afinidad mejorada. Por ejemplo, Marks et al. (*Bio/Technology* (1992) 10:779-83) describe métodos para producir repertorios de dominios variables de anticuerpos en los cuales los cebadores de consenso dirigidos a o adyacentes a la extremidad 5' del área
15 de dominio variable se usan en conjunto con los cebadores de consenso de la tercera región de marco de genes de VH humanos para proveer un repertorio de dominios variables de VH que carecen de un CDR3. El repertorio puede combinarse con un CDR3 de un anticuerpo particular. Además, las secuencias
20 derivadas de CDR3 pueden mezclarse con repertorios de dominios de VH o VL que carecen de un CDR3, y los dominios de VH o VL completos combinados con un dominio de VL o VH cognado para proveer fragmentos que se unen al antígeno específico. El repertorio puede visualizarse entonces en un
25 sistema huésped apropiado tal como el sistema de

visualización de fago de la WO 92/01047, de tal modo que pueden seleccionarse fragmentos de unión al antígeno apropiados. Las técnicas de combinación o andamiaje también se describen por Stemmer (*Nature* (1994) 370:389-91). Una alternativa general es generar regiones alteradas de VH o VL usando mutagénesis aleatoria de uno o más genes VH y/o VL seleccionados para generar mutaciones dentro del dominio variable completo. Ver, por ejemplo, Gram et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (1992) 89:3576-80.

10 Otro método que puede usarse es dirigir la mutagénesis a regiones de CDR de genes de VH o VL. Tales técnicas se describen en el texto escrito por, por ejemplo, Barbas et al. (*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (1994) 91:3809-13) y Schier et al. (*J. Mol. Biol.* (1996) 263:551-67). De manera similar, uno o
15 más, o la totalidad de tres CDR pueden injertarse en un repertorio de dominios de VH o VL, o incluso cierto escalón adicional (tal como un dominio de fibronectina). La proteína resultante se evalúa para determinar la capacidad de unirse a IL-13.

20 En una modalidad, un agente de unión que se une a un blanco se modifica, por ejemplo, por mutagénesis, para proveer un fondo ("pool") de agentes de unión modificados. Los agentes de unión modificados se evalúan entonces para identificar una o más proteínas de unión alteradas que tienen
25 propiedades funcionales alteradas (por ejemplo, unión

mejorada, estabilidad mejorada, estabilidad prolongada in vivo). En una implementación, se usa tecnología de biblioteca de visualización para seleccionar o discriminar el fondo de proteínas de unión modificadas. Las proteínas de unión con
5 afinidad más elevada se identifican entonces a partir de la segunda biblioteca, por ejemplo, usando condiciones de lavado y unión de rigurosidad más alta o más competitivas. También pueden usarse otras técnicas de selección.

En algunas modalidades, la mutagénesis se orienta a
10 regiones conocidas o que probablemente se encuentren en una interfase de unión. Si, por ejemplo, los agentes de unión identificados son moléculas de anticuerpos, entonces la mutagénesis puede dirigirse a las regiones de CDR de las cadenas pesada o ligera como se describe en la presente.
15 Además, la mutagénesis puede dirigirse a regiones de marco cercanas o adyacentes al CDR, por ejemplo, regiones de marco, particularmente dentro de 10, 5 ó 3 aminoácidos de una unión de CDR. En el caso de los anticuerpos, la mutagénesis también puede limitarse a uno o algunos de los CDR, por ejemplo, para
20 realizar mejoras paso a paso.

En una modalidad, la mutagénesis se usa para producir un anticuerpo más similar a una o más secuencias de líneas germinales. Un método de línea germinal ejemplificativo puede incluir: identificar una o más secuencias de línea germinal
25 que son similares (por ejemplo, las más similares en una base

de datos particular) a la secuencia del anticuerpo aislado. Entonces las mutaciones (a nivel de aminoácidos) pueden realizarse en el anticuerpo aislado, ya sea en forma incremental, en combinación o ambas. Por ejemplo, se realiza
5 una biblioteca de ácidos nucleicos que incluye secuencias que codifica algunas o todas las mutaciones de línea germinal posibles. Los anticuerpos mutados se evalúan entonces, por ejemplo, para identificar un anticuerpo que tiene uno o más residuos de líneas germinales adicionales relativos al
10 anticuerpo aislado y que aún es útil (por ejemplo, tiene una actividad funcional). En una modalidad, se introducen tantos residuos de líneas germinales en un anticuerpo aislado como sea posible.

En una modalidad, se usa mutagénesis para sustituir o
15 insertar uno o más residuos de línea germinal en una región de CDR. Por ejemplo, el residuo de CDR de línea germinal puede ser de una secuencia de línea germinal que es similar (por ejemplo, las más similares) al dominio variable que se modifica. Luego de la mutagénesis, la actividad (por ejemplo,
20 unión u otra actividad funcional) del anticuerpo puede evaluarse para determinar si el residuo o los residuos de la línea germinal son tolerados. Puede realizarse mutagénesis similar en las regiones del marco.

La selección de una secuencia de línea germinal puede
25 realizarse de diferentes maneras. Por ejemplo, una secuencia

de línea germinal puede seleccionarse si cumple un criterio predeterminado de selectividad o similitud, por ejemplo, por lo menos un determinado porcentaje de identidad, por ejemplo, por lo menos 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 5 99 ó 99.5% de identidad. La selección puede realizarse usando por lo menos 2, 3, 5 ó 10 secuencias de línea germinal. En el caso de CDR1 y CDR2, identificar una secuencia similar de línea germinal puede incluir seleccionar una de las secuencias. En el caso de CDR3, identificar una secuencia 10 similar de línea germinal puede incluir seleccionar una de tales secuencias, aunque puede incluirse usando dos secuencias de línea germinal que contribuyen por separado a la porción amino-terminal y la porción carboxi-terminal. En otras implementaciones se usan más de una o dos secuencias de 15 línea germinal, por ejemplo, para formar una secuencia de consenso.

En otras modalidades, el anticuerpo puede modificarse para tener un patrón de glucosilación determinado (es decir, alterado a partir del patrón de glucosilación original o 20 nativo). Como se usa en este contexto, "alterado" significa que tiene uno o más radicales de carbohidrato eliminados, y/o que tiene uno o más sitios de glucosilación agregados al anticuerpo original. La adición de los sitios de glucosilación a los anticuerpos aquí descritos puede lograrse 25 alterando la secuencia de aminoácidos para que contenga

secuencias de consenso del sitio de glucosilación; estas técnicas se conocen bien en la técnica. Otro medio de aumentar el número de radicales de carbohidrato sobre los anticuerpos es por acoplamiento químico o enzimático de los glucósidos a los residuos de aminoácidos del anticuerpo. Estos métodos se describen en, por ejemplo, WO 87/05330, y Aplin and Wriston (1981) *CRC Crit. Rev. Biochem.* 22:259-306. La eliminación de cualquier radical de carbohidrato presentes en los anticuerpos puede lograrse por medios químicos o enzimáticos como se describe en la técnica (Hakimuddin et al. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52; Edge et al. (1981) *Anal. Biochem.* 118:131; y Thotakura et al. (1987) *Meth. Enzymol.* 138:350). Ver, por ejemplo, U.S. 5,869,046 para obtener una modificación que aumenta la vida media *in vivo* suministrando un epítipo de unión al receptor salvaje.

En una modalidad, una molécula de anticuerpo tiene secuencias de CDR que difieren solo en forma insustancial de las de MJ 2-7 ó C65. Las diferencias no sustanciales incluyen cambios menores de aminoácidos, tales como sustituciones de 1 ó 2 de cualquiera de normalmente 5-7 aminoácidos en la secuencia de un CDR, por ejemplo, un CDR de Chothia o de Kabat. Normalmente un aminoácido se sustituye por un aminoácido relacionado que tiene carga similar, características similares hidrofóbicas y estereoquímicas. Tales sustituciones están dentro de la experiencia normal de

un experimentado en la técnica. A diferencia de lo que ocurre en el CDR, los cambios más sustanciales en las regiones estructurales de marco (FRs) pueden realizarse sin afectar en forma adversa las propiedades de unión de un anticuerpo. Los cambios a las FRs incluyen, pero no se limitan a, humanizar un marco derivado no humano o diseñar ciertos residuos de marco que son importantes para el contacto del antígeno o para estabilizar el sitio de unión, por ejemplo, cambiando la clase o subclase de la región constante, cambiando residuos de aminoácidos específicos que pudieran alterar una función efectora tal como la unión al receptor de Fc (Lund et al. (1991) *J. Immunol.* 147:2657-62; Morgan et al. (1995) *Immunology* 86:319-24), o cambiando la especie de la cual deriva la región constante. Los anticuerpos pueden tener mutaciones en la región CH2 de la cadena pesada que reducen o alteran la función efectora, por ejemplo, unión al receptor de Fc y activación del complemento. Por ejemplo, los anticuerpos pueden tener mutaciones tales como las descritas en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,624,821 y 5,648,260. En la cadena pesada de IgG1 o IgG2, por ejemplo, tales mutaciones pueden realizarse para que se asemejen a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEC ID NO: 17. Los anticuerpos pueden tener además mutaciones que estabilizan el enlace disulfuro entre las dos cadenas pesadas de una inmunoglobulina, tales como mutaciones en la región de

andamiaje de IgG4, como se describe en la técnica (por ejemplo, Angal et al. (1993) *Mol. Immunol.* 30:105-08).

Los agentes de unión de IL-13 pueden encontrarse en la forma de anticuerpos intactos, fragmentos de unión de
5 antígeno de anticuerpos, por ejemplo, fragmentos Fab, F(ab')₂, Fd, dAb, y scFv, y anticuerpos intactos y fragmentos que han sido mutados tanto en la dominio constante y/o variable (por ejemplo, mutaciones para producir anticuerpos quiméricos, parcialmente humanizados, o totalmente
10 humanizados, como también para producir anticuerpos con un rasgo deseado, por ejemplo, unión potenciada a IL-13 y/o unión reducida a FcR).

Producción de anticuerpos. Algunas moléculas de
15 anticuerpos, por ejemplo, Fabs, pueden producirse en células bacterianas, por ejemplo, células de *E. coli*. Por ejemplo, si el Fab está codificado por secuencias en un vector de visualización de fago que incluye un codón de detención suprimible entre la entidad de visualización y una proteína
20 de bacteriófago (o su fragmento), el ácido nucleico del vector puede transferirse en una célula bacteriana que no puede suprimir un codón de interrupción. En este caso, el Fab no está fusionado a la proteína del gen III y se selecciona en el periplasma y/o medio.

25 Las moléculas de anticuerpos también pueden producirse

en células eucarióticas. En una modalidad, los anticuerpos (por ejemplo, scFv's) se expresan en una célula de levadura tal como *Pichia* (ver, por ejemplo, Powers et al. (2001) *J Immunol Methods*. 251:123-35), *Hansenula*, o *Saccharomyces*.

5 En una modalidad preferida, las moléculas de anticuerpos se producen en células de mamíferos. Las células de huésped mamíferos preferidas para expresar los anticuerpos clonados o sus fragmentos que se unen al antígeno incluyen Ovario de Hámster Chino (células CHO) (incluyendo células *dhfr*⁻ CHO, 10 descritas en Urlaub and Chasin (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, usadas con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo, como se describe en Kaufman and Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), líneas celulares linfocíticas, por ejemplo, células de mieloma NSO y células SP2, células COS, y 15 una célula de un animal transgénico, por ejemplo, un mamífero transgénico. Por ejemplo, la célula es una célula epitelial de mamífero.

Además de la secuencia de ácido nucleico que codifica la molécula de anticuerpo, los vectores de expresión 20 recombinantes pueden transportar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes de marcador seleccionable. El gen del marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las 25 cuales se ha introducido el vector (ver por ejemplo, Patentes

91

U.S. Nos. 4,399,216, 4,634,665 y 5,179,017). Por ejemplo, normalmente el gen del marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina, o metotrexato, en una célula huésped en la cual se ha

5 introducido el vector.

En un sistema ejemplificativo para la expresión recombinante de una molécula de anticuerpo, un vector de expresión recombinante que codifica el anticuerpo de cadena pesada y el anticuerpo de cadena ligera se introduce en

10 células *dhfr*⁻ CHO por transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes del anticuerpo de cadena ligera y pesada se ligan cada uno en forma operativa a los elementos reguladores potenciador/promotor (por ejemplo, derivados de SV40, CMV,

15 adenovirus y similares, tales como un elemento regulador promotor de AdMLPI potenciador de CMV o un elemento regulador potenciador de SV40/promotor de AdMLP) para conducir altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también transporta un gen DHFR, que permite la

20 selección de células CHO que han sido transfectadas con el vector usando selección/amplificación de metotrexato. Las células huésped transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo y el anticuerpo intacto se recupera del medio de

25 cultivo. Se usan técnicas estándar de biología molecular para

92

preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huésped, seleccionar transformantes, cultivar las células huésped y recuperar la molécula de anticuerpo del medio de cultivo. Por ejemplo, algunos anticuerpos pueden
5 aislarse por cromatografía por afinidad con una proteína A o matriz acoplada a la proteína G.

Para las moléculas de anticuerpos que incluyen un dominio de Fc, el sistema de producción del anticuerpo sintetiza de preferencia anticuerpos en los cuales la región
10 de Fc está glucosilada. Por ejemplo, el dominio de Fc de moléculas de IgG está glucosilado en la asparagina 297 en el dominio CH2. Esta asparagina es el sitio para la modificación con oligosacáridos del tipo biantenarico. Se ha demostrado que esta glicosilación se requiere para las funciones efectoras
15 mediadas por los receptores de Fcγ y complementan C1q (Surton and Woof (1992) *Adv. Immunol.* 51:1-84; Jefferis et al. (1998) *Immunol. Rev.* 163:59-76). En una modalidad, el dominio de Fc se produce en un sistema de expresión de mamífero que glucosila en forma apropiada el residuo correspondiente a la
20 asparagina 297. El dominio de Fc también puede incluir otras modificaciones eucarióticas post-traduccion.

Las moléculas de anticuerpos también pueden producirse a través de un animal transgénico. Por ejemplo, la Patente U.S. No. 5,849,992 describe un método para expresar un anticuerpo
25 en la glándula mamaria de un mamífero transgénico. Se

construye un transgen que incluye un promotor específico de la leche y ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo de interés y una secuencia de señalización para secreción. La leche producida por las hembras de tales animales transgénicos incluye, secretado en ella, el anticuerpo de interés. La molécula de anticuerpo puede purificarse a partir de la leche, o para algunas aplicaciones usarse directamente.

Caracterización

10 Las propiedades de unión de un agente de unión se pueden medir mediante cualquier método estándar, por ejemplo uno de los siguientes métodos: análisis BIACORE™, Prueba de Inmunosorción Ligado a Enzimas (ELISA), cristalografía de rayos x, análisis de secuencia y mutagénesis de exploración.

15 La capacidad de una proteína de neutralizar y/o inhibir uno o más actividades asociadas con IL-13 se puede medir mediante los siguientes métodos: pruebas para medir la proliferación de una línea celular dependiente de IL-13, por ejemplo TFI; pruebas para medir la expresión de polipéptidos mediados por

20 IL-13, por ejemplo análisis citométrico de flujo de la expresión de CD23; pruebas que miden la actividad de moléculas de señalización en dirección 3', por ejemplo STAT6; pruebas que miden la producción de tenascina; pruebas que analizan la eficiencia de un anticuerpo descrito en la

25 presente para prevenir el asma en un modelo animal relevante,

por ejemplo el mono cinomolgo, y otras pruebas. Un agente de unión de IL-13, en particular una molécula de anticuerpo de IL-13, puede tener un efecto estadísticamente significativo en una o más de estas pruebas. Ejemplos de las pruebas para
5 propiedades de unión incluyen lo siguiente.

La interacción de unión de un agente de unión de IL-13 y un objetivo (por ejemplo IL-13) se puede analizar usando resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés). SPR o Análisis de Interacción Biomolecular (BIA, por
10 sus siglas en inglés) detecta interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin marcar ninguno de los interactivos. Los cambios en la masa en la superficie de unión (indicativo de un evento de unión) de la memoria de BIA producen alteraciones del índice de refracción de luz cerca de la
15 superficie. Los cambios en la refractividad generan una señal detectable que se miden como una indicación de reacciones en tiempo real entre moléculas biológicas. Los métodos para usar SPR se describen, por ejemplo, en la Patente U.S. No. 5.641.640; Raether (1988) *Surface Plasmons* Springer Verlag;
20 Sjolander y Urbaniczky (1991) *Anal. Chem.* 63:2338-2345; Szabo et al. (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705 y recursos en línea proporcionados por BIAcore International AB (Uppsala, Suecia).

La información del SPR se puede usar para proporcionar
25 una medición precisa y cuantitativa de la constante de

disociación de equilibrio (K_d), y parámetros cinéticos, incluyendo K_{on} y K_{off} , para la unión de una biomolécula a un objetivo. Tales datos se pueden usar para comparar diferentes moléculas. La información de SPR también puede usarse para
5 desarrollar las relaciones de estructura-actividad (SAR). Por ejemplo, pueden evaluarse los parámetros de unión cinéticos y de equilibrio de diferentes moléculas de anticuerpo. Los aminoácidos variantes en las posiciones dadas pueden identificarse por la correlación con los parámetros de unión
10 particulares, por ejemplo, alta afinidad y K_{off} lento. Esta información se puede combinar con modelación estructural (por ejemplo usando modelación de homología, minimización de energía, o determinación de estructura mediante cristalografía de rayos x o RMN). Como resultado, se puede
15 formular un entendimiento de la interacción física entre la proteína y su objetivo y se puede usar para guiar a otros procesos de diseño.

Trastornos Respiratorios

20 Los agentes de unión de IL-13, por ejemplo, moléculas de anticuerpos anti-IL-13, se pueden usar para tratar o prevenir trastornos respiratorios incluyendo, pero no se limitan a asma (por ejemplo asma alérgica y asma no alérgica (por ejemplo debido a infección, por ejemplo, con virus sincitial
25 respiratorio (RSV), por ejemplo en niños más jóvenes));

bronquitis (por ejemplo, bronquitis crónica); enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) (por ejemplo, enfisema (por ejemplo enfisema inducido por el cigarrillo); condiciones relacionadas con la inflamación de las vías respiratorias, eosinofilia, fibrosis y producción en exceso de mucosa, por ejemplo fibrosis quística, fibrosis pulmonar y rinitis alérgica. Por ejemplo, un agente de unión de IL-13 (por ejemplo, una molécula de anticuerpo de IL-13) puede administrarse en una cantidad efectiva para tratar o prevenir el trastorno o mejorar por lo menos un síntoma del trastorno.

El asma puede ser disparada por innumerables condiciones, por ejemplo inhalación de un alérgeno, presencia de una infección respiratoria superior o de oído, etc. (Oppenwall (2003) *Nurs. Clin. North Am.* 38:697-711). El asma alérgica se caracteriza por hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR) a una variedad de estímulos específicos y no específicos, inmunoglobulina E de suero elevada (IgE), producción excesiva de mucosa de las vías respiratorias, edema, y lesión epitelial bronquial (Wills-Karp, *supra*). El asma alérgica comienza cuando el alérgeno provoca una respuesta inmediata temprana de las vías respiratorias, que con frecuencia es seguida varias horas más tarde por una respuesta retardada de fase tardía de las vías respiratorias (LAR) (Henderson et al. (2000) *J. Immunol.* 164:1086-95). Durante LAR, existe un influjo de eosinófilos, linfocitos y

macrófagos a lo largo de las vías respiratorias y del fluido bronquial. (Henderson et al., *supra*). La eosinofilia pulmonar es una característica distintiva del asma alérgica y es responsable de gran parte de la lesión al epitelio respiratorio. (Li et al. (1999) *J. Immunol.* 162:2477-87).

Las células de ayuda $CD4^+$ son importantes para la inflamación crónica asociada con el asma (Henderson et al., *supra*). Varios estudios mostraron que el compromiso de las células $CD4^+$ a las células de ayuda T de tipo 2 (Th2) y la producción posterior de citosinas de tipo 2 (por ejemplo IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) son importantes en la respuesta alérgica inflamatoria que produce AHR (Tomkinson et al. (2001) *J. Immunol.* 166:5792-5800, y las referencias que se mencionan en la misma). Primero, se mostró que las células T $CD4^+$ son necesarias para el asma inducido por alergia en modelos de murino. Segundo, las células T $CD4^+$ que producen citosinas de tipo 2 sufren una expansión no sólo en estos modelos animales sino que también en pacientes que padecen asma alérgico. Tercero, los niveles de citosina de tipo 2 incrementan en los tejidos de las vías respiratorias de modelos animales y asmáticos. Cuarto, se implicó que las citosinas Th2 desempeñan un papel central en el reclutamiento de eosinófilos en modelos de murino de asma alérgica, y células Th2 transferidas de manera adoptiva se correlacionaron con niveles incrementados de eotaxina (un

quimioatrayente eosinófilo potente) en el pulmón así como eosinofilia pulmonar (Wills-Karp et al, supra; Li et al, supra).

Los métodos para el tratamiento o prevención del asma que se describen en la presente incluyen aquellos para el asma extrínseco (también conocido como asma alérgico o asma atópico), asma intrínseco (también conocido como asma no alérgico o asma no atópico) o combinaciones de ambos, que se ha denominado como asma combinado. El asma extrínseco o alérgico incluye incidentes originados o asociados con, por ejemplo alergenios, tales como polen, esporas, hierbas, o malezas, rabia de mascotas, polvo, ácaros, etc. Como los alergenios y otros irritantes se presentan en diversos puntos durante el año, estos tipos de incidentes también se denominan asma de estación. El asma bronquial y aspergilosis broncopulmonar alérgica también se incluyen en el grupo de asma extrínseco.

Los trastornos que se pueden tratar o aliviar por medio de los agentes que se describen en la presente incluyen los trastornos respiratorios y asma causados por agentes infecciosos, tales como virus (por ejemplo, virus de resfrío y gripe, virus sincitial respiratorio (RSV), paramixovirus, rinovirus y virus de influenza. Las infecciones de virus RSV, rinovirus e influenza son comunes en niños, y son una causa que produce enfermedades del tracto respiratorio en infantes

y niños pequeños. Los niños con bronquiolitis viral pueden desarrollar respiración asmática crónica y asma, que se pueden tratar usando los métodos que se describen en la presente. También se incluye, las afecciones del asma que se
5 pueden presentar en algunos asmáticos debido al ejercicio y/o aire frío. Los métodos son útiles para asma asociados con exposición al humo (por ejemplo, humo inducido por cigarrillo e industrial), al igual que exposiciones industriales y laborales, tales como humo, ozono, gases nocivos, dióxido de
10 azufre, óxido nitroso, emanaciones, incluyendo isocianatos, de pintura, plásticos, poliuretanos, barnices, etc., madera, plantas y otros polvos orgánicos, etc. Los métodos también son útiles para incidentes asmáticos asociados con aderezos de alimentos, conservadores o agentes farmacológicos. También
15 se incluyen métodos para el tratamiento, inhibición o alivio de los tipos de asma denominados asma silencioso o asma variante de tos.

Los métodos que se describen en la presente también son útiles para el tratamiento y alivio de asma asociado con
20 reflujo gastrointestinal (GERD), que puede estimular la broncoconstricción. GERD, junto con secreciones corporales retenidas, tos reprimida, y exposición a alérgenos e irritantes en la habitación pueden contribuir con las afecciones asmáticas que se denominaron colectivamente como
25 asma de noche o nocturno. En los métodos de tratamiento,

inhibición o alivio del asma asociado con GERD, una cantidad efectiva para uso farmacéutico del antagonista IL-13 se puede usar según se describe en la presente en combinación con una cantidad efectiva para uso farmacéutico de un agente para el

5 tratamiento de GERD. Estos agentes incluyen, pero no se limitan a, agentes de inhibición de la bomba de protones como comprimidos de sodio pantoprazol de liberación retardada de marca PROTONIX®, cápsulas de liberación retardada de omeprazol de marca PRILOSEC®, comprimidos de liberación

10 retardada de rebepirazol sodio de marca ACIPHEX® o cápsulas de lansoprazol de liberación retardada de marca PREVACID®.

Trastornos atópicos y síntomas de los mismos

Se ha observado que las células de pacientes atópicos

15 tienen una sensibilidad mejorada a IL-13. Por lo tanto, un agente de unión de IL-13 (por ejemplo, un agente de unión de IL-13, tal como una molécula de anticuerpo descrita en la presente) puede administrarse en una cantidad efectiva para tratar o prevenir un trastorno atópico. "Atópico" se refiere

20 a un grupo de enfermedades en las cuales a menudo hay una tendencia heredada a desarrollar una reacción alérgica.

Ejemplos de trastornos atópicos incluyen alergia, rinitis alérgica, dermatitis atópica, asma y fiebre del heno. El asma es un trastorno fenotípicamente heterogéneo asociado

25 con síntomas respiratorios intermitentes tales como, por

ejemplo, hiperreactividad bronquial y obstrucción del flujo de aire reversible. Las características inmunohistopatológicas del asma incluyen, por ejemplo, erosión del epitelio de las vías respiratorias, depósito de colágeno debajo de la membrana de base; edema; activación de células madre; e infiltración celular inflamatoria (por ejemplo, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos). La inflamación de las vías respiratorias puede contribuir adicionalmente con la hiperreactividad de las vías respiratorias, limitación del flujo de aire, broncoconstricción aguda, formación de tapón de mucosa, remodelación de pared de las vías respiratorias y otros síntomas respiratorios. Un antagonista IL-13 (por ejemplo, un agente de unión de IL-13 tal como fragmento de unión a un anticuerpo o antígeno descrito en la presente) se puede administrar para aliviar uno o más de estos síntomas.

Los síntomas de la rinitis alérgica (fiebre del heno) incluyen picazón, goteo, estornutatoria u obstrucción de nariz, y picazón de ojos. Un antagonista de IL-13 se puede administrar para aliviar uno o más de estos síntomas. La dermatitis atópica es una enfermedad crónica (de larga duración) que afecta a la piel. Se puede obtener información sobre la dermatitis atópica, por ejemplo, de la Publicación de NIH No. 03-4272. En la dermatitis atópica, la piel puede originar una picazón extrema, que produce un enrojecimiento,

inflamación, ruptura, goteo de fluido claro y finalmente formación de cáscara y escamas. En muchos casos, existen períodos en los que la enfermedad empeora (denominados exacerbaciones o irritaciones) seguidos por períodos en los

5 que la piel mejora o se aclara completamente (denominados remisiones). La dermatitis atópica a menudo se denomina "eczema" que es un término general para varios tipos de inflamación de la piel. La dermatitis atópica es la más común de los muchos tipos de eczema. Ejemplos de dermatitis atópica

10 incluyen: eczema de contacto alérgico (dermatitis: una reacción rojiza, de picazón, que gotea donde la piel entró en contacto con una sustancia que el sistema inmune reconoce como extraña, tal como hiedra venenosa o ciertos conservadores en cremas y lociones); eczema de contacto (una

15 reacción localizada que incluye enrojecimiento, picazón, y ardor donde la piel entró en contacto con un alérgeno (una sustancia que produce alergia) o con un irritante tal como un ácido, un agente de limpieza u otro químico); eczema dishidrótico (irritación de la piel en las palmas de las

20 manos y en las plantas de los pies caracterizada por ampollas claras y profundas que pican y arden); neurodermatitis (parches de escamas de la piel en la cabeza, piernas inferiores, muñecas, o antebrazos ocasionadas por una picazón localizada (tal como un piquete de insecto) que se irritó

25 intensamente al rascarse); eczema numular (parches en forma

de monedas de piel irritada más comúnmente en los brazos, espalda, nalgas, y parte inferior de las piernas que puede poseer costras, escamas y picazón extremo); eczema seborreico (amarillento, aceitoso, parches escamosos de piel en el cuero cabelludo, cara y ocasionalmente en otras partes del cuerpo). Síntomas especiales adicionales incluyen dermatitis de estasis, pliegue atópico (plegamiento Dennie-Morgan, queilitis, palmas hiperlineales, párpados hiperpigmentados (párpados que se oscurecieron en color a partir de una inflamación o por la fiebre del heno), ictiosis, queratosis, liquenificación, pápulas, y urticaria. Un agente de unión de IL-13 se puede administrar para aliviar uno o más de estos síntomas.

Un método de ejemplo para el tratamiento de la rinitis alérgica u otros trastornos alérgicos puede incluir terapia de inicio con un antagonista de IL-13 antes de la exposición a un alérgeno, por ejemplo, antes de la exposición estacional a un alérgeno, por ejemplo, antes de los florecimientos de alérgenos. Tal terapia puede incluir una o más dosis, por ejemplo, dosis en intervalos regulares.

Cáncer

IL-13 y sus receptores pueden estar relacionados en el desarrollo de por lo menos algunos tipos de cáncer, por ejemplo, un cáncer que deriva de células hematopoyéticas o un

cáncer que deriva de células cerebrales o neuronales (por ejemplo, un glioblastoma). Por ejemplo, obstrucción de la ruta de señalización de IL-13, por ejemplo, el uso de un receptor de IL-13 soluble o un ratón deficiente STAT6 -/-, produce el inicio retardado de un tumor y/o crecimiento de líneas celulares del linfoma de Hodgkin o un carcinoma mamario metastásico, respectivamente (Trieu et al. (2004) Cancer Res. 64: 3271-75; Ostrand-Rosenberg et al. (2000) J. Immunol. 165: 6015-6019). Los cánceres que expresan IL-13R (2 (Husain and Puri (2003) J. Neurooncol. 65:37-48; Mintz et al. (2003) J. Neurooncol. 64:117-23) se pueden dirigir específicamente mediante los anticuerpos anti-IL-13 que se describen en la presente. Los agentes de unión de IL-13, por ejemplo, moléculas de anticuerpos anti-IL-13, pueden ser útiles para inhibir la proliferación de células cancerígenas u otra actividad celular cancerígena. Un cáncer se refiere a una o más células que posee una pérdida de respuesta a controles de crecimiento normales, y que típicamente prolifera con regulación reducida relativa a una célula normal correspondiente.

Ejemplos de cáncer contra los cuales se pueden usar los antagonistas IL-13 (por ejemplo, un agente de unión de IL-13 tal como un fragmento de anticuerpo o antígeno descrito en la presente) para el tratamiento incluyen leucemia, por ejemplo, leucemia linfocítica crónica de células B, leucemia mielógena

aguda y células T transformadas de tipo 1 del virus de leucemia de células T humanas (HTLV-1); linfomas, por ejemplo, linfoma de células T, linfoma de Hodgkin; glioblastomas; cánceres pancreáticos; carcinoma celular renal; carcinoma de ovarios; y sarcoma de Kaposi del SIDA. Por ejemplo, un agente de unión de IL-13 (por ejemplo una molécula de anticuerpo anti-IL-13) puede administrarse en una cantidad efectiva para tratar o prevenir el trastorno, por ejemplo, para reducir la proliferación celular o para mejorar por lo menos un síntoma del trastorno.

Fibrosis

Los agentes de unión de IL-13, también pueden ser útiles en el tratamiento de la inflamación y fibrosis, por ejemplo, fibrosis del hígado. La producción de IL-13 se correlacionó con el progreso de la inflamación del hígado (por ejemplo, hepatitis viral) hacia la cirrosis, y posiblemente, carcinoma hepatocelular (de Lalla et al. (2004) *J. Immunol.* 173:1417-1425). La fibrosis se produce, por ejemplo, cuando se reemplaza el tejido normal por tejido de cicatriz, a menudo a continuación de la inflamación. Los virus de la hepatitis B y de la hepatitis C causan una reacción fibrosa en el hígado, que puede progresar hasta la cirrosis. A su vez, la cirrosis, puede transformarse en complicaciones graves tales como insuficiencia del hígado o carcinoma hepatocelular. La

actividad de bloqueo de IL-13 usando los agentes de unión de IL-13, descritos en la presente, puede reducir la inflamación y la fibrosis, por ejemplo, la inflamación, fibrosis, y cirrosis asociada con enfermedades del hígado, en especial la hepatitis B y C. Por ejemplo, un agente de unión de IL-13 (por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-IL-13) puede administrarse en una cantidad efectiva para tratar o prevenir el trastorno o para mejorar por lo menos un síntoma del trastorno inflamatorio y/o fibrótico.

10

Enfermedad intestinal inflamatoria

La enfermedad intestinal inflamatoria (IBD, por sus siglas en inglés) es la denominación general para las enfermedades que producen la inflamación de los intestinos. Dos ejemplos de enfermedad de inflamación intestinal con la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. Se descubrió que la señalización de IL-13/STAT6 estuvo relacionado en la hipercontractividad inducida por inflamación del músculo liso de ratón, un modelo de enfermedad de inflamación intestinal (Akiho et al. (2002) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 282:G226-232). Por ejemplo, un agente de unión de IL-13 (por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-IL-13) puede administrarse en una cantidad efectiva para tratar o prevenir el trastorno o para mejorar por lo menos un síntoma del trastorno del intestino inflamatorio.

Agentes de unión de IL-13 adicionales

También se proporcionan agentes de unión, diferentes a los agentes de unión que son anticuerpos y fragmentos de los mismos, que se unen a IL-13, en especial agentes de unión que compiten con MJ2-7 ó C65 y otros anticuerpos que se describen en la presente para unirse a IL-13. Por ejemplo, los agentes de unión se pueden unir al mismo epítipo o a un epítipo superpuesto como MJ2-7 o C65 en IL-13. Los agentes de unión inhiben o neutralizan preferentemente la actividad de IL-13. Por ejemplo, los agentes de unión inhiben la unión de IL-13 a IL-13R α 1 y, por ejemplo, no previene la unión de IL-13 a IL-4R α . Tales agentes de unión se pueden usar en los métodos que se describen en la presente, por ejemplo, los métodos para tratar y prevenir trastornos. Todas las modalidades que se describen en la presente, se pueden adaptar para usar con los agentes de unión de IL-13.

Los agentes de unión se pueden identificar a través de una cantidad de medios, incluyendo modificar un dominio variable descrito en la presente o realizar un injerto de uno o más CDR de un dominio variable descrito en la presente en otro dominio de estructura. Los agentes de unión también se pueden identificar a partir de diversas bibliotecas, por ejemplo, por medio de selección. Un método para la selección de bibliotecas de proteínas usa la muestra de fagos. Las

regiones particulares de una proteína son variadas y se
identifican las proteínas que interactúan con IL-13, por
ejemplo, mediante la retención en un soporte sólido o
mediante otra asociación física. Para identificar agentes de
5 unión especiales que se unen al mismo epítipo o a un epítipo
superpuesto como MJ2-7 o C65 en IL-13, los agentes de unión
se pueden eluir agregando MJ2-7 o C65 (o un anticuerpo
relacionado), o se pueden evaluar los agentes de unión en
experimentos de competencia con MJ2-7 o C65 (o un anticuerpo
10 relacionado). También es posible reducir la biblioteca de
agentes que se unen a otros epítopos poniendo en contacto la
biblioteca con un complejo que contiene IL-13 y MJ2-7 ó C65
(o un anticuerpo relacionado). La biblioteca reducida se
puede contactar entonces con IL-13 para obtener un agente de
15 unión que se una con IL-13 pero no con IL-13 cuando se
encuentra unido por MJ2-7 o C65. También es posible usar
péptidos de IL-13 que contienen el epítipo de MJ2-7 o C65
como un objetivo.

El despliegue de fagos se describe, por ejemplo, en la
20 Patente U.S. No. 5,223,409; Smith (1985) *Science* 228:1315-
1317; WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO
93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; WO 90/02809; WO 94/05781;
Fuchs et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay et al.
(1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85; Huse et al. (1989)
25 *Science* 246:1275-1281; Griffiths et al. (1993) *EMBO J* 12:725-

734; Hawkins et al. (1992) *J Mol Biol* 226:889-896; Clackson et al. (1991) *Nature* 352:624-628; Gram et al. (1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrard et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Rebar et al. (1996) *Methods Enzymol.* 267:129-49; y
5 Barbas et al. (1991) *PNAS* 88:7978-7982. El despliegue de superficie de levadura se describe, por ejemplo, en Boder y Wittrup (1997) *Nat. Biotechnol.* 15:553-557. Otra forma de despliegue es el despliegue de ribosomas. Ver, por ejemplo, Mattheakis et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9022 y
10 Hanes et al. (2000) *Nat Biotechnol.* 18: 1287-92; Hanes et al. (2000) *Methods Enzymol.* 328:404-30 y Schaffitzel et al. (1999) *J Immunol Methods.* 231 (1-2):119-35.

Los agentes de unión que se unen a IL-13 pueden tener características estructurales de una proteína de andamiaje, por ejemplo, un dominio plegado. Un dominio de andamiaje que
15 sirve de ejemplo, basado en un anticuerpo, es un andamiaje de "minicuerpo" que se ha diseñado suprimiendo tres hebras beta de un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo monoclonal (Tramontano et al, 1994, *J. Mol. Recognit.* 7:9; y
20 Martin et al, 1994, *EMBO J.* 13, pp. 5303-5309). Este dominio incluye 61 residuos y puede usarse para presentar dos espiras hipervariables, por ejemplo, una o más espiras hipervariables de un dominio variable descrito en la presente o una variante descrita en la presente. En otro enfoque, el agente de unión
25 incluye un dominio de andamiaje que es un dominio similar a

una V (Coia et al. WO 99/45110). Los dominios similares a una V se refieren a un dominio que tiene características estructurales similares a los dominios pesados variables (VH) o ligeros variables (VL) de los anticuerpos. Otro dominio de andamiaje deriva de la tendamistatina, un "sandwich" de láminas beta de seis hebras, de 74 residuos, mantenidos por dos enlaces disulfuro (McConnell y Hoess, 1995, *J. Mol. Biol.* 250:460). Esta proteína progenitora incluye tres espiras. Las espiras pueden modificarse (por ejemplo, usando CDRs o espiras hipervariables descritas en la presente) o variarse, por ejemplo, para seleccionar dominios que se unan a IL-13. WO 00/60070 describe una estructura de " β -sandwich" derivada del dominio extracelular natural de CTLA-4, que puede usarse como dominio de andamiaje.

Inclusive otro dominio de andamiaje para un agente de unión a IL-13 es un dominio basado en el dominio de fibronectina tipo III o de proteínas relacionadas similares a la fibronectina. El plegamiento global del dominio de la fibronectina tipo III (Fn3) está estrechamente relacionado con el del fragmento de anticuerpo más pequeño funcional: el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo. Fn3 es un " β -sandwich" similar al del dominio del anticuerpo VH, excepto que Fn3 tiene siete hebras β en lugar de nueve. Existen tres espiras al final de Fn3; las posiciones de las espiras BC, DE y FG corresponden aproximadamente a las de CDR

1, 2 y 3 del dominio VH de un anticuerpo. Fn3 es ventajosa pues no tiene enlaces disulfuro. Por lo tanto, Fn3 es estable en condiciones reductoras, a diferencia de los anticuerpos y sus fragmentos (ver WO 98/56915, WO 01/64942, WO 00/34784).

- 5 Un dominio Fn3 puede modificarse (por ejemplo, usando CDRs o espiras hipervariables descritas en la presente) o variarse, por ejemplo, para seleccionar dominios que se unen a IL-13.

Inclusive otros dominios de andamiaje que sirven de ejemplo incluyen: receptores de células T; proteínas MHC;
10 dominios extracelulares (por ejemplo, repeticiones de fibronectina Tipo III, repeticiones EGF); inhibidores de proteasas (por ejemplo, dominios de Kunitz, ecotina, BPTI, etc.); repeticiones de TPR; estructuras de tres hojas; dominios dedo de zinc; proteínas de unión a ADN,
15 particularmente proteínas monoméricas de unión a ADN; proteínas de unión a ARN; enzimas, por ejemplo, proteasas (particularmente proteasas inactivadas), RNasa; carabinas, por ejemplo, tioredoxina, y proteínas de choque térmico; y dominios de señalización intracelular (tales como dominios
20 SH2 y SH3). La U.S. 20040009530 describe ejemplos de algunos andamiajes alternativos.

Los ejemplos de dominios de andamiaje pequeño incluyen: dominios de Kunitz (58 aminoácidos, 3 enlaces disulfuro), dominios del inhibidor de tripsina *Cucurbita maxima* (31
25 aminoácidos, 3 enlaces disulfuro), dominios relacionados con

guanilina (14 aminoácidos, 2 enlaces disulfuro), dominios relacionados con enterotoxina estable al calor 1A de bacterias gram negativas (18 aminoácidos, 3 enlaces disulfuro), dominios EGF (50 aminoácidos, 3 enlaces disulfuro), dominios de kringle (60 aminoácidos, 3 enlaces disulfuro), dominios que se unen a carbohidratos fúngicos (35 aminoácidos, 2 enlaces disulfuro), dominios de endotelina (18 aminoácidos, 2 enlaces disulfuro), y dominio que se une a la IgG de Streptococo G (35 aminoácidos, enlaces que no son de disulfuro). Ejemplos de dominios pequeños de andamiaje intracelular incluyen dominios SH2, SH3, y EVH. En general, puede usarse cualquier dominio modular, intracelular o extracelular.

Los criterios ejemplificativos para evaluar un dominio de andamiaje pueden incluir: (1) secuencia de aminoácidos, (2) secuencias de varios dominios homólogos, (3) estructura tridimensional, y/o (4) datos de estabilidad en un intervalo de pH, temperatura, salinidad, solvente orgánico, concentración de oxidante. En una modalidad, el dominio de andamiaje es un dominio pequeño de proteínas estables, por ejemplo, una proteína de menos de 100, 70, 50, 40 ó 30 aminoácidos. El dominio puede incluir uno o más enlaces disulfuro o puede quelar un metal, por ejemplo, zinc.

Incluso otros agentes de unión se basan en péptidos, por ejemplo, proteínas con una secuencia de aminoácidos que tiene

13

menos de 30, 25, 24, 20, 18, 15 ó 12 aminoácidos. Los péptidos pueden incorporarse en una proteína más grande, aunque normalmente una región que puede unirse en forma independiente a IL-13, por ejemplo, a un epítipo descrito en la presente. Los péptidos pueden identificarse por visualización de fago. Ver, por ejemplo, US 20040071705.

Un agente que se une a IL-13 puede incluir enlaces no peptídicos y otra modificación química. Por ejemplo, parte o la totalidad del agente de unión puede sintetizarse como péptido-mimético, por ejemplo, un peptoide (ver, por ejemplo, Simon et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9367-71 y Horwell (1995) *Trends Biotechnol*, 13:132-4). Un agente de unión puede incluir uno o más (por ejemplo, todos) enlaces no hidrolizables. Muchos enlaces peptídicos no hidrolizables se conocen en la técnica, junto con procedimientos para la síntesis de péptidos que contienen estos enlaces. Enlaces no hidrolizables ejemplificativos incluyen enlaces peptídicos de amida reducidos --[CH₂NH]--, enlaces peptídicos de cetometileno --[COCH₂]--, enlaces peptídicos --[CH(CN)NH]-- (cianometilen)amino, enlaces peptídicos de hidroxietileno --[CH₂CH(OH)]--, enlaces peptídicos --[CH₂O]--, y enlaces peptídicos tiometileno --[CH₂S]-- (ver por ejemplo, Patente U.S. No. 6,172,043).

25 Composiciones Farmacéuticas

119

Los agentes de unión de IL-13, por ejemplo, moléculas de anticuerpos que se unen a IL-13 (tal como los descritos en la presente) pueden usarse *in vitro*, *ex vivo*. Pueden incorporarse en una composición farmacéutica, por ejemplo, cuando se combinan con un agente de unión de IL-13 con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal composición puede contener, además de los antagonistas descritos en la presente y vehículo, varios diluyentes, rellenos, sales, amortiguadores, estabilizantes, solubilizantes, y otros materiales conocidos en la técnica. Los materiales farmacéuticamente aceptables en general son materiales que no interfieren con la efectividad de la actividad biológica de un agente de unión de IL-13. Las características del vehículo dependerán de la vía de administración.

La composición farmacéutica descrita en la presente también puede contener otros factores, tales como, sin carácter limitativo, otros anticuerpos anti-citosina u otros agentes antiinflamatorios como se describe en más detalle a continuación. Tales factores y/o agentes adicionales pueden incluirse en la composición farmacéutica para producir un efecto sinérgico con un agente de unión de IL-13, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-IL-13, descrita en la presente. Por ejemplo, en el tratamiento del asma alérgica, una composición farmacéutica descrita aquí puede incluir anticuerpos anti-IL-4 o fármacos conocidos por

reducir una respuesta alérgica.

La composición farmacéutica descrita en la presente puede encontrarse en la forma de un liposoma en la cual un agente de unión de IL-13, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-IL-13, descritos en la presente, se combina, además de otros vehículos aceptables desde el punto de vista farmacéutico, con agentes anfipáticos tales como lípidos que existen en forma agregada como micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos o capas lamelares, mientras se encuentran en solución acuosa. Los lípidos apropiados para formulación con liposomas incluyen, sin carácter limitativo, monoglicéridos, diglicéridos, sulfatidas, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares, y similares. Ejemplos de los métodos para preparar tales formulaciones de liposomas incluyen los métodos descritos en las Patentes U.S. Nos. 4,235,871; 4,501,728; 4,837,028; y 4,737,323.

Como se usa en la presente, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad total de cada componente activo de la composición farmacéutica o método, que es suficiente para mostrar un beneficio significativo para el paciente, por ejemplo, atenuación de los síntomas de, curación de, o aumento en la velocidad de curación de tales condiciones. Cuando se aplican a un componente activo individual, administrado solo, el término se refiere a este ingrediente solo. Cuando se aplica a una

combinación, el término se refiere a cantidades combinadas de los componentes activos que producen el efecto terapéutico, ya sea administrado en combinación, en forma serial o en forma simultánea.

5 En la práctica de el método de tratamiento o uso, una cantidad terapéuticamente efectiva de antagonista de IL-13, por ejemplo, molécula de anticuerpo anti-IL-13 o su fragmento, descritos en la presente, por ejemplo, una molécula de anticuerpo que se une a IL-13 e interfiere con la
10 formación de un complejo de señalización de IL-13 funcional (y, por ejemplo, neutraliza o inhibe una o más actividades asociadas con IL-13), se administra a un paciente, por ejemplo, mamífero (por ejemplo, un humano). Un agente de unión de IL-13, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-
15 IL-13, puede administrarse de acuerdo con el método descrito en la presente ya sea solo o combinado con otros tratamientos tales como tratamientos que emplean citosinas, linfoquinas u otros factores hematopoyéticos, productos terapéuticos contra el cáncer, o agentes antiinflamatorios. Cuando se administra
20 en forma concomitante con uno o más agentes, un agente de unión de IL-13, por ejemplo, molécula de anticuerpo anti-IL-13, puede administrarse ya sea en forma simultánea con el segundo agente, o en forma secuencial. Si se administra en forma secuencial, el médico a cargo del tratamiento decidirá
25 sobre la secuencia apropiada de administración de un agente

de unión de IL-13, en combinación con otros agentes.

La administración de un agente de unión IL-13, por ejemplo, molécula de anticuerpo anti-IL-13 o su fragmento, usado en la composición farmacéutica puede llevarse a cabo en una variedad de modos convencionales, tales como ingestión oral, inhalación, o inyección cutánea, subcutánea o intravenosa. Cuando una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente de unión de IL-13, por ejemplo, molécula de anticuerpo anti-IL-13 o su fragmento, se administra por inyección endovenosa, cutánea o subcutánea, el agente de unión puede prepararse como solución acuosa libre de pirógenos, aceptable para uso parenteral. La composición de tales soluciones proteicas aceptables para uso parenteral, pueden adaptarse desde el punto de vista de factores, tales como pH, isotonicidad, estabilidad, y similares, por ejemplo, para optimizar la composición para las condiciones fisiológicas, estabilidad del agente de unión, etcétera. Una composición farmacéutica para inyección endovenosa, cutánea, o subcutánea puede contener, por ejemplo, un vehículo isotónico tal como Inyección de Cloruro de Sodio, Inyección de Ringer, Inyección de Dextrosa, Dextrosa e Inyección de Cloruro de Sodio, Inyección de Ringer lactada u otro vehículo como se conoce en la técnica. La composición farmacéutica también puede contener estabilizantes, conservadores, amortiguadores, antioxidantes, u otros aditivos.

. 00219

La cantidad de un agente de unión de IL-13, por ejemplo, molécula de anticuerpo anti-IL-13, en la composición farmacéutica puede depender de la naturaleza y gravedad de la afección tratada, y de la naturaleza de tratamientos anteriores a los que se ha sometido el paciente. La composición farmacéutica puede administrarse a pacientes normales o pacientes que no muestran síntomas, por ejemplo, en un modo profiláctico. Un médico a cargo puede decidir la cantidad de agente de unión de IL-13, por ejemplo, molécula de anticuerpo anti-IL-13, con el cual tratar a cada paciente individual. Por ejemplo, un médico a cargo puede administrar bajas dosis de antagonista y observar la respuesta del paciente. Dosis más grandes de antagonista pueden administrarse hasta obtener el efecto terapéutico óptimo para el paciente, y en ese punto, en general no se aumenta en forma adicional la dosificación. Por ejemplo, un producto farmacéutico puede contener entre aproximadamente 0,1 mg a 50 mg de anticuerpo por kg de peso corporal, por ejemplo, entre aproximadamente 0.1 mg y 5 mg o entre aproximadamente 8 mg y 50 mg de anticuerpo por kg de peso corporal. En una modalidad en la cual el anticuerpo se administra por vía subcutánea a una frecuencia de no más de dos veces por mes, por ejemplo, cada semana o mensualmente, la composición incluye una cantidad de aproximadamente 0.7-3.3, por ejemplo, 1.0-3.0 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0.8-1.2 ó 1.2-2.8, 2.8-

3.3 mg/kg.

La duración del tratamiento usando la composición farmacéutica puede variar, dependiendo de la gravedad de la enfermedad y la afección tratada y la potencial respuesta idiosincrásica de cada paciente individual. En una modalidad, el agente de unión de IL-13, por ejemplo, molécula de anticuerpo anti-IL-13, también puede administrarse a través de la vía subcutánea, por ejemplo, en el intervalo de una vez por semana, una vez cada 24, 48, 96 horas, o no con mayor frecuencia que tales intervalos. Ejemplos de las dosis pueden encontrarse en el intervalo de 0.1-20 mg/kg, con mayor preferencia 1-10 mg/kg. El agente puede administrarse, por ejemplo, por infusión endovenosa a una velocidad de menos de 20, 10, 5 ó 1 mg/min para alcanzar una dosis de aproximadamente 1 a 50 mg/m² o aproximadamente 5 a 20 mg/m².

En una modalidad, una administración de un agente de unión de IL-13 al paciente incluye variar la dosificación de la proteína, por ejemplo, para reducir o minimizar los efectos colaterales. Por ejemplo, el paciente puede recibir una primera dosis, por ejemplo, una dosificación menos de una cantidad terapéuticamente efectiva. En un intervalo posterior, por ejemplo, por lo menos 6, 12, 24 ó 48 horas más tarde, al paciente se le puede administrar una segunda dosificación, por ejemplo, una dosificación que es por lo menos 25, 50, 75 ó 100% más grande que la primera dosis. Por

ejemplo, la segunda y/o una tercera, cuarta y quinta dosis comparable puede ser por lo menos aproximadamente 70, 80, 90 ó 100% de una cantidad terapéuticamente efectiva.

5

Inhalación

Una composición que incluye un agente de unión de IL-13, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-IL-13, puede formularse para inhalación u otro modo de administración pulmonar. En consecuencia, el agente de unión de IL-13 descrito en la presente puede administrarse por inhalación al tejido pulmonar. El término "tejido pulmonar" como se usa en la presente se refiere a cualquier tejido del tracto respiratorio e incluye tanto el tracto respiratorio superior e inferior, excepto donde se indique de otro modo. Un agente de unión de IL-13, por ejemplo, molécula de anticuerpo anti-IL-13, puede administrarse en combinación con uno o más de las modalidades existentes para tratar enfermedades pulmonares.

20 En un ejemplo, el agente de unión de IL-13 está formulado para un nebulizador. En una modalidad, el agente de unión de IL-13 puede almacenarse en forma liofilizada (por ejemplo, a temperatura ambiente) y reconstituirse en solución antes de la inhalación. También es posible formular el agente
25 de unión de IL-13 para inhalación usando un dispositivo

médico, por ejemplo, un inhalador. Ver, por ejemplo, U.S. 6,102,035 (un inhalador de polvo) y 6,012,454 (en un inhalador de polvo seco). El inhalador puede incluir compartimientos separados para el agente de unión de IL-13 a un pH apropiado para almacenamiento y otro compartimiento para un amortiguador neutralizador y un mecanismo para combinar el agente de unión de IL-13 con un amortiguador neutralizador inmediatamente antes de la atomización. En una modalidad, el inhalador es un inhalador de dosis medida.

Los tres sistemas comunes usados para administrar fármacos en forma local a los pasajes de aire pulmonares incluyen inhaladores de polvo seco (DPI), inhaladores de dosis medida (MDI) y nebulizadores. Los MDI, el método más popular de administración por inhalación, pueden usarse para administrar medicamentos en forma solubilizada o como una dispersión. Normalmente los MDI comprenden un propulsor de Freón u otro propulsor con presión de vapor relativamente alta que fuerza la medicación en aerosol en el tracto respiratorio luego de la activación del dispositivo. A diferencia de los MDI, los DPI en general se basan totalmente en los esfuerzos de inspiración del paciente por introducir un medicamento en una forma de polvo seco a los pulmones. Los nebulizadores forman un medicamento en aerosol que se inhalará impartiendo energía a la solución líquida. También se ha explorado la administración pulmonar directa de

fármacos durante la ventilación líquida o lavaje pulmonar usando un medio fluoroquímico. Estos y otros métodos pueden usarse para administrar un agente de unión de IL-13, por ejemplo, molécula de anticuerpo anti-IL-13. En una modalidad, 5 el agente de unión de IL-13 está asociado con un polímero, por ejemplo, un polímero que estabiliza o aumenta la vida media del compuesto.

Por ejemplo, para administración por inhalación, un agente de unión de IL-13, por ejemplo, una molécula de 10 anticuerpo anti-IL-13, se administra en forma de una atomización en aerosol desde un recipiente presurizado que contiene un propulsor apropiado o un nebulizador. El agente de unión de IL-13 puede encontrarse en la forma de una partícula anhidra o como líquido. Las partículas que incluyen 15 el compuesto pueden prepararse, por ejemplo, mediante secado por atomización, secando una solución acuosa del antagonista del agente de unión de IL-13, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-IL-13, con un agente neutralizador de carga y luego creando partículas del polvo seco o secando una 20 solución acuosa en un modificador orgánico y luego creando partículas del polvo seco.

El agente de unión de IL-13 puede administrarse de manera conveniente en forma de una presentación de atomización en aerosol de envases presurizados o un 25 nebulizador, con el uso de un propulsor apropiado, por

ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas apropiado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse suministrando una válvula
5 para administrar una cantidad medida. Las cápsulas y los cartuchos para uso en un inhalador o insuflador pueden formularse para que contengan una mezcla de polvo de un agente de unión de IL-13, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-IL-13, y una base de polvo apropiada tal como
10 lactosa o almidón, si la partícula es una partícula formulada. Además del compuesto formulado o no formulado, otros materiales tales como 100% de DPPC u otros surfactantes pueden mezclarse con el agente de unión de IL-13 para promover la administración y dispersión del compuesto
15 formulado o no formulado. Los métodos de preparación de las partículas secas se describen, por ejemplo, en WO 02/32406.

Un agente de unión de IL-13, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-IL-13, puede formularse para la administración en aerosol, por ejemplo, como partículas de
20 aerosol seco, tal que cuando se administra puede absorberse rápidamente y puede producir un resultado terapéutico local o sistémico rápido. La administración puede diseñarse para proveer actividad detectable dentro de 2 minutos, 5 minutos, 1 hora ó 3 horas de administración. En algunas modalidades,
25 la actividad pico puede lograrse incluso más rápidamente, por

ejemplo, dentro de media hora o incluso dentro de los diez minutos. Un agente de unión de IL-13, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-IL-13, puede formularse para una vida media biológica más extensa (por ejemplo, por asociación
5 con un polímero tal como PEG) para usar como alternativa a otros modos de administración, por ejemplo, tal que el compuesto entra en la circulación a partir del pulmón y se distribuye a otros órganos o a un órgano blanco en particular.

10 En una modalidad, el agente de unión de IL-13, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-IL-13 o su fragmento, se administra en una cantidad tal que por lo menos 5% de la masa del polipéptido se administra al tracto respiratorio inferior o a la parte profunda del pulmón. La
15 parte profunda del pulmón tiene una red de capilares extremadamente rica. La membrana respiratoria que separa el lumen capilar del espacio de aire alveolar es muy delgada ($\leq 6 \mu\text{m}$) y extremadamente permeable. Además, la capa de líquido que recubre la superficie alveolar es rica en tensioactivos
20 pulmonares. En otras modalidades, por lo menos 2%, 3%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% u 80% de la composición de un agente de unión de IL-13, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-IL-13, se administra al tracto respiratorio inferior o a la parte profunda del pulmón. La administración
25 a cualquiera o a ambos tejidos produce una absorción

125

eficiente del agente de unión de IL-13 y alta biodisponibilidad. En una modalidad, el agente de unión de IL-13 se provee en una dosis medida usando, por ejemplo, un inhalador o nebulizador. Por ejemplo, el agente de unión de IL-13 se administra en una forma de dosificación unitaria de por lo menos aproximadamente 0.02, 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 5, 10, 20, 40 ó 50 mg/disparo o más. El porcentaje de biodisponibilidad puede calcularse de la siguiente manera:

5 porcentaje de biodisponibilidad = $(AUC_{\text{no invasiva}}/AUC_{\text{i.v. o s.e.}}) \times$
10 $(\text{dosis}_{\text{i.v. o s.e.}}/\text{dosis}_{\text{no invasiva}}) \times 100.$

Aunque no es necesario, pueden usarse potenciadores de administración tales como tensioactivos para potenciar en forma adicional la administración pulmonar. Un "tensioactivo" como se usa en la presente, se refiere a un agente de unión de IL-13 que tiene un radical hidrofílico o lipofílico, que promueve la absorción de un fármaco interactuando con una interfase entre dos fases no miscibles. Los tensioactivos son útiles en las partículas secas por varias razones, por ejemplo, reducción de la aglomeración de partículas, reducción de fagocitosis de macrófago, etc. Cuando se acopla con un tensioactivo pulmonar, puede lograrse una absorción más eficiente del agente de unión de IL-13 ya que los tensioactivos, tales como DPPC, facilitarán en gran medida la difusión del compuesto. Los tensioactivos son conocidos en la técnica e incluyen sin carácter limitativo fosfoglicéridos,

15
20
25

. 00257

por ejemplo, fosfatidilcolinas, L-alfa-fosfatidilcolina
dipalmitoilo (DPPC) y difosfatidil glicerol (DPPG);
hexadecanol; ácidos grasos; polietilenglicol (PEG);
polioxietilen-9-; auryl éter; ácido palmítico; ácido oleico;
5 trioleato de sorbitan (Span 85); glicocolato; surfactina;
poloxómero; éster del ácido graso de sorbitan; trioleato
sorbitan; tiloxapol; y fosfolípidos.

Estabilización

10 En una modalidad, un agente de unión de IL-13, por
ejemplo, molécula de anticuerpo anti-IL-13, está físicamente
asociado con un radical que mejora su estabilización y/o
retención en la circulación, por ejemplo, en la sangre,
suero, linfo, lavaje pulmonar u otros tejidos, por ejemplo,
15 en por lo menos 1,5, 2, 5, 10 ó 50 veces.

Por ejemplo, un agente de unión de IL-13, por ejemplo,
una molécula de anticuerpo anti-IL-13, puede asociarse con un
polímero, por ejemplo, polímeros sustancialmente no
antigénicos, tales como óxidos de polialquileno u óxidos de
20 polietileno. Los polímeros apropiados variarán
sustancialmente en peso. Pueden usarse los polímeros que
tienen pesos moleculares de número promedio que oscilan desde
aproximadamente 200 hasta aproximadamente 35,000 (o
aproximadamente 1,000 hasta aproximadamente 15,000, y 2,000
25 hasta aproximadamente 12,500).

Por ejemplo, un agente de unión de IL-13, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-IL-13, puede conjugarse a un polímero soluble en agua, por ejemplo, polímeros polivinílicos hidrofílicos, por ejemplo, alcohol polivinílico y polivinilpirrolidona. Un listado no limitativo de tales polímeros incluye homopolímeros de óxido de polialquilenos tales como polietilenglicol (PEG) o propilenglicoles, polioles polioxietilenados, sus copolímeros y sus copolímeros de bloque, siempre que se mantenga la solubilidad en agua de los copolímeros de bloque. Los polímeros útiles adicionales incluyen polioxialquilenos tales como polioxietileno, polioxipropileno, y copolímeros de bloque de polioxietileno y polioxipropileno (Pluronic); polimetacrilatos; carbómeros; polisacáridos ramificados o no ramificados que comprenden los monómeros sacáridos D-manosa, D- y L-galactosa, fucosa, fructosa, o-xilosa, L-arabinosa, ácido o-glucurónico, ácido siálico, ácido D-galacturónico, ácido D-manurónico. (por ejemplo, ácido polimannurónico, o ácido algínico), D-glucosamina, D-galactosamina, D-glucosa y ácido neuramínico incluyendo homopolisacáridos y heteropolisacáridos tales como lactosa, amilopectina, almidón, hidroxietil almidón, amilosa, sulfato de dextrano, dextrano, dextrinas, glicógeno, o la subunidad de polisacárido de ácidos mucopolisacáridos, por ejemplo, ácido hialurónico ácido; polímeros de alcoholes de azúcar tales como polisorbitol y polimanitol; heparina o

heparan.

Los conjugados de un agente de unión de IL-13, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-IL-13, y un polímero pueden separarse de los materiales iniciadores sin reaccionar, por ejemplo, por filtración en gel o cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo, HPLC. Las especies heterólogas de los conjugados se purifican entre sí de la misma manera. La resolución de diferentes especies (por ejemplo, que contienen uno o dos residuos de PEG) también es posible debido a la diferencia en las propiedades iónicas de los aminoácidos sin reaccionar. Ver, por ejemplo, WO 96/34015.

Uso de antagonistas de IL-13 para modular uno o más actividades asociadas con IL-13 in vivo

Incluso en otro aspecto, la invención caracteriza un método para modular (por ejemplo, reducir, neutralizar e/o inhibir) una o más actividades asociadas de IL-13 in vivo mediante la administración de un agente de unión de IL-13, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-IL-13, descritos en la presente en una cantidad suficiente para inhibir su actividad. Un agente de unión de IL-13, también puede administrarse a pacientes para los cuales se requiere inhibición de una respuesta inflamatoria mediada por IL-13. Estas afecciones incluyen, por ejemplo, inflamación de las

vías respiratorias, asma, fibrosis, eosinofilia y aumento de la producción de mucosidad.

La eficacia de un agente de unión de IL-13, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-IL-13, descritos en la presente puede evaluarse, por ejemplo, mediante la evaluación
5 de la capacidad del antagonista para modular la inflamación de las vías respiratorias en monos cinomolgos expuestos a un alérgeno de *Ascaris suum*. Un agente de unión de IL-13, particularmente uno que inhibe por lo menos una actividad de
10 IL-13, puede usarse para neutralizar o inhibir una o más actividades asociadas con IL-13, por ejemplo, para reducir la inflamación mediada por IL-13 *in vivo*, por ejemplo, para tratar o prevenir patologías asociadas con IL-13, incluyendo asma y/o sus síntomas asociados.

15 En una modalidad, un agente de unión de IL-13, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-IL-13, por ejemplo, sus composiciones farmacéuticas, se administra en tratamiento combinado, es decir, combinados con otros agentes, por ejemplo, agentes terapéuticos, que son útiles para tratar
20 afecciones o trastornos patológicos, tales como trastornos alérgicos e inflamatorios. El término "en combinación" en este contexto se refiere a que los agentes se administran sustancialmente en forma contemporánea, ya sea en forma simultánea o en forma secuencial. Si se administra en forma
25 secuencial, en el inicio de administración del segundo

compuesto, el primero de los dos compuestos de preferencia es detectable en concentraciones efectivas en el sitio de tratamiento.

Por ejemplo, el tratamiento combinado puede incluir uno
5 o más agentes de unión de IL-13, por ejemplo, anticuerpos anti-IL-13 y sus fragmentos, por ejemplo, que se unen a IL-13 e interfieren con la formación de un complejo de señalización de IL-13 funcional, formulado en forma conjunta con, y/o administrado en forma concomitante con, uno o más agentes
10 terapéuticos adicionales, por ejemplo, uno o más inhibidores de citosinas y factor del crecimiento, inmunosupresores, agentes antiinflamatorios, inhibidores metabólicos, inhibidores enzimáticos, y/o agentes citotóxicos o citostáticos, como se describe en más detalle a continuación.
15 En forma adicional, uno o más agentes de unión de IL-13, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-IL-13, pueden usarse en combinación con dos o más de los agentes terapéuticos descritos en la presente. Tales tratamientos combinados pueden usar en forma ventajosa dosificaciones más bajas de
20 los agentes terapéuticos administrados, evitando de este modo posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diferentes monoterapias. Además, los agentes terapéuticos descritos en la presente actúan en vías que difieren de la vía de IL-13/receptor de IL-13, y de este modo se espera que
25 potencien y/o sinergicen con los efectos de los agentes de

unión de IL-13.

Los agentes terapéuticos que interfieren con diferentes desencadenantes del asma o inflamación de las vías respiratorias, por ejemplo, agentes terapéuticos usados en el
5 tratamiento de la alergia, infecciones de las vías respiratorias superiores, o infecciones de los oídos, pueden usarse en combinación con un agente de unión de IL-13, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-IL-13. En una modalidad, uno o más agentes de unión de IL-13, por ejemplo,
10 anticuerpos anti-IL-13 y sus fragmentos, pueden formularse en forma conjunta con, y/o administrarse en forma concomitante con, uno o más agentes adicionales, tales como otros antagonistas de citosinas o factor del crecimiento (por ejemplo, receptores solubles, inhibidores peptídicos,
15 moléculas pequeñas, fusiones de ligandos), anticuerpos o sus fragmentos que se unen al antígeno que se unen a otros blancos (por ejemplo, anticuerpos que se unen a otras citosinas o factores del crecimiento, sus receptores, u otras moléculas de la superficie celular), y citosinas anti-
20 inflamatorias o sus agonistas. Ejemplos no limitantes de los agentes que pueden usarse en combinación con agentes de unión de IL-13, por ejemplo, anticuerpos anti-IL-13 y sus fragmentos, incluyen, pero no se limitan a, esteroides inhalados; beta-agonistas, por ejemplo, beta-agonistas de
25 acción corta o de acción prolongada; antagonistas de

leucotrienos o receptores de leucotrieno; combinación de fármacos, tales como ADVAIR®; inhibidores de IgE, por ejemplo, anticuerpos anti-IgE (por ejemplo, XOLAIR®); inhibidores de fosfodiesterasa (por ejemplo, inhibidores de PDE4); xantinas; fármacos anticolinérgicos; agentes de estabilización de células cebadas, tales como cromolina; inhibidores de IL-4; inhibidores de IL-5; inhibidores de eotaxina/CCR3 y antihistaminas.

En otras modalidades, uno o más agentes de unión de IL-13, por ejemplo, moléculas de anticuerpos anti-IL-13, pueden formularse en forma conjunta con, y/o administrarse en forma concomitante con, uno o más fármacos antiinflamatorios, inmunosupresores o inhibidores metabólicos o enzimáticos. Ejemplos de los fármacos o inhibidores que pueden usarse en combinación con los agentes de unión de IL-13, por ejemplo, anticuerpos anti-IL-13 y sus fragmentos, incluyen, pero no se limitan a, uno o más de: Ejemplos adicionales de los agentes terapéuticos que pueden co-administrarse y/o co-formularse con uno o más anticuerpos anti-IL-13 o fragmentos de los mismos, incluyen uno o más de: antagonistas de TNF (por ejemplo, un fragmento soluble de un receptor de TNF, por ejemplo, el receptor de TNF p55 o p75 de humano o derivados de los mismos, por ejemplo, TNFR-IgG de 75 kd (proteína de fusión del receptor de TNF-IgG de 75 kD, ENBREL™)); antagonistas de la enzima de TNF, por ejemplo, inhibidores de

la enzima que convierte $\text{TNF}\alpha$ (TACE), antagonistas del receptor muscarínico; antagonistas de $\text{TGF-}\beta$; interferón gama; perfenidona; agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, metotrexato, leflunomida o un sirolimo (rapamicina) o uno de sus análogos, por ejemplo, CCI-779; COX2 e inhibidores de cPLA2; NSAIDs; inmunomoduladores; inhibidores de p38, inhibidores de TPL-2, Mk-2 y $\text{NF}\kappa\text{B}$, entre otros.

Formulaciones para vacunas

10 En otro aspecto, la invención caracteriza un método para modificar una respuesta inmune asociada con la inmunización. Un agente de unión de IL-13 (por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-IL-13), puede usarse para aumentar la eficacia de la inmunización inhibiendo la actividad de IL-13.

15 Los agentes de unión de IL-13 pueden administrarse antes, durante o después de la liberación de un inmunógeno, por ejemplo, administración de una vacuna. En una modalidad, la inmunidad provocada por la vacunación es una inmunidad celular, por ejemplo, una inmunidad contra células

20 cancerígenas o células infectadas con virus, por ejemplo, infectadas con retrovirus, por ejemplo infectadas con VIH. En una modalidad, la formulación de vacuna contiene uno o más agentes de unión de IL-13 y un antígeno, por ejemplo, un inmunógeno. En otra modalidad, el agente de unión de IL-13 y

25 el inmunógeno se administran en forma separada, por ejemplo,

dentro de una hora, tres horas, un día o dos días entre sí. El agente de unión de IL-13 puede ser uno que neutraliza o inhibe una o más de las actividades de IL-13.

La inhibición de IL-13 puede mejorar la eficacia de, por ejemplo, vacunas celulares, por ejemplo, vacunas contra enfermedades tales como cáncer e infección viral, por ejemplo, infección retroviral, por ejemplo, infección por VIH. La inducción de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (CTL) producida por las vacunas está modulada en sentido descendente por las células T CD4⁺, probablemente a través de la citosina IL-13. La inhibición de IL-13 ha demostrado potenciar la inducción a través de las vacunas de la respuesta de CTL (Ahlers et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:13020-10325). Un agente de unión de IL-13, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-IL-13, un anticuerpo descrito en la presente, puede usarse en conjunto con una vacuna para aumentar la eficacia de la vacuna. El cáncer y la infección viral (tales como la infección retroviral (por ejemplo, VIH)) son ejemplos de trastornos contra los cuales puede ser efectiva la respuesta a la vacuna celular. La eficacia de la vacuna se mejora mediante el bloqueo de la señalización de IL-13 en el momento de vacunación (Ahlers et al. (2002) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99:13020-25). Una formulación para vacunas puede administrarse a un paciente en forma de una composición farmacéutica o terapéutica.

Métodos para diagnóstico, propósito y monitoreo de trastornos

Los agentes de unión de IL-13 pueden usarse *in vitro* e *in vivo* como agentes de diagnóstico. Un ejemplo de un método
5 incluye: (i) administrar el agente de unión de IL-13 (por ejemplo una molécula de anticuerpo IL-13) a un paciente; y (ii) detectar el agente de unión de IL-13 en el paciente. La detección puede incluir determinar la ubicación del agente de unión de IL-13 en el paciente. Otro ejemplo de un método
10 incluye poner en contacto un agente de unión de IL-13 con una muestra, por ejemplo, una muestra de un paciente. Puede determinarse la presencia o ausencia de IL-13 o el nivel de IL-13 (ya sea cualitativo o cuantitativo) en la muestra.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un
15 método de diagnóstico para detectar la presencia de una IL-13, *in vitro* (por ejemplo, una muestra biológica, tal como tejido, biopsia) o *in vivo* (por ejemplo, formación de imagen *in vivo* en un paciente).

El método incluye: (i) poner en contacto una muestra con
20 un agente de unión de IL-13; y (ii) detectar la formación de un complejo entre el agente de unión de IL-13 y la muestra. El método también puede incluir, poner en contacto una muestra de referencia (por ejemplo, una muestra de control) con el agente de unión, y determinar el grado de la formación
25 del complejo entre el agente de unión y la muestra con

relación a la misma para la muestra de referencia. Un cambio, por ejemplo, un cambio estadísticamente significativo, en la formación del complejo en la muestra o sujeto con relación a la muestra o el sujeto de control puede ser indicativo de la presencia de IL-13 en la muestra.

Otro método incluye: (i) administrar el agente de unión de IL-13 a un paciente; y (ii) detectar la formación de un complejo entre el agente de unión de IL-13, y el paciente. La detección puede incluir determinar la ubicación o tiempo de la formación del complejo.

El agente de unión de IL-13 puede marcarse directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección de la proteína adherida o no adherida. Las sustancias detectables apropiadas incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos.

La formación de complejo entre el agente de unión de IL-13 y la IL-13 puede detectarse a través de la medición o visualización del ligando unido a la IL-13 o el ligando no unido. Pueden usarse ensayos de detección convencionales, por ejemplo, un ensayo inmunoabsorbente ligado a las enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica de tejido. Además de marcar el agente de unión de IL-13, la presencia de IL-13 puede evaluarse en una muestra a través de un inmunoensayo de competición usando los estándares marcados

con una sustancia detectable y un agente de unión de IL-13 no marcado. En un ejemplo de esta prueba, la muestra biológica, los estándares marcados y el agente de unión de IL-13 están combinados y se determina la cantidad de estándar marcado
5 unido al ligando no marcado. La cantidad de L-13 en la muestra es inversamente proporcional a la cantidad de estándar marcado unido al agente de unión de IL-13.

Métodos para diagnosticar, pronosticar y/o monitorear el asma

10 Los agentes de unión descritos en la presente pueden usarse, por ejemplo, en los métodos para diagnosticar, pronosticar y monitorear el progreso del asma a través de la medición del nivel de IL-13 en una muestra biológica. Además, este descubrimiento permite la identificación de nuevos
15 inhibidores de señalización de IL-13, que también será útil en el tratamiento del asma.

Estos métodos para diagnosticar el asma alérgica y no alérgica pueden incluir detectar una alteración (por ejemplo, una reducción o un aumento) de IL-13 en una muestra
20 biológica, por ejemplo, suero, plasma, líquido de lavaje broncoalveolar, esputo, etc. "Diagnóstico" o "diagnosticar" se refiere a identificar la presencia o ausencia de una condición patológica. Los métodos de diagnóstico incluyen detectar la presencia de IL-13 a través de la determinación
25 de una cantidad experimental de polipéptido de IL-13 en una

muestra biológica, por ejemplo, en líquido de lavaje broncoalveolar, de un paciente (humano o mamífero no humano), y comparar la cantidad de prueba con una cantidad o intervalo normal (es decir, una cantidad o intervalo de un individuo(s) que se conozca que no sufra asma) para el polipéptido de IL-13. Mientras que un método de diagnóstico particular puede no proveer un diagnóstico definitivo del asma, es suficiente si el método provee una indicación positiva que ayuda en el diagnóstico.

10 Los métodos para pronosticar el asma y/o trastornos atópicos pueden incluir detectar la regulación hacia arriba de IL-13, a nivel de ARNm o de proteína. "Pronóstico" o "pronosticar" se refiere a predecir el desarrollo probable y/o gravedad de una condición patológica. Los métodos de
15 pronóstico incluyen determinar la cantidad de prueba de IL-13 en una muestra biológica de un paciente, y comparar la cantidad de prueba con una cantidad o intervalo de pronóstico (es decir, una cantidad o intervalo de individuos con gravedades variables del asma) para IL-13. Varias cantidades
20 de la IL-13 en una muestra de prueba son consistentes con determinados pronósticos para el asma. La detección de una cantidad de IL-13 en un nivel de pronóstico particular provee un pronóstico para el paciente.

La presente solicitud provee, además, métodos para
25 monitorear el curso del asma mediante la detección de la sub-

regulación de IL-13. Los métodos de monitoreo incluyen determinar la cantidad de pruebas de IL-13 en muestras biológicas tomadas de un paciente en un primero y un segundo momento, y comparar las cantidades. Un cambio en la cantidad
5 de IL-13 entre el primero y el segundo momento puede indicar un cambio en el curso del asma y/o trastorno atópico, con una reducción en la cantidad que indica la remisión del asma, y un aumento en la cantidad que indica la progresión del asma y/o trastorno atópico. Estas pruebas de monitoreo también son
10 útiles para evaluar la eficacia de una intervención terapéutica particular (por ejemplo, atenuación y/o retroceso de una enfermedad) en pacientes tratados por un trastorno asociado con la IL-13.

Los ligandos de proteínas marcados con fluoróforo y
15 cromóforo pueden prepararse. Los radicales fluorescentes pueden seleccionarse para tener una absorción sustancial a longitudes de onda mayores de 310 nm, y de preferencia por encima de 400 nm. Una variedad de fluorescedores y cromóforos apropiados se describen por Stryer (1968) *Science*, 162:526 y
20 Brand, L. et al. (1972) *Annual Review of Biochemistry*, 41:843-868. Los agentes de unión pueden marcarse con grupos de cromóforos fluorescentes por los procedimientos convencionales tales como los descritos en las Patentes U.S. Nos. 3,940,475, 4,289,747, y 4,376,110. Un grupo de
25 fluorescedores que tienen un número de propiedades deseables

- descritas con anterioridad es el de los colorantes de xanteno, que incluyen las fluoresceínas y las rodaminas. Otro grupo de compuestos fluorescentes son las naftilaminas. Una vez marcado con un fluoróforo o cromóforo, el agente de unión
- 5 puede usarse para detectar la presencia o localización de la IL-13 en una muestra, por ejemplo, usando microscopia fluorescente (tales como microscopia confocal o desconvolución).
- 10 **Análisis Histológicos.** La inmunohistoquímica puede realizarse usando los agentes de unión descritos en la presente. Por ejemplo, en el caso de un anticuerpo, el anticuerpo puede sintetizarse con una marca (tal como una marca de purificación o epítopo), o puede marcarse en forma
- 15 detectable, por ejemplo, conjugando una marca o grupo que se une a la marca. Por ejemplo, un quelador puede unirse al anticuerpo. El anticuerpo se pone en contacto luego con una preparación histológica, por ejemplo, una sección fija de tejido que se encuentra en un portaobjetos del microscopio.
- 20 Después de una incubación de unión, la preparación se lava para retirar el anticuerpo no unido. La preparación se analiza luego, por ejemplo, usando microscopia, para identificar si el anticuerpo se unió a la preparación. El anticuerpo (u otro polipéptido o péptido) puede no estar
- 25 marcados en el momento de la unión. Luego de unir y lavar, el

anticuerpo se marca para hacerlo detectable.

Arreglos de Proteínas. Un agente de unión de IL-13 (por ejemplo, una proteína que es un agente de unión de IL-13) también puede inmovilizarse en un arreglo de proteínas. El arreglo de proteína puede usarse como herramienta de diagnóstico, por ejemplo, para seleccionar muestras médicas (tales como células aisladas, sangre, suero, biopsias, y similares). El arreglo de proteína puede incluir, además, otros agentes de unión, por ejemplo, que se unen a IL-13 o a otras moléculas blanco.

Los métodos para producir arreglos de proteínas se describen, por ejemplo, en De Wildt et al. (2000) *Nat. Biotechnol.* 18:989-994; Lueking et al. (1999) *Anal. Biochem.* 270:103-111; Ge (2000) *Nucleic Acids Res.* 28, e3, I-VII; MacBeath and Schreiber (2000) *Science* 289:1760-1763; WO 01/40803 y WO 99/51773A1. Los polipéptidos para el arreglo pueden mancharse a alta velocidad, por ejemplo, usando aparatos robóticos comercialmente disponibles, por ejemplo, de Genetic Microsystems o BioRobotics. El sustrato del arreglo puede ser, por ejemplo, nitrocelulosa, plástico, vidrio, por ejemplo, vidrio modificado en la superficie. El arreglo puede incluir, además, una matriz porosa, por ejemplo, acrilamida, agarosa u otro polímero. Por ejemplo, el arreglo puede ser un arreglo de anticuerpos, por ejemplo,

como se describe en De Wildt, *supra*. Las células que producen la proteína pueden cultivarse en un filtro en un formato ordenado. La producción de proteínas se induce, y la proteína expresada se inmoviliza al filtro en la ubicación de la
5 célula.

Un arreglo de proteínas puede ponerse en contacto con un blanco marcado para determinar el grado de IL-13 en la muestra. Si la muestra no está marcada, puede usarse un método de interposición ("sandwich"), por ejemplo, usando una
10 sonda rotulada, para detectar la unión de IL-13. La información sobre el grado de unión a cada dirección del arreglo puede almacenarse como un perfil, por ejemplo, en una base de datos de computadora. El arreglo de proteína puede producirse por duplicados y usarse para comparar los perfiles
15 de unión, por ejemplo, de diferentes muestras.

Citometría de flujo. El agente de unión de IL-13 puede usarse para marcar células, por ejemplo, células en una muestra (por ejemplo, la muestra de un paciente). El agente de unión
20 también está unido (o puede unirse) a un compuesto fluorescente. Las células pueden analizarse luego por citometría de flujo y/o clasificarse usando una célula activada fluorescente clasificada (por ejemplo, usando un clasificador disponible de Becton Dickinson Immunocytometry
25 Systems, San Jose CA; ver también la Patente U.S. No.

5,627,037; 5,030,002; y 5,137,809). Conforme las células pasan a través del clasificador, un haz láser excita el compuesto fluorescente mientras que un detector cuenta las células que pasan a través y determina si un compuesto fluorescente está unido a la célula mediante la detección de la fluorescencia. La cantidad de la marca unida a cada célula puede cuantificarse y analizarse para caracterizar la muestra. El clasificador también puede dispersar la célula y separar las células unidas por el ligando de las células no unidas por el ligando. Las células separadas pueden cultivarse y/o caracterizarse.

Imágenes in vivo. Incluso en otra modalidad, la invención provee un método para detectar la presencia de una IL-13 dentro de un paciente *in vivo*. El método incluye (i) administrar a un paciente (por ejemplo, un paciente que tiene un trastorno asociado con IL-13) un anticuerpo anti-IL-13, conjugado a un marcador detectable; (ii) exponer al paciente a un medio para detectar el marcador detectable. Por ejemplo, el paciente se somete a imágenes, por ejemplo, por RMN u otros medios tomográficos.

Ejemplos de las marcas útiles para imágenes para diagnóstico incluyen radio-marcas tales como ^{131}I , ^{111}In , ^{123}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{32}P , ^{33}P , ^{125}I , ^3H , ^{14}C , y ^{188}Rh , marcas fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, marcas activas en

resonancia magnética nuclear, isótopos emisores de positrones detectables por un explorador para tomografía con emisión de positrones ("PET"), quimioluminiscentes tales como luciferina, y marcadores enzimáticos tales como peroxidasa o fosfatasa. Los emisores de radiación de gama corta, tales como isótopos detectables por sondas detectoras de gama corta también pueden emplearse. El agente de unión puede marcarse con tales reactivos usando las técnicas convencionales. Por ejemplo, ver Wensel and Meares (1983) *Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy*, Elsevier, New York para técnicas relacionadas con la radio-marcación de anticuerpos y Colcher et al. (1986) *Meth. Enzymol.* 121: 802-816. Un ligando radiomarcado puede usarse para pruebas de diagnóstico in vitro. La actividad específica de un ligando marcado isotópicamente depende de la vida media, la pureza isotópica de la marca radioactiva y el modo en que la marca se incorpora en el anticuerpo.

Los procedimientos para marcar polipéptidos con los isótopos radiactivos (tales como ^{14}C , ^3H , ^{35}S , ^{125}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{32}P , ^{33}P , y ^{131}I) se conocen en general. Ver, por ejemplo, Patente U.S. 4,302,438; Goding, J.W. (*Monoclonal antibodies: principles and practice: production and application of monoclonal antibodies in cell biology, biochemistry, and immunology* 2nd ed. London; Orlando: Academic Press, 1986. pp 124-126) y las referencias citadas; y A.R. Bradwell et al.,

"Developments in Antibody Imaging", *Monoclonal antibodies for Cancer Detection and Therapy*, R.W. Baldwin et al., (eds.), pp 65-85 (Academic Press 1985).

Los agentes de unión a IL-13 descritos en la presente
5 pueden conjugarse a agentes de contraste de Imagen de
Resonancia Magnética (MRI). Algunas técnicas de MRI se
resumen en la EP-A-O 502 814. En general, las diferencias en
las constantes del tiempo de relajación T1 y T2 de protones
de agua en diferentes entornos se usa para generar una
10 imagen. Sin embargo, estas diferencias pueden ser
insuficientes para proveer imágenes de alta resolución
exacta. Las diferencias en estas constantes del tiempo de
relajación pueden mejorarse por agentes de contraste. Los
ejemplos de tales agentes de contraste incluyen un número de
15 agentes magnéticos y agentes paramagnéticos (que
principalmente alteran T1) y ferromagnéticos o súper-
paramagnéticos (que alteran principalmente la respuesta de
T2). Los quelatos (por ejemplo, quelatos de EDTA, DTPA y NTA)
pueden usarse para unir (y reducir la toxicidad) de algunas
20 sustancias paramagnéticas (por ejemplo, Fe^{3+} , Mn^{2+} , Gd^{3+}).
Otros agentes pueden encontrarse en forma de partículas, por
ejemplo, menos de 10 μm hasta aproximadamente 10 nm de
diámetro) y que tienen propiedades ferromagnéticas,
antiferromagnéticas o súper-paramagnéticas. Los agentes de
25 unión de IL-13 también pueden marcarse con un grupo indicador

que contiene el átomo ¹⁹F activo en RMN, como se describe en el texto de Pykett (1982) *Scientific American*, 246:78-88 para ubicar u obtener imágenes de la distribución de IL-13.

También se encuentran dentro del alcance descrito en la
5 presente kits que comprenden un agente de unión de IL-13 e instrucciones para el uso como diagnóstico, por ejemplo, el uso del agente de unión de IL-13 (por ejemplo, una molécula de anticuerpo u otro polipéptido o péptido) para detectar IL-13, *in vitro*, por ejemplo, en una muestra, por ejemplo, una
10 biopsia o células de un paciente que tiene un trastorno asociado con IL-13, o *in vivo*, por ejemplo, por formación de imágenes en un paciente. El kit puede contener, además por lo menos un reactivo adicional, tal como una marca o agente de diagnóstico adicional. Para uso *in vivo* el ligando puede
15 formularse como una composición farmacéutica.

Kits

Un agente de unión de IL-13, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-IL-13, puede proveerse en un kit, por
20 ejemplo, como componente de un kit. Por ejemplo, el kit incluye (a) un agente de unión de IL-13, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-IL-13 y, opcionalmente, (b) un material informativo. El material informativo puede ser descriptivo, instructivo, de comercialización u otro material
25 que se refiera a un método, por ejemplo, un método descrito

en la presente El material informativo de los kits no se limita en su forma. En una modalidad, el material informativo puede incluir información sobre la producción del compuesto, peso molecular del compuesto, concentración, fecha de vencimiento, información sobre el lote o el sitio de producción, y así sucesivamente. En una modalidad, el material informativo se refiere al uso del ligando para tratar, prevenir, diagnosticar, pronosticar o monitorear un trastorno descrito en la presente.

10 En una modalidad, el material informativo puede incluir instrucciones para administrar un agente de unión de IL-13, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-IL-13, en un modo apropiado para realizar los métodos descritos en la presente, por ejemplo, en una dosis apropiada, forma de dosificación o modo de administración (por ejemplo, una 15 dosis, forma de dosificación, o modo de administración descritos en la presente). En otra modalidad, el material informativo puede incluir instrucciones para administrar un agente de unión de IL-13, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-IL-13, a un paciente apropiado, por ejemplo, 20 un humano, por ejemplo, un humano que tiene, o se encuentra en riesgo de, asma alérgico, asma no alérgico, o un trastorno mediado por IL-13, por ejemplo, un trastorno alérgico y/o inflamatorio, o infección por HTLV-1. La producción de IL-13 25 se ha correlacionado con la infección por HTLV-1 (Chung et

aL, (2003) *Blood* 102: 4130-36).

Por ejemplo, el material puede incluir instrucciones para administrar un agente de unión de IL-13, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-IL-13, a un paciente, un
5 paciente con, o en riesgo de asma alérgico, asma no alérgico, o un trastorno mediado por IL-13, por ejemplo, un trastorno alérgico y/o inflamatorio, o infección por HTLV-1.

El kit puede incluir uno o más envases para la composición que contiene un agente de unión de IL-13, por
10 ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-IL-13. En algunas modalidades, el kit contiene envases separados, divisores o compartimientos para la composición y material informativo. Por ejemplo, la composición puede contenerse en un frasco, ampollita o jeringa, y el material informativo puede
15 contenerse en una bolsa o mango de plástico. En otras modalidades, los elementos separados del kit están incluidos dentro de un recipiente único no dividido. Por ejemplo, la composición está incluida en un frasco, ampollita o jeringa, que tiene unido el material informativo en forma de una
20 etiqueta. En algunas modalidades, el kit incluye una pluralidad (por ejemplo, un cartón) de envases individuales, cada uno contienen una o más formas de dosificación unitarias (por ejemplo, una forma de dosificación descrita en la presente) de un agente de unión de IL-13, por ejemplo, una
25 molécula de anticuerpo anti-IL-13. Por ejemplo, el kit

incluye una pluralidad de jeringas, ampolletas, envases de aluminio, atomizadores o dispositivos de inhalación, cada uno contiene una dosis unitaria individual de un agente de unión de IL-13, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-IL-13,
5 o múltiples dosis unitarias.

El kit en forma opcional incluye un dispositivo apropiado para la administración de la composición, por ejemplo, una jeringa, inhalante, pipeta, fórceps, cuchara medidora, gotero (por ejemplo, gotero para los ojos), paño
10 (por ejemplo, un trapo de algodón o trapo de lana), o cualquier dispositivo de administración. En una modalidad preferida, el dispositivo es un dispositivo implantable que reparte dosis medidas del agente de unión.

Los Ejemplos que siguen se indican para ayudar en la
15 comprensión de las invenciones, aunque no pretenden, ni deben construirse, como límite de su alcance bajo ningún concepto.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

20 (a) Clonación de NHP-IL-13 y homología con IL-13 humana.

La IL-13 del mono cinomolgo se clonó usando sondas de hibridación. Una comparación de la secuencia de aminoácidos de IL-13 del mono cinomolgo contra la de IL-13 humana se muestra en la FIG. 1A. Existe un 94% de identidad de
25 aminoácidos las dos secuencias, debido a 8 diferencias de

aminoácidos. Una de estas diferencias, R130Q, representa un polimorfismo humano común expresado preferiblemente en pacientes asmáticos (Heinzmann et al, (2000) *Hum. Mol. Genet.* 9:549-559).

5

(b) Unión de NHP-IL-13 a IL-13R α 2 humano.

La IL-13 humana puede unirse con alta afinidad a la forma alfa2 del receptor de IL-13 (IL13R α 2). Una forma soluble de este receptor se expresó con una cola IgG1 Fc humana (sIL13R α 2-Fc). Mediante la unión a IL-13 y secuestro de la citosina de la superficie celular el complejo de señalización IL13R α 1-IL4R, sIL13R α 2-Fc actúa como un potente inhibidor de bioactividad de IL-13 humana. sIL13R α 2-Fc demostró unirse a NHP-IL-13 producida por células CHO y producida por *E. coli*.

(c) Bioactividad de NHP-IL-13 en monocitos humanos

(i) Expresión de CD23 en monocitos humanos. El ADNc que codifica IL-13 de mono cinomolgo se expresó en *E. coli* y se volvió a doblar para mantener la bioactividad. La reactividad de las células humanas en IL-13 de cinomolgo se demostró usando un bioensayo en el cual células mononucleares de sangre periférica normal de donantes sanos se tratan con IL-13 durante la noche a 37°C. Esto induce sub-regulación de la expresión de CD23 en la superficie de los monocitos. Los

resultados mostraron que IL-13 de cinomolgo tenía bioactividad sobre monocitos humanos primarios.

(ii) Fosforilación de STAT6 en células HT-29. La línea
5 celular epitelial humana HT-29 responde a IL-13
experimentando fosforilación de STAT6, una consecuencia de la
transducción de señal a través del receptor de IL-13. Para
probar la habilidad de NHP-IL-13 recombinante para inducir la
fosforilación de STAT6, se estimularon células HT-29 con el
10 NHP-IL-13 durante 30 minutos a 37°C, luego se fijaron, se
permeabilizaron y se mancharon con anticuerpo fluorescente a
fosfo-STAT6. Los resultados mostraron que IL-13 de cinomolgo
indujo en forma eficiente la fosforilación de STAT6 en esta
línea celular humana.

15

(d) Generación de anticuerpos que se unen a NHP-IL-13.

Los ratones u otros animales apropiados pueden
inmunizarse y mejorarse con IL-13 de cinomolgo, por ejemplo,
usando uno o más de los siguientes métodos. Un método para la
20 inmunización puede combinarse tanto con el mismo como con un
método diferente de potenciación:

(i) Inmunización con proteína IL-13 de cinomolgo
expresada en *E. coli*, purificada de anticuerpos de inclusión,
25 y se volvió a doblar para preservar la actividad biológica.

Para la inmunización, se emulsiona la proteína con adyuvante completo de Freund (CFA) y se inmunizan los ratones de acuerdo con protocolos estándares. Para potenciar, la misma proteína se emulsiona con un adyuvante incompleto de Freund (IFA).

(ii) Inmunización con péptidos que recorren la secuencia completa de IL-13 de cinomolgo maduro. Cada péptido contiene por lo menos un aminoácido que es único para la IL-13 de cinomolgo y no está presente en la proteína humana. Ver FIG. 1B. Donde el péptido tiene un residuo C-terminal distinto de cisteína, se agrega cisteína para la conjugación a una proteína vehículo. Los péptidos se conjugan a una proteína vehículo inmunogénica tal como KLH, y se usan para inmunizar ratones de acuerdo con protocolos estándares. Para la inmunización, la proteína se emulsiona con adyuvante completo de Freund (CFA) y se inmunizan ratones de acuerdo con protocolos estándares. Para potenciar, la misma proteína se emulsiona con adyuvante incompleto de Freund (IFA).

(iii) Inmunización con NHP-IL-13 - que codifica ADNc expresado. El ADNc que codifica NHP-IL-13, incluyendo la secuencia líder, se clona en un vector apropiado. Este ADN se recubre sobre perlas de oro que se inyectan por vía intradérmica mediante una pistola de genes.

153

(iv) La proteína o los péptidos pueden usarse como un blanco para seleccionar una biblioteca de proteínas, por ejemplo, una biblioteca de visualización de fago o ribosomas. Por ejemplo, la biblioteca puede visualizar moléculas
5 variadas de inmunoglobulina, por ejemplo, Fab's, scFv's o Fd's.

(e) Selección de clones de anticuerpo reactivos cruzados con NHP y en forma opcional una IL-13 humana, por ejemplo,
10 una IL-13 humana nativa.

Selección primaria

La selección primaria para los clones fue la selección de la unión a NHP-IL-13 recombinante por ELISA. En esta
15 ELISA, se recubren los pozos con NHP IL-13 recombinante. El suero inmune se agregó en diluciones seriales y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Se lavaron los pozos con PBS que contiene 0.05% TWEEN®-20 (PBS-Tween). Se detectó el anticuerpo unido usando IgG anti-ratón marcado con
20 peroxidasa de rábano (HRP) y sustrato de TMB. Se leyó la absorbancia a 450 nm. Normalmente, todos los ratones inmunizados generaron altos títulos de anticuerpo a NHP-IL-13.

25 Selección secundaria

La selección secundaria fue la selección para inhibición de anticuerpo a NHP-IL-13 recombinante a sIL-13R α 1-Fc por ELISA. Se recubrieron los pozos con IL-13R α 1-Fc soluble, al cual pudiera unirse la NHP-IL-13 con marca FLAG. Esta unión
5 se detectó con anticuerpo anti-FLAG conjugado a HRP. La hidrólisis del sustrato TMB se leyó como absorbancia a 450 nm. En la prueba, la NHP-IL-13 marcada con FLAG se agregó junto con concentraciones crecientes de suero inmune. Si el suero inmune contenía anticuerpo que se unió a NHP-IL-13 y
10 evitaba su unión al sIL-13R α 1-Fc que recubría los pozos, se reducía la señal de ELISA. Todos los ratones inmunizados produjeron anticuerpo que se completaba con la unión de sIL-13R α 1-Fc a NHP-IL-13, pero los títulos variaron de ratón a ratón. Se seleccionaron los bazos para fusión de animales
15 cuyo suero mostraba que inhibía la unión de sIL13R α 1-Fc a NHP-IL-13 a la dilución más alta.

Selección terciaria

Una selección terciaria evaluó la inhibición de la
20 bioactividad de NHP-IL-13. Varios bioensayos se encontraron disponibles para usarse, incluyendo la prueba de proliferación de TF-1, la prueba de expresión de monocitos CD23, y la prueba de fosforilación STAT6 en células HT-29. También se evaluaron los sueros inmunes para determinar la
25 inhibición de fosforilación de STAT6 mediada por NHP-IL-13.

La línea celular epitelial humana HT-29 se estimuló durante 30 minutos a 37°C con NHP-IL-13 recombinante en presencia o ausencia de la concentración indicada de suero inmune de ratón. Luego se fijaron las células, se permeabilizaron y se
5 mancharon con ALEXA™ Fluor 488 conjugado mAb a fosfo-STAT6 (Pharmlngen). El porcentaje de células que respondían a IL-13 al someterlas a fosforilación de STAT6 se determinó por citometría de flujo. Los bazos de los ratones de la actividad de neutralización más potente, determinada como la inhibición
10 más fuerte de bioactividad de NHP-IL-13 a una dilución de suero elevada, se seleccionaron para generación de hibridomas.

Selección cuaternaria

15 Una preparación en bruto que contiene IL-13 humana se generó a partir de células mononucleares de sangre de cordón umbilical humano (BioWhittaker/Cambrex). Las células se cultivaron en un incubador a 37°C a 5% de CO₂, en medio de RPMI que contiene 10% de FCS inactivado por calor, 50 U/ml de
20 penicilina, 50 mg/ml de estreptomicina, y L-glutamina 2 mM. Se estimularon las células durante 3 días con el PHA-P de mitógeno (Sigma), y se saltearon hasta Th2 con IL-4 recombinante humana (R&D Systems) e IL-12 anti-humana. Las células Th2 se expandieron durante una semana con IL-2, luego
25 se activaron para producir citosinas por tratamiento con

forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) e ionomicina durante tres días. Se recolectó el sobrenadante y se dializó para retirar PMA y ionomicina. Para eliminar GM-CSF e IL-4, que podrían interferir con los bioensayos para determinar IL-13, se trató el sobrenadante con anticuerpos biotinilados para GM-CSF e IL-4 (R&D Systems, Inc.), luego se incubaron con perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina (Dynal). La concentración final de IL-13 se determinó por ELISA (Biosource), y para un total de proteínas por ensayo Bradford (Bio-Rad). La preparación típica contiene < 0.0005% IL-13 en peso.

Selección de clones de hibridoma

Usando los métodos establecidos, se generaron los hibridomas a partir de bazos de ratones seleccionados como se indicó anteriormente, fusionados a la línea celular de mieloma P3X63_AG8.653. Se colocaron las células en placas a dilución limitada, y se seleccionaron los clones de acuerdo con los criterios de selección descritos con anterioridad. Se recolectaron los datos para la selección de clones en base a la capacidad de completar la unión de NHP-IL-13 a sIL-13R α 1-Fc por ELISA. Se evaluaron los clones en forma adicional para determinar su capacidad de neutralizar la bioactividad de NHP-IL-13. Los sobrenadantes de los hibridomas se probaron para determinar la competición de fosforilación de STAT-6

inducida por NHP-IL-13 en la línea celular epitelial humana HT-29.

Ejemplo 2: Anticuerpo MJ 2-7

5 Se preparó ARN total a partir de células de hibridoma MJ
2-7 usando el Mini Kit QIAGEN RNEASY™ (Qiagen). Se
transcribió el ARN en forma inversa a ADNc usando el SMART™
PCR Synthesis Kit (BD Biosciences Clontech). La región
variable de cadena pesada de MJ 2-7 se extrapoló por PCR
10 usando oligonucleótido SMART™ como cebador sentido y templado
del cebador mIgG1 al ADN que codifica la parte N-terminal del
dominio CH1 de la región constante de IgG1 de ratón como
cebador inverso. El fragmento de ADN que codifica la región
variable de cadena ligera MJ 2-7 se generó usando SMART™ y
15 cebadores específicos kappa de ratón. La reacción por PCR se
realizó usando polimerasa DEEP VENT™ DNA (New England
Biolabs) y dNTPs 25 nM durante 24 ciclos (94°C durante 1
minuto, 60°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto). Los
productos de PCR se subclonaron en el vector pED6, y la
20 secuencia de los insertos se identificó por secuenciación de
ADN. La secuenciación de la proteína N-terminal del
anticuerpo MJ 2-7 de ratón se utilizó para confirmar que las
secuencias traducidas correspondían a la secuencia de la
proteína observada.

25 La secuencia de nucleótidos y aminoácidos de anticuerpo

monoclonal de ratón MJ 2-7 que interactúa con NHP IL-13 y que tiene características que sugieren que puede interactuar con IL-13 humana son de la siguiente manera:

Una secuencia nucleotídica ejemplificativa que codifica el dominio variable de cadena pesada incluye:

GAG GTTCAGCTGC AGCAGTCTGG GGCAGAGCTT GTGAAGCCAG
GGGCCTCAGT CAAGTTGTCC TGCACAGGTT CTGGCTTCAA CATTAAAGAC
ACCTATATAC ACTGGGTGAA GCAGAGGCCT GAACAGGGCC TGGAGTGGAT
TGGAAGGATT GATCCTGCGA ATGATAATAT TAAATATGAC CCGAAGTTCC
10 AGGGCAAGGC CACTATAACA GCAGACACAT CCTCCAACAC AGCCTACCTA
CAGCTCAACA GCCTGACATC TGAGGACACT GCCGTCTATT ACTGTGCTAG
ATCTGAGGAA AATTGGTACG ACTTTTTTGA CTAAGGCGGC CAAGGCACCA
CTCTCACAGT CTCCTCA (SEC ID NO: 129).

Un ejemplos de una secuencia de aminoácidos para el dominio variable de cadena pesada incluye:

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLEWIGRIDP
ANDNIKYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLNSLTSEDTAVYYCARSEENWYD
FFDYWGQGTTTLTVSS (SEC ID NO: 130).

20 Los CDR están subrayados. El dominio variable está precedido en forma opcional por una secuencia líder, por ejemplo, MKCSWVIFFLMAVVTGVNS (SEC ID NO. 131). Una secuencia de nucleótidos ejemplificativa que codifica el dominio variable de cadena ligera incluye:

25 GAT GTTTTGATGA CCCAAACTCC ACTCTCCCTG CCTGTCAGTC

TTGGAGATCA AGCCTCCATC TCTTGCAGGT CTAGTCACAG CATTGTACAT
 AGTAATGGAA ACACCTATTT AGAATGGTAC CTGCAGAAAC CAGGCCAGTC
 TCCAAAGCTC CTGATCTACA AAGTTTCCAA CCGATTTTCT GGGGTCCCAG
 ACAGGTTTCAG TGGCAGTGGA TCAGGGACAG ATTTCACT CAAGATTAGC
 5 AGAGTGGAGG CTGAGGATCT GGGAGTTTAT TACTGCTTTC AAGGTTTACA
 TATTCCGTAC ACGTTCGGAG GGGGGACCAA GCTGGAAATA AAA (SEC ID NO:
 132).

Una secuencia de aminoácidos ejemplificativa para el dominio variable de cadena ligera incluye:

10 DVLMTQTPLSLPVSLGDAQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQ
 SPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDLGVIYCFQGSHPY
 TFGGGTKLEIK (SEC ID NO: 133).

Los CDR están subrayados. La secuencia de aminoácidos está precedida en forma opcional por una secuencia líder, por ejemplo, MKLPVRLLVLMFWIPASSS. El término "MJ 2-7" se usa en forma indistinta con el término "mAb7.1.1" en la presente.

Ejemplo 3: Anticuerpo C65

Las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos
 20 ejemplificativas de anticuerpo monoclonal de ratón C65, que interactúa con NHP IL-13 y que tiene características que sugieren que puede interactuar con IL-13 humana son de la siguiente manera:

Una secuencia de ácido nucleico ejemplificativa para el
 25 dominio variable de cadena pesada incluye:

1 ATGGCTGTCC TGGCATTACT CTTCTGCCTG GTAACATTCC CAAGCTGTAT
51 CCTTTCCCAG GTGCAGCTGA AGGAGTCAGG ACCTGGCCTG GTGGCGCCCT
101 CACAGAGCCT GTCCATCACA"TGACCCGTCT CAGGGTTCTC ATTAACCGGC
151 TATGGTGTAA ACTGGGTTTCG CCAGCCTCCA GGAAAGGGTC TGGAGTGGCT
5 201 GGGAATAATT TGGGGTGATG GAAGCACAGA CTATAATTCA GCTCTCAAAT
251 CCAGACTGAT CATCAACAAG GACAACTCCA AGAGCCAAGT TTTCTTAAAA
301 ATGAACAGTC TGCAAACCTGA TGACACAGCC AGGTACTTCT GTGCCAGAGA
351 TAAGACTTTT TACTACGATG GTTTCTACAG GGCAGGATG GACTACTGGG
401 GTCAAGGAAC CTCAGTCACC GTCTCCTCA (SEC ID NO: 135).

10 Una secuencia de aminoácidos ejemplificativa para el dominio variable de cadena pesada incluye:

QVQLKESGPGL VAPSQSL SIT CTVSGFSLTG YGVNWVRQPP GKGLEWLGII
WGDGSTDYNS ALKSRLIINK DNSKSQVFLK MNSLQTDDTA RYFCARDKTF
YYDGFYRGRM DYWGQGTSVT VSS (SEC ID NO: 136).

15 Los CDR están subrayados. La secuencia de aminoácidos está precedida en forma opcional por una secuencia líder, por ejemplo, MAVLALLFCL VTFPSCILS (SEC ID NO: 137).

Una secuencia de nucleótidos ejemplificativa que codifica el dominio variable de cadena ligera incluye:

20 1 ATGAACACGA GGGCCCCTGC TGAGTTCCTT GGGTTCCTGT TGCTCTGGTT
51 TTTAGGTGCC AGATGTGATG TCCAGATGAT TCAGTCTCCA TCCTCCCTGT
101 CTGCATCTTT GGGAGACATT GTCACCATGA CTTGCCAGGC AAGTCAGGGC
151 ACTAGCATT AATTAACTG GTTTCAGCAA AAACCAGGGA AAGCTCCTAA
201 GCTCCTGATC TTTGGTGCAA GCAACTTGGA AGATGGGGTC CCATCAAGGT
25 251 TCAGTGGCAG TAGATATGGG ACAAATTTC A CTCTCACCAT CAGCAGCCTG

301 GAGGATGAAG ATATGGCAAC TTATTTCTGT CTACAGCATA GTTATCTCCC
351 GTGGACGTTC GGTGGCGGCA CCAAACCTGGA AATCAAA (SEC ID NO.
138).

Una secuencia de aminoácidos ejemplificativa para el
5 dominio variable de cadena ligera incluye:

DVQMIQSP SSSLASLGDI VTMTQASOG TSINLNWFQQ KPGKAPKLLI
FGASNLEDGV PSRFSGSRYG TNFTLTISL EDEDMATYFC LOHSYLPWTF
GGGTKLEIK (SEC ID NO: 139).

Los CDR están subrayados. La secuencia de aminoácidos
10 está precedida en forma opcional por una secuencia líder, por
ejemplo, MNTRAPAEFLGFLLLWFLGARC (SEC ID NO: 140).

Ejemplo 4: Modelo de Mono Cinomolgo

La eficacia de un anticuerpo para neutralizar una o más
15 actividades asociadas con IL-13 *in vivo* puede evaluarse
usando un modelo de inflamación de las vías respiratorias
inducida por antígeno en monos cinomolgos naturalmente
alérgicos a *Ascaris suum*. En este modelo, la estimulación de
un mono alérgico con antígeno *Ascaris suum* produce un influjo
20 de células inflamatorias, especialmente eosinófilos, en las
vías respiratorias. Para evaluar la capacidad de un
anticuerpo para prevenir este influjo de células, el
anticuerpo puede administrarse 24 h antes de provocar con
antígeno con *Ascaris suum*. El día de la estimulación, puede
25 tomarse una muestra de lavaje broncoalveolar basal (BAL) del

162

pulmón izquierdo. Luego puede instilarse el antígeno por vía intratraqueal en el pulmón derecho. Veinticuatro horas más tarde, se realiza el lavaje del pulmón derecho, y el líquido BAL de los animales tratados por vía endovenosa con 10 mg/kg de anticuerpo recombinante expresado de células CHO se comparan con líquido de BAL de animales no tratados. Si el anticuerpo reduce la inflamación de las vías respiratorias, un aumento en el porcentaje de los eosinófilos de BAL puede observarse entre el grupo no tratado, aunque no para el grupo tratado con el anticuerpo. Estos resultados pueden usarse para confirmar que el anticuerpo evita en forma eficiente la eosinofilia de las vías aéreas en animales alérgicos estimulados con un alergen.

15 Ejemplo 5: Secuencias de Fc

El Ser en la posición #1 de la SEC ID NO: 128 representa el residuo de aminoácido #119 en un primer esquema de numeración de anticuerpo de longitud completa ejemplificativo, en el cual el Ser está precedido por el residuo #118 de un dominio variable de cadena pesada. En el primer esquema de numeración de anticuerpos de longitud completa ejemplificativo, los aminoácidos mutados se numeran 234 y 237, y corresponden a las posiciones 116 y 119 de la SEC ID NO: 128. De este modo, la siguiente secuencia representa un dominio de Fc con dos mutaciones: L234A y G237A

de acuerdo con el primer esquema de numeración de anticuerpo de longitud completa ejemplificativo.

STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
5 PPCPAPEALGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK (SAC ID NO: 128).

10 Lo siguiente es otro dominio humano ejemplificativo de la secuencia de Fc:

STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
15 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK (SEC ID NO: 141)

Ejemplos de otras alteraciones que pueden usarse para
20 disminuir la función efectora incluyen L234A; L235A), (L235A;
G237A) y N297A.

Ejemplo 6: IL-13 e IgE en ratones

La IL-13 es importante en la producción de IgE, un
25 mediador importante de la enfermedad atópica. Los ratones con

deficiencia en IL-13 tenían reducciones parciales en la IgE sérica y respuestas de IgE de células cebada, mientras que los ratones que carecían del antagonista natural de IL-13, IL-13R α 2-/-, tenían niveles aumentados de función efectora de IgE e IgE.

Se obtuvieron ratones hembra BALB/c de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Los ratones IL-13R α 2-/- se describen, por ejemplo, en Wood et al. (2003) *J. Exp. Med.* 197:703-9). Los ratones con deficiencia en IL-13 se describen, por ejemplo, en McKenzie et al. (1998) *Immunity* 9:423-32). Todas las cepas mutantes se encontraban en el fondo de BALB/c.

Se midieron los niveles séricos de IgE por ELISA. Las placas de ELISA (MaxiSorp; Nunc, Rochester, NY) se recubrieron durante toda la noche a 4°C con IgE anti-ratón de rata (BD Biosciences, San Diego, CA). Se bloquearon las placas durante 1 hora a temperatura ambiente con 0.5% gelatina en PBS, lavado en PBS que contiene 0.05% TWEEN®-20 (PBS-Tween), y se incubaron durante seis horas a temperatura ambiente con IgE purificado de ratón (BD Biosciences) de acuerdo con los estándares o con diluciones séricas. La unión se detectó con IgE anti-ratón biotinilada (BD Biosciences) usando IgG de ratón (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) como bloqueador. La unión se detectó con estreptavidina ligada a peroxidasa (Southern Biotechnology Associates, Inc.,

Birmingham, AL) y el sustrato SURE BLUE™ (KPL Inc., Gaithersburg, MD).

Para investigar el requerimiento de IL-13 de soportar los niveles de IgE en reposo en ratones no expuestos a tratamiento, se examinó el suero en ausencia de inmunización específica de ratones de tipo salvaje y de ratones genéticamente deficientes en IL-13 y IL-13R α 2. Los ratones deficientes en IL-13 tenían virtualmente niveles no detectables de IgE sérica. Por el contrario, los ratones que carecían de receptor inhibidor IL-13R α 2 mostraron niveles elevados de IgE sérica. Estos resultados demuestran que el bloqueo de IL-13 puede ser útil para tratar o prevenir los trastornos atópicos.

15 Ejemplo 7: IL-13 y trastornos atópicos

La capacidad de MJ2-7 para inhibir la bioactividad de IL-13 humana nativa (a 1 ng/mL) se evaluó en una prueba para determinar la fosforilación de STAT6. El MJ2-7 inhibió la actividad de la IL-13 humana nativa con un IC₅₀ de aproximadamente 0.293 nM en esta prueba. Un anticuerpo con la cadena pesada de murino de MJ2-7 y una cadena liviana humanizada inhibió la actividad de la IL-13 humana nativa con un IC₅₀ de aproximadamente 0.554 nM en esta prueba.

La capacidad de MJ2-7 para inhibir IL-13 de primate no humano (a 1 ng/ml) se evaluó en una prueba para la expresión

de CD23. El MJ2-7 inhibió la actividad de IL-13 de primate no humano con un IC_{50} de aproximadamente 0.242 nM en esta prueba. Un anticuerpo con la cadena pesada de murino de MJ2-7 y una cadena ligera humanizada inhibió la actividad de IL-13 de primate no humano con un IC_{50} de aproximadamente 0.308 nM en esta prueba.

Ejemplo 8: Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de anticuerpo MJ 2-7 de ratón

La secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena pesada (con un líder opcional) es de la siguiente manera:

1 ATGAAATGCA GCTGGGTTAT CTTCTTCCTG ATGGCAGTGG TTACAGGGGT
 51 CAATTCAGAG GTTCAGCTGC AGCAGTCTGG GGCAGAGCTT GTGAAGCCAG
 15 101 GGGCCTCAGT CAAGTTGTCC TGCACAGGTT CTGGCTTCAA CATTAAAGAC
 151 ACCTATATAC ACTGGGTGAA GCAGAGGCCT GAACAGGGCC TGGAGTGGAT
 201 TGGAAGGATT GATCCTGCGA ATGATAATAT TAAATATGAC CCGAAGTTCC
 251 AGGGCAAGGC CACTATAACA GCAGACACAT CCTCCAACAC AGCCTACCTA
 301 CAGCTCAACA GCCTGACATC TGAGGACACT GCCGTCTATT ACTGTGCTAG
 20 351 ATCTGAGGAA AATTGGTACG ACTTTTTTGA CTACTGGGGC CAAGGCACCA
 401 CTCTCACAGT CTCCTCA (SEC ID NO: 142).

La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada con un líder opcional (sin puntaje) es de la siguiente manera:

25 1 MKCSWVIFFL MAVVTGVNSE VQLQQSGAEL VKPGASVKLS CTGSGFNIKD

51 TYIHWVKQRP EQGLEWIGRI DPANDNIKYD PKFQ GKATIT ADTSSNTAYL
101 QLNSLTSEDV AVYYCARVER NWYDFFDYWG QGTTLTVSS
(SEC ID NO. 143)

La secuencia de nucleótidos que codifica la región
5 variable de cadena ligera es de la siguiente manera:

1 ATGAAGTTGC CTGTTAGGCT GTTGGTGCTG ATGTTCTGGA TTCCTGCTTC
51 CAGCAGTGAT GTTTTGATGA CCCAAACTCC ACTCTCCCTG CCTGTCAGTC
101 TTGGAGATCA AGCCTCCATC TCTTGCAGGT CTAGTCAGAG CATTGTACAT
151 AGTAATGGAA ACACCTATTT AGAATGGTAC CTGCAGAAAC CAGGCCAGTC
10 201 TCCAAAGCTC CTGATCTACA AAGTTTCCAA CCGATTTTCT GGGGTCCCAG
251 ACAGGTTTCTG TGGCAGTGGA TCAGGGACAG ATTTACACT CAAGATTAGC
301 AGAGTGGAGG CTGAGGATCT GGGAGTTTAT TACTGCTTTC AAGGTTTACA
351 TATTCCTGAC ACGTTCGGAG GGGGGACCAA GCTGGAAATA AAA SEC ID
NO: 144).

15 La secuencia de aminoácidos de la región variable de
cadena ligera con un líder opcional (sin puntaje) es de la
siguiente manera:

1 MKLPYRLLYLMFWIPASSSD VLMTQTPLSL PVSLGDQASI SCRSSQSIVH
51 SNGNTYLEWY LQKPGQSPKL LIYKVSNRFS GVPDRFSGSG SGTDFTLKIS
20 101 RVEAEDLGVI YCFQGSHIPY TFGGGTKLEI K (SEC ID NO: 145).

Ejemplo 9: Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de
primeras variantes humanizadas ejemplificativas de anticuerpo
MJ 2-7

25 La Versión 1 (V1) se basa en los clones de la línea

germinal más cercanos. La secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada hMJ 2-7 V1 (hMJ 2-7 VH V1) (con una secuencia que codifica una secuencia líder opcional) es de la siguiente manera:

5

1 ATGGATTGGA CCTGGCGCAT CCTGTTCTTG GTGGCCGCTG CCACCGGCGC
 51 TCACTCTCAG GTGCAGCTGG TGCAGTCTGG CGCCGAGGTG AAGAAGCCTG
 101 GCGCTTCCGT GAAGGTGTCC TGTAAGGCCT CCGGCTTCAA CATCAAGGAC
 151 ACCTACATCC ACTGGGTGCG GCAGGCTCCC GGCCAGCGGC TGGAGTGGAT
 10 201 GGGCCGGATC GATCCTGCCA ACGACAACAT CAAGTACGAC CCCAAGTTTC
 251 AGGGCCGCGT GACCATCACC CGCGATACCT CCGCTTCTAC CGCCTACATG
 301 GAGCTGTCTA GCCTGCGGAG CGAGGATACC GCCGTGTACT ACTGCGCCCCG
 351 CTCCGAGGAG AACTGGTACG ACTTCTTCGA CTACTGGGGC CAGGGCACCC
 401 TGGTGACCGT GTCCTCT

15

La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (hMJ 2-7 V1) se basa en un CDR injertado a DP-25, VH-I, 1-03. La secuencia de aminoácidos con un líder opcional (primera región sin puntaje; CDR basadas en la definición de AbM que se muestra en las regiones posteriores sin puntaje) es de la siguiente manera:

20

1 MDWTWRILFL VAAA TGAHS - Q VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGFNIKD
 51 TYIHWVRQAP GQRLEWMGRI DPANDNIKYD PKFQGRVTIT RDTSASTAYM
 101 ELSSLRSEDV AVYYCARSEE NWYDFFDYWG QGTLVTVSSG ESCR (SEC ID NO: 147)

25

La secuencia de nucleótidos de la región variable de

cadena ligera de hMJ 2-7 V1 (hMJ 2-7 VL V1) (con una secuencia que codifica una secuencia líder opcional) es de la siguiente manera:

```

1   ATGCGGCTGC CCGCTCAGCT GCTGGGCCTG CTGATGCTGT GGGTGCCCGG
5  51  CTCTTCCGGC GACGTGGTGA TGACCCAGTC CCCTCTGTCT CTGCCCCGTGA
    101 CCCTGGGCCA GCCCGCTTCT ATCTCTTGCC GGTCTCCCA GTCCATCGTG
    151 CACTCCAACG GCAACACCTA CCTGGAGTGG TTTCAGCAGA GACCCGGCCA
    201 GTCTCCTCGG CGGCTGATCT ACAAGGTGTC CAACCGCTTT TCCGGCGTGC
    251 CCGATCGGTT CTCCGGCAGC GGCTCCGGCA CCGATTTCAC CCTGAAGATC
10 301 AGCCGCGTGG AGGCCGAGGA TGTGGGCGTG TACTACTGCT TCCAGGGCTC
    351 CCACATCCCT TACACCTTTG GCGGCGGAAC CAAGGTGGAG ATCAAG
    (SEC ID NO: 148).
  
```

Esta versión se basa en un injerto de CDR a DPK18, V kappaII. La secuencia de aminoácidos de región variable de
 15 cadena ligera hMJ 2-7 V1 (hMJ 2-7 VL V1) (con líder opcional primera región sin puntaje; CDR basadas en la definición de AbM en regiones posteriores sin puntaje) es de la siguiente manera:

```

1   MRLPAOLLGL LMLWVPGSSG -DVVMTQSPLSLPVTLGQPAS ISCRSSOSIV
20 51  HSNGNTYLEW FQQRPGQSPR RLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI
    101 SRVEAEDVGV YYCFOGSHIP YTFGGGTKVE IK (SEC ID NO: 149).
  
```

Ejemplo 10: Secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de las segundas variantes inmunizadas del anticuerpo MJ 2-7

25 La siguiente región variable de cadena pesada se basa en

un injerto CDR a DP-54, VH-3, 3-07. La secuencia nucleotídica de la región variable de la cadena pesada de hMJ 2-7 versión 2 (V2) (hMJ 2-7 VH V2) (con una secuencia que codifica una secuencia líder opcional) es como sigue:

5

1 ATGGAGCTGG GCCTGTCITG GGTGTICCTG GTGGCTATCC TGGAGGGCGT
 51 GCAGTGCGAG GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG CGGCGGACTG GTGCAGCCTG
 101 GCGGCTCTCT GCGGCTGTCT TGCGCCGCIT CCGGCTTCAA CATCAAGGAC
 151 ACCTACATCC ACTGGGTGCG GCAGGCTCCC GGCAAGGGCC TGGAGTGGGT
 10 201 GGCCCGGATC GATCCTGCCA ACGACAACAT CAAGTACGAC CCCAAGTTCC
 251 AGGGCCGGTT CACCATCTCT CGCGACAACG CCAAGAACTC CCTGTACCTC
 301 CAGATGAACT CTCTGCGCGC CGAGGATACC GCCGTGTACT ACTGCGCCCG
 351 GAGCGAGGAG AACTGGTACG ACITCTTCGA CTACTGGGGC CAGGGCACCC
 401 TGGTGACCGT GTCCTCT (SEC ID NO: 150)

15 La secuencia de aminoácido de la región variable de cadena pesada de hMJ 2-7 V2 (hMJ 2-7 VH V2) con un líder opcional (primera región sin puntaje; CDRs basada en la definición de AbM mostrada en las regiones sin puntaje subsecuentes) es como sigue:

20

1 MELGLSWVFL VAILEGVOC- E VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFNIKD
 51 TYIHWVRQAP GKGLEWV ARI DPANDNIKYD PKFOGRFTIS RDNAKNSL YL
 101 QMNSLRAEDT AVYYCARSEE NWYDFFDY WGQGTTLVTVSS (SEC ID
 NO:151)

25 La región variable de cadena ligera hMJ 2-7 V2 se basó

en un injerto CDR a DPK9, V kappaI, 02. La secuencia nucleotídica de la región variable de cadena ligera hMJ 2-7 V2 (hMJ 2-7 VL V2) (con una secuencia que codifica una secuencia líder opcional) es como sigue:

5

1 ATGGATATGC GCGTGCCCGC TCAGCTGCTG GGCCTGCTGC TGCTGTGGCT
51 GCGCGGAGCC CGCTGCGATA TCCAGATGAC CCAGTCCCCT TCITCTCTGT
101 CCGCCTCTGT GGGCGATCGC GTGACCATCA CCTGTCTGGTC CTCCCAGTCC
151 ATCGTGCACT CCAACGGCAA CACCTACCTG GAGTGGTATC AGCAGAAGCC
10 201 CGGCAAGGCC CCTAAGCTGC TGATCTACAA GGTGTCCAAC CGC1TITCCG
251 GCGTGCCTTC TCGGTTCTCC GGCTCCGGCT CCGGCACCGA TITCACCCTG
301 ACCATCTCCT CCCTCCAGCC CGAGGATITC GCCACCTACT ACTGCITCCA
351 GGGCTCCAC ATCCCITACA CCTTTGGCGG CGGAACCAAG GTGGAGATCA
401 AGCGT (SEC ID NO: 152)

15

La secuencia de aminoácido de la región variable de cadena ligera de hMJ 2-7 V2 (hMJ 2-7 VH V2) (con un puntaje de péptido líder opcional y CDRs basada en la definición de AbM mostrada en las regiones sin puntaje subsecuentes) es como sigue:

20

1 MDMRVPAQLL GLLLLWLRGA RC -DIQMTQSP SSLSASVGDR VTITCRSSQS
51 IVHSNGNTYL EWYQQKPGKA PKLLIYKVS N RFSGVPSRFS GSGSGTDFTL
101 TISSLQPEDF ATYYCFQGS H IPYTFGGGTK VEIKR (SEC ID NO: 153)

Se hicieron las versiones humanizadas de la región variable de cadena pesada MJ 2-7 V2. Estas versiones
25 incluyeron retromutaciones que tienen aminoácidos murino en

las posiciones del marco seleccionadas.

La secuencia nucleotídica que codifica la región variable de cadena pesada "Versión 2.1" ó V2.1 con las retromutaciones V48I,A29G es como sigue:

5

```

1   GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGCGGCGGA CTGGTGCAGC CTGGCGGCTC
51  TCTGCGGCTG TCITGCGCCG CITCCGGCTT CAACATCAAG GACACCTACA
101 TCCACTGGGT GCGGCAGGCT CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GATCGGCCGG
151 ATCGATCCTG CCAACGACAA CATCAAGTAC GACCCCAAGT TCCAGGGCCG
10 201 GTTCAACATC TCTCGCGACA ACGCCAAGAA CTCCCTGTAC CTCCAGATGA
251 ACTCTCTGCG CGCCGAGGAT ACCGCCGTGT ACTACTGCGC CCGGAGCGAG
301 GAGAACTGGT ACGACTTCTT CGACTACTGG GGCCAGGGCA CCCTGGTGAC
351 CGTGTCTCTT (SEC ID NO:154)

```

La secuencia de aminoácido de la región variable de
 15 cadena pesada de V2.1 (CDRs basados en la definición de AbM
 mostrados en las regiones sin puntaje subsecuentes) es como
 sigue:

```

1   EVQLVESGGG L VQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWIGR
51  IDPANDNIKY DPKFOGRFTI SRDNAKNSL Y LQMNSLRAED T A VYYCARSE
20 101 ENWYDFFDYW GQGLVTVSS (SEC ID NO: 155)

```

La secuencia nucleotídica que codifica la región variable de cadena pesada de V2.2 con las retromutaciones (R67K;F68A) es como sigue:

```

1   GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGCGGCGGA CTGGTGCAGC CTGGCGGCTC
25 51  TCTGCGGCTG TCTTGCGCCG CTTCCGGCTT CAACATCAAG GACACCTACA

```

101 TCCACTGGGT GCGGCAGGCT CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GGTGGCCCGG
 151 ATCGATCCTG CCAACGACAA CATCAAGTAC GACCCCAAGT TCCAGGGCAA
 201 GGCCACCATC TCTCGCGACA ACGCCAAGAA CTCCCTGTAC CTCCAGATGA
 251 ACTCTCTGCG CGCCGAGGAT ACCGCCGTGT ACTACTGCGC CCGGAGCGAG
 5 301 GAGAACTGGT ACGACTTCTT CGACTACTGG GGCCAGGGCA CCCTGGTGAC
 351 CGTGTCTCTT (SEC ID NO: 156).

La secuencia de aminoácido de la región variable de
 cadena pesada de V2.2 (CDRs basados en la definición de AbM
 mostrados en regiones sin puntaje subsecuentes) es como
 10 sigue:

1 EVQL VESGGG L VQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR
 51 IDPANDNIKY DPKFOGKA TI SRDNAKNSL Y LQMNSLRAED T A VYYCARSE
 102 ENWYDFFDYW_GQGTL VTVSS (SEC ID NO: 157)

La secuencia nucleotídica que codifica la región
 15 variable de cadena pesada V2.3 con las retromutaciones
 (R72A):

1 GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGCGGCGGA CTGGTGCAGC CTGGCGGCTC
 51 TCTGCGGCTG TCTTGCGCCG CTTCCGGCTT CAACATCAAG GACACCTACA
 101 TCCACTGGGT GCGGCAGGCT CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GGTGGCCCGG
 20 151 ATCGATCCTG CCAACGACAA CATCAAGTAC GACCCCAAGT TCCAGGGCCG
 201 GTTACCATC TCTGCCGACA ACGCCAAGAA CTCCCTGTAC CTCCAGATGA
 251 ACTCTCTGCG CGCCGAGGAT ACCGCCGTGT ACTACTGCGC CCGGAGCGAG
 301 GAGAACTGGT ACGACTTCTT CGACTACTGG GGCCAGGGCA CCCTGGTGAC
 351 CGTGTCTCTT (SEC ID NO: 158).

25 La secuencia de aminoácido de la región variable de

cadena pesada de V2.3 (CDRs basados en la definición de AbM mostradas en las regiones sin puntaje subsecuentes) es como sigue:

1 EVQL VESGGG L VQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWV AR
5 51 IDPANDNIKY DPKFOGRFTI SADNAKNSL Y LQMNSLRAED TAVYYCARSE
103 ENWYDFFDYW GQGT~~L~~VTVSS (SEC ID NO: 159).

La secuencia nucleotídica que codifica la región variable de cadena pesada V2.4 con las retromutaciones (A49G) es como sigue:

10 1 GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGCGGCGGA CTGGTGCAGC CTGGCGGCTC
51 TCTGCGGCTG TCTTGCGCCG CTTCCGGCTT CAACATCAAG GACACCTACA
101 TCCACTGGGT GCGGCAGGCT CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GGTGGGCGCG
151 ATCGATCCTG CCAACGACAA CATCAAGTAC GACCCCAAGT TCCAGGGCCG
201 GTTCAACATC TCTCGCGACA ACGCCAAGAA CTCCCTGTAC CTCCAGATGA
15 251 ACTCTCTGCG CGCCGAGGAT ACCGCCGTGT ACTACTGCGC CCGGAGCGAG
301 GAGAACTGGT ACGACTTCTT CGACTACTGG GGCCAGGGCA CCCTGGTGAC
351 CGTGTCTCT (SEC ID NO: 160).

La secuencia de aminoácido de la región variable de cadena pesada de V2.4 (CDRs basados en la definición de AbM mostradas en las regiones sin puntaje subsecuentes) es como sigue:

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVGR
51 IDPANDNIKY DPKFOGRFTI SRDNAKNSL Y LQMNSLRAED TA VYYCARSE
104 ENWYDFFDYW GQGT~~L~~VTVSS (SEC ID NO: 161).

25 La secuencia nucleotídica que codifica la región

variable de cadena pesada V2.5 con las retromutaciones (R67K;F68A;R72A) es como sigue:

```

1   GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGCGGCGGA CTGGTGCAGC CTGGCGGCTC
51  TCTGCGGCTG TCITGCGCCG CITCCGGCTT CAACATCAAG GACACCTACA
5   101 TCCACTGGGT GCGGCAGGCT CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GGTGGCCCGG
151 ATCGATCCTG CCAACGACAA CATCAAGTAC GACCCCAAGT TCCAGGGCAA
201 GGCCACCATC TCTGCCGACA ACGCCAAGAA CTCCCTGTAC CTCCAGATGA
251 ACTCTCTGCG CGCCGAGGAT ACCGCCGTGT ACTACTGCGC CCGGAGCGAG
301 GAGAACTGGT ACGACTTCTT CGACTACTGG GGCCAGGGCA CCCTGGTGAC
10  352 CGTGTCTCT (SEC ID NO: 162).

```

La secuencia de aminoácido de la región variable de cadena pesada de V2.5 (CDRs basados en la definición de AbM mostradas en las regiones sin puntaje subsecuentes) es como sigue:

```

15  1 EVQL VESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIKDTYIHWRQA PGKGLEWV AR
51  IDPANDNIKY DPKFQGKATI SADNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARSE
105 ENWYDFFDYW GQGTI VTVSS (SEC ID NO: 163)

```

La secuencia nucleotídica que codifica la región variable de cadena pesada V2.6 con las retromutaciones (V 48I;A49G;R72A) es como sigue:

```

1   GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGCGGCGGA CTGGTGCAGC CTGGCGGCTC
51  TCTGCGGCTG TCTTGCGCCG CTTCCGGCTT CAACATCAAG GACACCTACA
101 TCCACTGGGT GCGGCAGGCT CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GATCGGCCGG
151 ATCGATCCTG CCAACGACAA CATCAAGTAC GACCCCAAGT TCCAGGGCCG
25  201 GTTCACCATC TCTGCCGACA ACGCCAAGAA CTCCCTGTAC CTCCAGATGA

```

251 ACTCTCTGCG CGCCGAGGAT ACCGCCGTGT ACTACTGCGC CCGGAGCGAG
301 GAGAACTGGT ACGACTTCTT CGACTACTGG GGCCAGGGCA CCCTGGTGAC
351 CGTGTCTCT (SEC ID NO: 164).

La secuencia de aminoácido de la región variable de
5 cadena pesada de V2.6 (CDRs basados en la definición de AbM
mostrados en las regiones sin puntaje subsecuentes) es como
sigue:

1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWIGR
51 IDPANDNIKY DPKFOGRFTI SADNAKNSL Y LQMNSLRAED TAVYYCARSE
10 106 ENWYDFFDYW GQGLVTVSS (SEC ID NO: 165)

La secuencia nucleotídica que codifica la región
variable de cadena pesada V2.7 con las retromutaciones
(A49G;R72A) es como sigue:

1 GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGCGGCGGA CTGGTGCAGC CTGGCGGCTC
15 51 TCTGCGGCTG TCITGCGCCG CTTCCGGCTT CAACATCAAG GACACCTACA
101 TCCACTGGGT GCGGCAGGCT CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GGTGGGCCGG
151 ATCGATCCTG CCAACGACAA CATCAAGTAC GACCCCAAGT TCCAGGGCCC
201 GTTCACCATC TCTGCCGACA ACGCCAAGAA CTCCCTGTAC CTCCAGATGA
251 ACTCTCTGCG CGCCGAGGAT ACCGCCGTGT ACTACTGCGC CCGGAGCGAG
20 301 GAGAACTGGT ACGACTTCTT CGACTACTGG GGCCAGGGCA CCCTGGTGAC
351 CGTGTCTCT (SEC ID NO: 166).

La secuencia de aminoácido de la región variable de
cadena pesada de V2.7 (CDRs basados en la definición de AbM
mostradas en regiones sin puntaje subsecuentes) es como
25 sigue:

1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVGR
 51 IDPANDNIKY DPKFQGRFTI SADNAKNSL Y LQMNSLRAED TAVYYCARSE
 107 ENWYDFFDYW GQGTTLVTVSS (SEC ID NO: 167).

LA secuencia nucleotídica que codifica la región
 5 variable de la cadena pesada V2.8 con las retromutaciones
 (L79A) es como sigue:

1 GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGCGGCGGA CTGGTGCAGC CTGGCGGCTC
 51 TCTGCGGCTG TCTTGCGCCG CTTCCGGCTT CAACATCAAG GACACCTACA
 101 TCCACTGGGT GCGGCAGGCT CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GGTGGCCCCG
 10 151 ATCGATCCTG CCAACGACAA CATCAAGTAC GACCCCAAGT TCCAGGGCCG
 201 GTICACCATC TCTCGCGACA ACGCCAAGAA CTCCGCCTAC CTCCAGATGA
 251 ACTCTCTGCG CGCCGAGGAT ACCGCCGTGT ACTACTGCGC CCGGAGCGAG
 301 GAGAACTGGT ACGACTTCIT CGACTACTGG GGCCAGGGCA CCCTGGTGAC
 351 CGTGTCTCT (SEC ID NO: 168).

15 La secuencia de aminoácido de la región variable de
 cadena pesada de V2.8 (CDRs basados en la definición de AbM
 mostradas en las regiones sin puntaje subsecuentes) es como
 sigue:

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR
 20 51 IDPANDNIKY DPKFQGRFTI SRDNAKNSA Y LQMNSLRAED TAVYYCARSE.
 108 ENWYDFFDYW GQGTTLVTVSS (SEC ID NO: 169).

La secuencia nucleotídica que codifica la región
 variable de cadena pesada V2.10 con las retromutaciones
 (A49G;R72A;L79A) es como sigue:

25 1 GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGCGGCGGA CTGGTGCAGC CTGGCGGCTC

51 TCTGCGGCTG TCTTGCGCCG CTTCCGGCTT CAACATCAAG GACACCTACA
101 TCCACTGGGT GCGGCAGGCT CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GGTGGGCCGG
151 ATCGATCCTG CCAACGACAA CATCAAGTAC GACCCCAAGT TCCAGGGCCG
201 GTTCACCATC TCTGCCGACA ACGCCAAGAA CTCCGCCTAC CTCCAGATGA
5 251 ACTCTCTGCG CGCCGAGGAT ACCGCCGTGT ACTACTGCGC CCGGAGCGAG
301 GAGAACTGGT ACGACTTCTT CGACTACTGG GGCCAGGGCA CCCTGGTGAC
351 CGTGTCTCT (SEC ID NO: 170)

La secuencia de aminoácido de la región variable de
cadena pesada de V2.10 (CDRs basados en la definición de AbM
10 mostradas en las regiones sin puntaje subsecuentes) es como
sigue:

1 EVQL VESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVGR
51 IDPANDNIKY DPKFQGRFTI SADNAKNSA Y LQMNSLRAED TAVYYCARSE
109 ENWYDFFDYW GQGLVTVSS (SEC ID NO: 171).

15 La secuencia nucleotídica que codifica la región
variable de cadena pesada V2.11 con las retromutaciones
(V48I;A49G;R72A;L79A) es como sigue:

1 GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGCGGCGGA CTGGTGCAGC CTGGCGGCTC
51 TCTGCGGCTG TCITGCGCCG CTTCCGGCTT CAACATCAAG GACACCTACA
20 101 TCCACTGGGT GCGGCAGGCT CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GATCGGCCGG
151 ATCGATCCTG CCAACGACAA GATCAAGTAC GACCCCAAGT TCCAGGGCCG
201 GTTCACCATC TCTGCCGACA ACGCCAAGAA CTCCGCCTAC CTCCAGATGA
251 ACTCTCTGCG CGCCGAGGAT ACCGCCGTGT ACTACTGCGC CCGGAGCGAG
301 GAGAACTGGT ACGACTTCTT CGACTACTGG GGCCAGGGCA CCCTGGTGAC
25 351 CGTGTCTCT (SEC ID NO: 172).

La secuencia de aminoácido de la región variable de cadena pesada de V2.11 (CDRs basados en la definición de AbM mostradas en regiones sin puntaje subsecuentes) es como sigue:

5

1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWIGR
 51 IDPANDNIKY DPKFQGRFTI SADNAKNSA Y LQMNSLRAED TAVYYCARSE
 110 ENWYDFFDYW GQGTILVTSS (SEC ID NO: 173).

La secuencia nucleotídica que codifica la región variable de la cadena pesada V2.16 con las retromutaciones (V48I;A49G;R72A) es como sigue:

10

1 GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGCGGCGGA CTGGTGCAGC CTGGCGGCTC
 51 TCTGCGGCTG TCTTGACCG GCTCCGGCTT CAACATCAAG GACACCTACA
 101 TCCACTGGGT GCGGCAGGCT CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GATCGGCCGG
 15 151 ATCGATCCTG CCAACGACAA CATCAAGTAC GACCCCAAGT TCCAGGGCCG
 201 GTTCACCATC TCTGCCGACA ACGCCAAGAA CTCCCTGTAC CTCCAGATGA
 251 ACTCTCTGCG CGCCGAGGAT ACCGCCGTGT ACTACTGCGC CCGGAGCGAG
 301 GAGAACTGGT ACGACTTCTT CGACTACTGG GGCCAGGGCA CCCTGGTGAC
 351 CGTGTCTCT (SEC ID NO: 174).

20

La secuencia de aminoácido de la región variable de cadena pesada de V2.16 (CDRs basados en la definición de AbM mostradas en regiones sin puntaje subsecuentes) es como sigue:

1 EVQLVESGGG L VQPGGSLRL SCTGSGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWIGR
 25 51 IDPANDNIKY DPKFQGRFTI SADNAKNSL Y LQMNSLRAED TAVYYCARSE

111 ENWYDFFDYW 'GQGLTVTVSS (SEC ID NO: 175).

La siguiente es la secuencia de aminoácido de un MH 2-7 humanizado V2.11 IgG 1 con un dominio CH2 mutado:

5 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWIGRIDP
ANDNIKYDPKFQGRFTISADNAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSEENWYD
FFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEALGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV
10 DVSHEDPEVKFNNVYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEC ID NO: 176).

El dominio variable está en los aminoácidos 1-120; CH1 en 121-218; andamiaje en 219-233; CH2 en 234-343; y CH3 en 344-450. La cadena ligera incluye la siguiente secuencia con el dominio variable en 1-133.

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSIHVSNGNTYLEWYQQKPKAPKLLIY
KVSNRFGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCFQGSHIPYTFGGGTKV
20 EIKRTVAAPSVFHWPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC (SEC ID NO: 177).

Ejemplo 11: Pruebas funcionales de variantes ejemplares de MJ

25 2-7.

Se evaluó la capacidad del anticuerpo MJ2-7 y de las variantes humanizadas para inhibir la IL-13 humana en las pruebas de determinación de actividad de IL-13.

5

Prueba de fosforilación de STAT6.

Se desarrollaron células epiteliales de colon humanas HT-29 (ATCC) como monocapa adherente en medio de McCoy 5A que contenía 10% de FBS, Pen-Strep, glutamina y bicarbonato de sodio. Para la prueba, las células se desprendieron del matraz usando tripsina, se transfirieron por lavado a medio fresco y se distribuyeron en tubos de poliestireno de 12x75 mm. Se agregó IL-13 recombinante humana (R&D Systems, Inc.) a concentraciones que oscilaban entre 100-0.01 ng/ml. Para las pruebas que probaban la capacidad del anticuerpo para inhibir la respuesta de IL-13, se agregó 1 ng/ml de IL-13 recombinante humana con diluciones de anticuerpo que oscilaban entre 500-0.4 ng/ml. Las células se incubaron en un baño de agua a 37°C durante 30-60 minutos, luego se transfirieron por lavado a PBS helado que contenía 1% de BSA. Las células se fijaron incubando en paraformaldehído al 1% en PBS durante 15 minutos a 37°C, luego se transfirieron por lavado a PBS que contenía 1% de BSA. Para permeabilizar el núcleo, las células se incubaron durante la noche a -20°C en metanol absoluto. Se transfirieron por lavado a PBS que

10

15

20

25

182

contenía 1% de BSA, luego se tiñeron con anticuerpo contra STAT6 marcado con ALEXA™ Fluor 488 (BD Biosciences). La fluorescencia se analizó con un programa FACSCAN™ y CELLQUEST (BD Biosciences).

5

Inducción de CD23 en monocitos humanos

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana por extendido sobre HISTOPAQUE® (Sigma). Las células se transfirieron por lavado a RPMI que contenía 10% de FCS inactivado por calor, 50 U/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomicina, L-glutamina 2 mM, y se colocaron en placas en una placa para cultivo de tejidos de 48 pozos (Costar/Corning). Se agregó IL-13 recombinante humana (R&D Systems, Inc.) a diluciones que oscilaron entre 100-0.01 ng/ml. Para las pruebas que probaban la capacidad del anticuerpo para inhibir la respuesta de IL-13, se agregó 1 ng/ml de IL-13 recombinante humana junto con diluciones de anticuerpo que oscilaban entre 500-0.4 ng/ml. Las células se incubaron hasta el día siguiente a 37°C en una incubadora con 5% de CO₂. Al día siguiente, las células se cosecharon de los pozos usando la Solución de Disociación Celular no enzimática (Sigma), luego se transfirieron por lavado a PBS helado que contenía 1% de BSA. Las células se incubaron con anticuerpo contra CD23 humana marcado con PE (BD Biosciences, San Diego, CA) y anticuerpo contra CD11b humana marcado con Cy-Chrome

(BD Biosciences). Los monocitos se activaron en base a la dispersión frontal intensa y la dispersión lateral de la luz, y a la expresión de CD11b. La expresión de CD23 en monocitos se determinó por citometría de flujo usando un FACSCAN™ (BD Biosciences), y el porcentaje de células CD23⁺ se analizó con un programa CELLQUEST™ (BD Biosciences).

Proliferación de células TF-1

Las células TF-1 son una línea celular hemopoyética humana dependiente de factor que requiere interleucina 3 (IL-3) o factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF) para su crecimiento a largo plazo. Las células TF-1 también responden a una variedad de otras citosinas, incluyendo la interleucina 13 (IL-13). Se mantuvieron células TF-1 (ATCC) en RPMI que contenía 10% de FCS inactivado por calor, 50 U/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomycin, L-glutamina 2 mM y 5 ng/ml de GM-CSF recombinante humana (R&D Systems). Antes de la prueba, las células se privaron de GM-CSF hasta el día siguiente. Para la prueba, las células TF-1 se colocaron en placas por duplicado a razón de 5000 células/pozo en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pozos (Costar/Corning), y se estimularon con IL-13 humana (R&D Systems), en el intervalo de 100-0.01 ng/ml. Después de 72 horas en una incubadora a 37°C con 5% de CO₂, las células se sometieron a pulsos de ³H-timidina de 1

TCi/pozo (Perkin Elmer/New England Nuclear). Se incubaron por 4.5 horas adicionales, luego las células se cosecharon a esteras filtrantes utilizando un cosechador TOMTEK™. La incorporación de ³H-timidina se evaluó por conteo de centelleo líquido.

Prueba de producción de tenascina

Se mantuvieron células epiteliales bronquiales humanas BEAS-2B (ATCC) en medio BEGM con suplementos (Clonetics). Las células se colocaron en placas a razón de 20,000 por pozo en una placa de cultivo de fondo plano de 96 pozos hasta el día siguiente. Se agrega medio fresco que contiene IL-13 en presencia o ausencia del anticuerpo indicado. Después de una incubación hasta el día siguiente, se cosechan los sobrenadantes, y se analizan para determinar la presencia del componente de la matriz extracelular tenascina C, mediante ELISA. Se recubren las placas de ELISA hasta el día siguiente con 1 ug/ml de anticuerpo monoclonal de murino contra tenascina humana (IgG1, k; Chemicon International) en PBS. Las placas se lavan con PBS que contiene 0.05% de Tween-20 (PBS-Tween), y se bloquean con PBS que contiene 1% de BSA. Se agregó solución bloqueadora fresca cada 6 minutos para un total de tres cambios. Las placas se lavaron 3X con PBS-Tween. Se agregaron los sobrenadantes celulares o el patrón de tenascina humana (Chemicon International) y se incubaron durante 60 minutos a 37°C. Las placas se lavaron 3X con PBS-

185

Tween. La tenascina se detectó con anticuerpo monoclonal murino contra tenascina (IgG2a, k; Biohit). La unión se detectó con anticuerpo marcado con HRP contra IgG2a de ratón, seguido de sustrato TMB. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 0.01 N. La absorbancia se leyó a 450 nm.

La línea celular epitelial humana HT 29 puede usarse para probar la fosforilación de STAT6. Se incuban células HT 29 con 1 ng/ml de una preparación bruta de IL-13 nativa humana en presencia de concentraciones crecientes del anticuerpo de prueba durante 30 minutos a 37°C. El análisis Western blot de lisados celulares con un anticuerpo contra STAT6 fosforilada puede usarse para detectar la fosforilación de STAT6 mediada por IL-13 dependiente de la dosis. De modo similar, el análisis por citometría de flujo puede detectar STAT6 fosforilada en células HT 29 que fueron tratadas con una concentración de saturación de IL-13 durante 30 minutos a 37°C, fijadas, permeabilizadas y teñidas con un mAb contra fosfo-STAT6 marcado con ALEXA™ Fluor 488. Se expone en la siguiente Tabla un conjunto de resultados que sirven de ejemplo. La actividad inhibidora de V2.11 fue comparable a la de sIL-13Rα2-Fc.

Tabla 1

5

Construcción		Retromutaciones VH	Expresión μg/ml/COS; 48 h	Prueba STAT6 de hIL-13 nativa IC ₅₀ , nM
V2.0	V2 injerto CDR	Ninguna, CDR injertado	8-10	>100
V2.1	V2	V48I; A49G	9-14	2.8

Construcción		Retromutaciones VH	Expresión μg/ml/COS; 48 h	Prueba STAT6 de hIL-13 nativa IC ₅₀ , nM
V 2.2	V2	R67K; F68A	5-6	>100
V 2.3	V2	R72A	8-9	1.67-2.6
V 2.4	V2	A49G	10	17.5
V 2.5	V2	R67K; F68A; R72A	4-5	1.75
V 2.6	V2	V48I; A49G; R72A	11-12	1.074-3.37
V 2.7	V2	A49G; R72A	10-11	1.7
V 2.11	V2	V48I; A49G; R72A; L79A	24	0.25-0.55

Ejemplo 12: Sitio de interacción de unión entre IL-13 e IL-13R α 1

Se estudió mediante cristalografía de rayos X un
5 complejo de IL-13, el dominio extracelular de IL-13R α 1
(residuos 27-342 de SEC ID NO: 125), y un anticuerpo que se
une a la IL-13 humana. Se hallaron dos puntos de interacción
sustancial entre IL-13 e IL-13R α 1. La interacción entre el
dominio 1 de Ig de IL-13R α 1 y de IL-13 da lugar a la
10 formación de una lámina beta extendida que abarca las dos
moléculas. Los residuos Thr88 [Thr107], Lys89 [Lys108], Ile90
[Ile109] y Glu91 [Glu110] de IL-13 (SEC ID NO: 124, secuencia
madura [secuencia de longitud completa (SEC ID NO: 178)])
forman una hebra beta que interactúa con los residuos Lys76,
15 Lys77, Ile78 y Ala79 del receptor (SEC ID NO: 125). Además,
la cadena lateral del Met33 [Met52] de IL-13 (SEC ID NO: 124
[SEC ID NO: 178]) se extiende hacia el interior de un
bolsillo hidrofóbico que es creado por las cadenas laterales
de estas hebras contiguas.

20 La característica predominante de la interacción con el
dominio 3 de Ig es la inserción de un residuo hidrofóbico
(Phe107 [Phe126]) de IL-13 (SEC ID NO: 124) [SEC ID NO. 178])
en un bolsillo hidrofóbico del dominio 3 de Ig del receptor
IL-13R α 1. El bolsillo hidrofóbico de IL-13R α 1 está formado
25 por las cadenas laterales de los residuos Leu319, Cys257,

Arg256 y Cys320 (SEC ID NO: 125). La interacción con Phe107 [Phe126] de IL-13 (SEC ID NO: 124 [SEC ID NO: 178]) da lugar a un conjunto extensivo de interacciones de van der Waals entre los residuos de aminoácido Ile254, Ser255, Arg256, 5 Lys318, Cys320 y Tyr321 de IL-13R α 1 (SEC ID NO: 125) y los residuos de aminoácido Arg11 [Arg30], Glu12 [Glu31], Leu13 [Leu32], Ile14 [Ile33], Glu15 [Ile34], Lys104 [Lys123], Lys105 [Lys124], Leu106 [Leu125], Phe107 [Phe126] y Arg108 [Arg 127] de IL-13 (SEC ID NO: 124 [SEC ID NO: 178]). Estos 10 resultados demuestran que un antagonista de IL-13 que se una a las regiones de IL-13 involucradas en la interacción con IL-13R α 1 puede usarse para inhibir la señalización de IL-13.

15 Ejemplo 13: Expresión del anticuerpo humanizado MJ 2-7 en células COS

Con el fin de evaluar la producción de anticuerpos quiméricos anti-NHP IL13 en el sistema recombinante mamífero, se subclonaron las regiones variables del anticuerpo MJ 2-7 20 de ratón en un vector de expresión pED6 que contenía regiones constantes humanas kappa e IgG1 mut. Se cultivaron células COS-1 de riñón de mono en medio DME (Gibco) que contenía 10% de suero fetal de bovino inactivado por calor, glutamina 1 mM y 0.1 mg/ml de Penicilina/Estreptomicina. La transfección de 25 las células COS se realizó usando reactivo de transfección

TRANSITITTM-LT1 (Mirus) de acuerdo con el protocolo sugerido por el proveedor del reactivo. Las células COS transfectadas se incubaron durante 24 horas a 37°C en presencia de 10% de CO₂, se lavaron con PBS estéril, y luego se desarrollaron en medio R1CD1 libre de suero (Gibco) durante 48 horas para permitir la secreción del anticuerpo y la acumulación en el medio acondicionado. La expresión del anticuerpo chMJ 2-7 se cuantificó mediante ELISA de IgG humana total usando como patrón anticuerpo IgG 1/kappa humano purificado.

La producción de anticuerpo quimérico MJ 2-7 en células COS fue significativamente menor que la del anticuerpo quimérico de control (Tabla 2). Por lo tanto, la optimización de la expresión de Ab se incluyó en el proceso de humanización de MJ 2-7. El MJ 2-7 V1 humanizado se construyó mediante injerto de CDR de las CDRs de cadena pesada del MJ 2-7 de ratón en el clon de línea germinal humana más homólogo, DP 25, que es bien expresado y representado en la respuesta típica de anticuerpos humanos. Las CDRs de cadena ligera se subclonaron en el clon DPK 18 de línea germinal humana con el objeto de generar huMJ 2-7 V1 VL. El MJ 2-7 V2 humanizado se preparó mediante injerto de CDR de la región variable de las CDRs del MJ 2-7 al marco del gen de línea germinal humano DP54 y las CDRs de la región variable de cadena ligera del MJ 2-7 al marco del gen de línea germinal humano DPK9. El clon DP 54 pertenece al subgrupo de líneas

germinales humanas VH III y DPK9 pertenece al subgrupo de genes humanos de línea germinal V kappa I. Los fragmentos de anticuerpo que consisten en la combinación de armazones VH III y V kappa I tienen alto nivel de expresión en el sistema de *E. coli* y poseen elevada estabilidad y solubilidad en soluciones acuosas (ver, por ejemplo, Stefan Ewert et al, *J. Mol. Biol.* (2003), 325; 531-553, Adrian Auf et al, *Methods* (2004) 34:215-224). Se han usado la combinación de marcos DP54/DPK9 humanos en la producción de varios anticuerpos recombinantes y se logró una elevada expresión de anticuerpo (> 20 µg/ml) en los experimentos de transfección transitoria de COS.

15 Tabla 2

mAb	Expresión, µg/ml
3D6	10.166
Ch MJ 2-7 pED6 (1)	2.44
Ch MJ 2-7 pED6 (2)	2.035
h12A11 V2	1.639

Los genes MJ 2-7 V1 y V2 VH y VL injertados por CDR se subclonaron en dos sistemas de vector de expresión de mamífero (pED6kappa/pED6 IgG1 mut y pSMEN2kappa/pSMED2IgG1

mut), y la producción de anticuerpos MJ 2-7 humanizados se evaluó en experimentos de transfección transitoria de COS como se describió con anterioridad. En el primer conjunto de experimentos se evaluó el efecto de diferentes combinaciones de huMJ 2-7 VL y VH sobre la expresión del anticuerpo (Tabla 3). La modificación de las regiones de marco de MJ 2-7 VL a DKP9 incrementó la producción de anticuerpos entre 8-10 veces, mientras que VL V1 (injertado por CDR a DPK 18) mostró sólo un incremento moderado en la producción de anticuerpos. Este efecto se observó cuando VL humanizada se combinó con MJ 2-7 VH quimérica y MJ 2-7 V1 y V2 humanizadas. La MJ 2-7 V2 injertada por CDR tuvo un nivel de expresión 3 veces más alto que la MJ 2-7 V1 injertada por CDR en iguales condiciones de prueba.

Tabla 3

mAb	Expresión, µg/ml
ChMJ 2-7	1.83
hVH V1/mVL	3.04
hVH V1/hVL V1	6.34
hVH V1/hVL V2	15.4
hVH-V2/mVL	0.2
hVH/hVL-V2	18.41
hVH-V2/hVL-V1	5.13
hVH-V2/hVL-V2	10.79

Experimentos similares se efectuaron con huMJ 2-7 V2 que
contenían retromutaciones en las regiones variables de cadena
pesada (Tabla 4). El nivel más elevado de expresión se
detectó para huMJ 2-7 V2.11, que retuvo las propiedades de
5 unión al antígeno y neutralización del anticuerpo MJ 2-7 de
ratón. La introducción de retromutaciones en las posiciones
48 y 49 (V48I y A49G) incrementó la producción del anticuerpo
huMJ 2-7 V2 en células COS, mientras que las retromutaciones
de aminoácidos en las posiciones 23, 24, 67 y 68 (A23T; A24G;
10 R67K y F68A) tuvieron un impacto negativo sobre la expresión
del anticuerpo.

Tabla 4

	mAb	Expresión, µg/ml
15	V2	8.27
	V2.1	12.1
	V2.2	5.29
	V2.3	9.60
	V2.4	8.20
20	V2.5	6.05
	V2.6	11.3
	V2.10	9.84
	V2.11	14.85
25	V2.16	1.765

Ejemplo 14: Evaluación de las propiedades de unión al antígeno de anticuerpos MJ 2-7 humanizado mediante ELISA de NHP IL-13 FLAG

5 La capacidad del mAb MJ 2-7 totalmente humanizado (V1, V2 v2) para competir con el Ab MJ 2-7 biotinilado de ratón por la unión a NHP IL-13-FLAG se determinó mediante ELISA. Las placas de microtitulación (Costar) se recubrieron con 1 µg/ml de anticuerpo M2 anti-FLAG monoclonal (Sigma). La
10 proteína FLAG NHP IL-13 a una concentración de 10 ng/ml se mezcló con 10 ng/ml de anticuerpo MJ 2-7 de ratón marcado con biotina y diversas concentraciones de anticuerpo MJ 2-7 de ratón y humanizado no marcado. La mezcla se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente y luego se agregó a la placa
15 recubierta con el anticuerpo anti-FLAG. La unión de los complejos FLAG NHP-IL-13/bioMJ2-7 Ab se detectó con estreptavidina-HRP y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). El MJ 2-7 V2 humanizado perdió actividad de manera significativa, mientras que huMJ 2-7 V2.11 recuperó
20 completamente la actividad de unión al antígeno y fue capaz de competir con MJ 2-7 mAb biotinilado por la unión a FLAG-NHP IL-13. El análisis por BIACORE™ también confirmó que NHP IL-13 tenía una rápida unión a, y una lenta disociación del h1 uMJ 2-7 v2.11 inmovilizado.

Ejemplo 15: Modelación molecular de MJ2-7 V2VH

Los moldes de la estructura para modelar la cadena pesada de MJ2-7 humanizada versión 2 (MJ2-7 V2VH) se seleccionaron con base en las búsquedas de homología BLAST
5 contra el Banco de datos de proteínas (PDB). Aparte de las dos estructuras seleccionadas de la salida de la búsqueda BLAST, se seleccionó un molde adicional de una base de datos local de las estructuras proteínicas. El modelo de MJ2-7 V2VH se elaboró usando los tres estructuras del molde 1JPS
10 (estructura de co-cristal del factor de tejido humano en el complejo con Fab D3h44 humanizado), 1N8Z (estructura de co-cristal de Her2 humano en el complejo con Herceptina Fab) y F13.2 (IL-13 en el complejo con el fragmento Fab de anticuerpo de ratón) como los moldes y el módulo de homología
15 de InsightII (Accelrys, San Diego). Las regiones estructuralmente conservadas (SCRs) de 1JPS, 1N8Z y F13.2 (disponible en Ap. 16163-029001)) se determinaron con base en la matriz de distancia $C\alpha$ para cada molécula y las estructuras del molde estuvieron superimpuestas con base en
20 la desviación RMS mínima de los átomos correspondientes en SCRs. La secuencia de la proteína blanco MJ2-7 V2VH se alineó a las secuencias de las proteínas de molde superimpuestas y los coordinados de SCRs se asignaron a los residuos correspondientes de la proteína blanco. Con base en el grado
25 de similitud de la secuencia entre el blanco y los moldes en

cada uno de SCRs, los coordinados de diferentes moldes se usaron para diferentes SCRs. Los coordinados para las espiras y las regiones variables no incluidas en los SCRs se generaron por los métodos Search Loop o Generate Loop como se
5 implementaron en el módulo de homología. En forma breve, el método de Search Loop explora las estructuras proteínicas que se ajustarían apropiadamente entre dos SCRs comparando la matriz de distancia Ca de los residuos SCR de flanco con una matriz pre-calculada derivada de las estructuras
10 proteínicas que tienen el mismo número de residuos de flanco, y un segmento de péptido de intervención de una longitud dada. El método Generate Loop que genera coordinados atómicos "de novo" se usó en los casos en donde Search Loop no produjo los resultados deseados. La conformación de las
15 cadenas laterales de aminoácidos se mantuvo igual que en el molde si el residuo de aminoácido fue idéntico en el molde en el blanco. Sin embargo, se hizo una búsqueda conformacional de los rotámeros y la conformación energéticamente más favorable se retuvo para los residuos que no son idénticos en
20 el molde y el blanco. Esto se siguió por la reparación de unión que establece una simulación de mecánica molecular para derivar las longitudes de enlace apropiadas y los ángulos de enlace en las uniones entre dos SCRs o entre SCR y una región variable. Por último, el modelo se sometió a minimización de
25 energía usando el algoritmo Steepest Descents hasta una

derivada máxima de 5 kcal/(mol Å) ó 500 ciclos y el algoritmo Conjugate Gradients hasta una derivada máxima de 5 kcal/(mol Å) ó 2000 ciclos. La calidad del modelo se evaluó usando el comando ProStat/Struct_Check.

5 El modelo molecular de MJ2-7 VH de ratón se construyó siguiendo el procedimiento descrito para MJ2-7 V2VH humanizado excepto que los moldes usados fueron IQBL e IQBM, estructuras cristalinas para el anticuerpo FabE8 anti-citocromo c de caballo.

10 Las diferencias potenciales en los enlaces de H del marco CDR se predijeron por los modelos

hMJ2-7 V2VH:G26 - hMJ2-7 V2VH:A24

hMJ2-7 V2VH:Y109 - hMJ2-7 V2VH:S25

mMJ2-7 VH:D61 - mMJ2-7 VH:I48

15 mMJ2-7 VH:K63 - mMJ2-7 VH:E46

mMJ2-7 VH:Y109 - mMJ2-7 VH:R98

Estas diferencias sugieren la siguientes retromutaciones opcionales: A23T, A24G y V48I.

20 Otras retromutaciones opcionales sugeridas con base en la desviación RMS significativa de los aminoácidos individuales y las diferencias en los residuos de aminoácidos adyacentes a estos son: G9A, L115T y R87T.

Ejemplo 16: Actividad de neutralización de IL-13 de MJ2-7 y C65

Las capacidades de neutralización de IL-13 de MJ2-7 y C65 se probaron en una serie de bioensayos. Primero, la capacidad de estos anticuerpos para neutralizar la bioactividad de NHP IL-13 se probó en una prueba de expresión de CD23 de monocito. Se incubaron PBMC de humano aislado de forma fresca durante la noche con 3 ng/ml de NHP IL-13 en presencia de concentraciones aumentadas de MJ2-7, C65 ó sIL-13R α 2-Fc. Las células se cosecharon, se tiñeron con el anticuerpo marcado con CYCHROMETM al marcador específico de monocito, CD11b y con el anticuerpo marcado con PE a CD23. En respuesta al tratamiento con IL-13, la expresión de CD23 se sobre-regula sobre la superficie de monocitos, que se dispararon con base en la expresión de CD11b. MJ2-7, C65 y sIL-13R α 2-Fc fueron capaces de neutralizar la actividad de NHP IL-13 en esta prueba. Las potencias de MJ2-7 y sIL-13R α 2-Fc fueron equivalentes. C65 fue aproximadamente 20 veces menos activa (Figura 2).

En un segundo bioensayo, las capacidades de neutralización de MJ2-7 y C65 para la IL-13 humana nativa se probaron en una prueba de fosforilación STAT6. La línea celular epitelial HT-29 se incubó con 0.3 ng/ml de IL-13 humana nativa en presencia de concentraciones aumentadas de MJ2-7, C65 o sIL-13R α 2-Fc, durante 30 minutos a 37°C. Las

00320

células se fijaron, permeabilizaron, y se tiñeron con el anticuerpo marcado con ALEXATM Fluor 488 a STAT6 fosforilada. El tratamiento de IL-13 estimuló la fosforilación de STAT6. MJ2-7, C65 y sIL-13R α 2-Fc fueron capaces de neutralizar la actividad de la IL-13 humana nativa en esta prueba (Figura 3). Los IC₅₀ para el anticuerpo MJ-27 de murino y la forma humanizada (V2.11) fueron 0.48 nM y 0.52 nM, respectivamente. Las potencias de MJ2-7 y sIL-13R α 2-Fc fueron aproximadamente equivalentes. El IC₅₀ para sIL-13R α 2-Fc fue de 0.33 nM (Figura 4). C65 fue aproximadamente 20 veces menos activo (Figura 5).

En un tercer bioensayo, la capacidad de MJ2-7 para neutralizar la IL-13 humana nativa se probó en una prueba de producción de tenascina. La línea celular epitelial de pulmón BEAS-2B de humano se incubó durante la noche con 3 ng/ml de IL-13 humana nativa en presencia de concentraciones aumentadas de MJ2-7. Los sobrenadantes se cosecharon y se probaron para la producción de la proteína de matriz extracelular, tenascina C, por ELISA (Figura 6A). MJ2-7 inhibió esta respuesta con IC₅₀ de aproximadamente 0.1 nM (Figura 6B).

Estos resultados demuestran que MJ2-7 es un neutralizador efectivo de NHP IL-13 e IL-13 humana nativa. La capacidad de neutralización de la IL-13 de MJ2-7 es equivalente a la de sIL-13R α 2-Fc. MJ1-65 también tiene actividad de neutralización de IL-13, pero es aproximadamente

20 veces menos potente que MJ2-7.

Ejemplo 17: Mapeo del epítipo del anticuerpo MJ2-7 por SPR

5 sIL-13R α 2-Fc se recubrió directamente sobre una porción de CM5 por el acoplamiento de amina estándar. Se inyectó NHP-IL-13 a una concentración de 100 nM, y se detectó su unión a IL-13R α 2-Fc inmovilizada por BIACORE™. Una inyección adicional de 100 nM de anticuerpos anti IL-13 se adicionó, y se monitorearon los cambios en la unión. El anticuerpo MJ2-7
10 no se unió a NHP-IL-13 cuando estuvo en un complejo con hu IL-13R α 2, mientras que si lo hizo un control positivo del anticuerpo anti-IL-13 (Figura 7). Estos resultados indican que hu IL-13R α 2 y MJ2-7 se unen a los mismos o epítipos traslapados de NHP IL-13.

15

Ejemplo 18: Medición de las constantes de la velocidad cinética para la interacción entre NHP-IL-13 y el anticuerpo MJ2-7 V2-11 humanizado

Para preparar la superficie del biosensor, se inmovilizó
20 el anticuerpo específico de IgG Fc anti-humano de cabra sobre una porción de carboxi metil dextrano de grado investigación (CM5) usando el acoplamiento de amina. La superficie se activó con una mezcla de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) 0.1 M y N-
25 hidroxisuccinimida 0.05 M (NHS). El anticuerpo de captura se

inyectó a una concentración de 10 μ g/ml de amortiguador de acetato de sodio (pH 5.5). Los grupos activados restantes se bloquearon con etanolamina 1.0 M (pH 8.0). Como un control, se usó la primera célula de flujo como una superficie de referencia para corregir el índice de refracción volumétrico, el efecto de matriz, y la unión no específica, la segunda, tercera y cuarta células de flujo se recubrieron con la molécula de captura.

Para el análisis cinético, el anticuerpo monoclonal hMJ2-7 V2-11 se capturó sobre la superficie del anticuerpo anti IgG inyectando 40 μ l de una solución de 1 μ g/ml. La diferencia neta entre la línea base y el punto aproximadamente 30 segundos después de completar la inyección se tomó para representar la cantidad del blanco unido. Las soluciones de NHP-IL-13 a concentraciones de 600, 200, 66.6, 22.2, 7.4, 2.5, 0.8, 0.27, 0.09 y 0 nM se inyectaron por triplicado a una velocidad de flujo de 100 μ l por minuto durante 2 minutos, y se registró la cantidad del material unido como una función del tiempo (Figura 8). La fase de disociación se monitoreó en el amortiguador HBS/EP (HEPES 10 mM, pH 7.4 que contiene NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y Surfactante P20 al 0.005% (v/v) durante 5 minutos a la misma velocidad de flujo, seguido de dos inyecciones de 5 μ l de glicina, pH 1.5, para regenerar una superficie de captura completamente activa. Todos los experimentos cinéticos se realizaron a

22.5°C en el amortiguador HBS/EP. Los efectos del blanco y el amortiguador se sustrajeron para cada sensorgrama usando doble referencia.

Los datos cinéticos se analizaron usando los elementos de programación BIOEVALUATION™ 3.0.2 aplicado a un modelo 1:1. Las constantes de disociación aparente (k_d) y la asociación (k_a) se calcularon de las regiones apropiadas de los sensorgramas usando un análisis global. La constante de afinidad de la interacción entre el anticuerpo y NHP IL-13 se calculó de las constantes de velocidad cinética por la siguiente fórmula: $K_d = k_d/k_a$. Estos resultados indican que huMJ2-7 V2-11 tiene velocidades de activado y desactivado de $2.05 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $8.89 \times 10^{-4} \text{ 1/s}$, respectivamente, lo que resulta en un anticuerpo con una afinidad de 43 pM para NHP-IL-13.

Ejemplo 19: Actividad inhibidora de los intermediarios de humanización de MJ2-7 en bioensayos.

La actividad inhibidora de los diferentes intermediarios en el proceso de humanización se probó por los bioensayos de producción de tenascina y fosforilación de STAT6. Un nivel sub-máximo de NHP IL-13 o una preparación cruda de IL-13 humana nativa se usó para provocar una respuesta biológica, y se determinó la concentración de la versión humanizada de MJ2-7 requerida para inhibición media máxima de la respuesta.