

BT
OK



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

06-125972

54. TITULO: "AGENTES QUE SE UNEN A IL-13"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL: A61K 39/395

71. SOLICITANTE: WYETH

DOMICILIO: NUEVA JERSEY, ESTADOS UNIDOS

74. APODERADO: ALVARO CORREA ORDOÑEZ
T.P.No.20.281

22. BOGOTA, D.C., 15 de Diciembre de 2006

PETITORIO

00001

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Rad: 06-125972-00000-0000

Fec: 2005-12-15 17:10:00 Dep: 2000 NUEVE CIENTOS

18. 11 PATENTE

Evo 3/8 FASE NACIONAL

Act 411 PRESENTACION

Folios: 301

ación

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE :

☐

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

②

SOLICITANTE

(71)

Nombre WYETH

Dirección Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio Nueva Jersey, Estados Unidos de América

Lugar de Constitución. Delaware, Estados Unidos

Teléfono

Fax

E-Mail

IDENTIFICACION

C C

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre ALVARO CORREA ORDOÑEZ

Dirección Avenida 82 No 10-62 Piso 6

Teléfono 634 1500

Fax 376 2211

E-Mail office bogota@bakemet.com

IDENTIFICACION

C C

☒

NIT

☐

C E

☐

Otro

☐

Cual

Número

79.143.366 de
Usaquén

TP 20 281

④

INVENTOR (ES)

(72)

Nombre: TCHISTIAKOVA, Lioudmila; KASAIAN, Marion T.; DONALDSON, Debra D.; TAN, Xiang-Yang; GILL, Davinder, JACOBSON, Bruce, JIN, Macy X, GOLDMAN, Samuel J; KNOPF, John y WIDOM, Angela M.
Dirección: 19 Abbot Bridge Drive, Andover, MA 01810, Estados Unidos; 18 Concord Street, #1, Charlestown, MA 02129, Estados Unidos; 108 Blakely Road, Medford, MA 02155, Estados Unidos; 811 Gazebo Circle, Reading, MA 01867, Estados Unidos; 208 Fox Hill Road, Burlington, MA 01803, Estados Unidos; 64 Maple Street, Framingham, MA 01702, Estados Unidos; 15 Lakeview Avenue, Unit 7, Reading, MA 01867, Estados Unidos; 9 Mohawk Drive, Acton, MA 01720, Estados Unidos; Robbins Drive, Carlisle, MA 01741, Estados Unidos; 19 Cherokee Road, Acton, MA 01720, Estados Unidos, respectivamente

Nacionalidad o Domicilio: Canadiense, Estadounidense, Estadounidense, Estadounidense, Estadounidense, Estadounidense, Estadounidense, Estadounidense, Estadounidense, Estadounidense y Estadounidense, respectivamente

⑤ PCT (85)

Solicitud Internacional No PCT/US2005/021454

Fecha 17/06/05

Publicación Internacional No WO 2006/085938

Fecha 17/08/06

⑥ Título (54)

AGENTES QUE SE UNEN A IL-13

⑦

Clasificación Internacional (51)

A61K 39/395, C07H 21/04, C07K 16/24, C12N 5/06 y C12P 21/06

⑧

Prioridad

SI ☒NO ☐

(33) País de Origen

US

US

(32) Fecha

17/06/04

09/06/05

(31) Número de Solicitud

60/581,078

11/149,025

⑨

Comprobante de pago No. 06-93053

Fecha 05-DIC-06

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

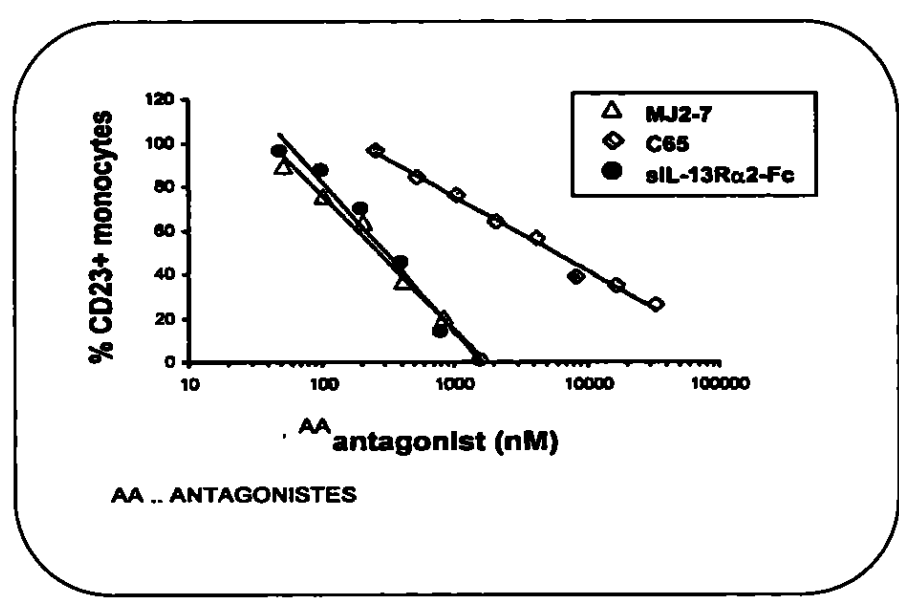
10

ANEXOS

nnn02

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

11 FIGURA CARATERISTICA



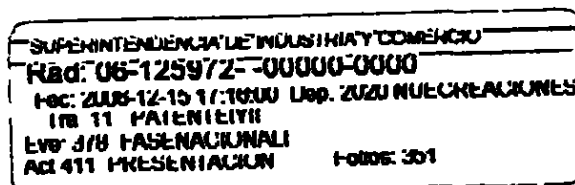
12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE. ALVARO CORREA ORDOÑEZ

FIRMA [Signature]

CC 79 143 366 de Usaquén TA 20 281

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 93,053
FECHA : DICIEMBRE 5 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ORLANDO LINARES	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	17247015	05/12/2006	62,126,000.00

***** CONCEPTO *****

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

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 291006 de un documento escrito en inglés efectuada por Jaime Armando Garavito Burgos, c.c. N° 19.130.702 de Bogotá, Traductor e Intérprete Oficial inglés-español-inglés según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

Poder otorgado por WYETH

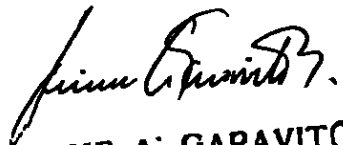
Texto en inglés y en español mediante el cual, **WYETH**, domiciliada en **Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940, Estados Unidos de América**, por el presente otorga poder a **ÁLVARO CORREA ORDÓÑEZ y/o OLGA GEORGETTE OTERO y/o RICARDO METKE y/o JUAN PABLO CONCHA**

de la firma Raisbeck, Lara, Rodríguez & Rueda, miembros de Baker & McKenzie, domiciliada en la Avenida 82 N° 10-62, piso 6, Bogotá, Colombia y ratifica todo lo actuado en derecho hasta el momento.

Solicitud de Patente para "ANTICUERPOS DE UNIÓN"

Dado y firmado el 29 de septiembre de 2006

WYETH
(Firmado)
William H. Calnan, Subsecretario


JAIME A. GARAVITO B.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
Res 034 de Enero 11 de 1983
MINISTERIO DE JUSTICIA

CERTIFICACIÓN NOTARIAL. Texto en inglés y en español mediante el cual el suscrito Notario certifica la existencia legal de la sociedad **WYETH**, así como las funciones y firma de su representante autorizado **William H. Calnan, Subsecretario**, para efectos de lo cual se ha basado en.

Acta de la Reunión de la Junta Directiva de abril 27 de 2006.

(Firmado) Michelle L. McGowan, Notario Público el 29 de septiembre de 2006

(Sello en tinta que dice "Michelle L. McGowan, Notario Público, Estado de Nueva Jersey, No. 2108903 Calificado en el Condado de Morris. Comisión vence el 09 de febrero de 2011")

(Aparece sello realizado que dice: "Michelle L. McGowan, Notario Público, Nueva Jersey")

APOSTILLA

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. Ha sido firmado por MICHELLE L MC GOWAN, NOTARIO
3. Quien actúa en calidad de NOTARIO PÚBLICO DE NUEVA JERSEY
4. Lleva el sello de MICHELLE L MC GOWAN, NOTARIO

Certificado

5. En TRENTON, NUEVA JERSEY
6. EL 04 DE OCTUBRE DE 2006
7. Por Bradley Abelow, TESORERO DE NUEVA JERSEY
8. N° A272530
9. Sello (Aparece adherido sello dorado)
10. Firma (firmado) Bradley Abelow



JAIME A. GARAVITO B
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
Res 034 de Enero 11 de 1983
MINISTERIO DE JUSTICIA

La anterior es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.



Jaime Armando Garavito Burgos
c.c. N° 19.130.702 de Bogotá
Traductor e Intérprete Oficial según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983
expedida por el Ministerio de Justicia

BOGDM5 # 64601

APOSTILLE

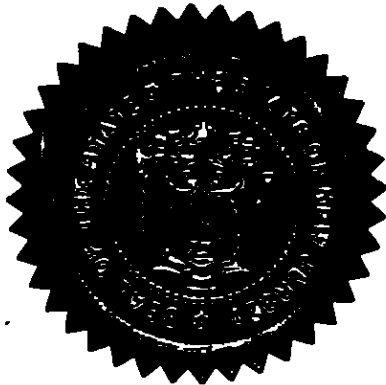
6

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

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

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 4TH DAY OF OCTOBER 2006
7. BY: Bradley Abelow, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A272530
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



Bradley Abelow

Raisbeck, Lara, Rodríguez & Rueda
Av 82 No 10 - 62 6th Floor
Bogotá, Colombia

NIT 880 088 840-3
Tel +57 1 634 1500
Fax +57 1 378 2211
www.bakernet.com

POWER OF ATTORNEY

The undersigned

WYETH

with offices at

Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
United States of America

declares that it hereby grants to

**ALVARO CORREA-ORDOÑEZ and/or
OLGA GEORGETTE OTERO and/or
RICARDO METKE and/or
JUAN PABLO CONCHA**

all members of the law firm Raisbeck, Lara, Rodríguez & Rueda, with domicile at Av. 82 No 10 – 62, 6th floor, of Bogotá D. C., Colombia, and for so long as they remain members of the law firm, a full and sufficient power of attorney with respect to Colombian patent application(s) based on PCT/US2005/021454 and entitled "TL-13 Binding Antibodies" and to obtain patent protection therefor, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of a patent(s) based upon said patent application(s), including filing of assignments, change of name or address, voluntary cancellation, and defending oppositions, cancellations, nullity, writ mandamus, and in general the civil, penal, an administrative processes relating to those rights

I hereby ratify all lawful actions previously taken on behalf of this company by the aforementioned attorneys with respect to the mentioned matters

Done and subscribed in

On the 29th day of September of 2006**WYETH**


William H. Calnan; Assistant Secretary

PODER DE ABOGADO

La abajo firmada,

WYETH

con oficinas en

Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
Estados Unidos de América

declara por el presente que otorga a

**ALVARO CORREA-ORDOÑEZ y/o
OLGA GEORGETTE OTERO y/o
RICARDO METKE y/o
JUAN PABLO CONCHA**

Todos miembros de la firma de abogados Raisbeck, Lara, Rodríguez & Rueda, con domicilio en la Av 82 No. 10 – 62 Piso 6 en Bogotá D. C., Colombia, para tan largo como ellos se quedan miembros de dicho bufete de abogados, poder especial amplio y suficiente con respecto a la solicitud(es) de patente en Colombia basada(s) en PCT/US2005/021454 y titulada "TL-13 Binding Antibodies", y para obtener la protección de patente de la misma, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera autoridades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos a) Obtención de la(s) patente(s) de invención basada(s) en la mencionada solicitud de patente, incluyendo presentación de traspasos, cambio de nombre o dirección, cancelación voluntaria; y defensa en oposiciones, cancelaciones, nulidades, la tutela, y en general procesos civiles, penales, administrativos relacionados con estos derechos.

Igualmente, ratifico todo lo actuado en derecho hasta el momento en nombre de esta compañía por cualquiera de los mencionados apoderados en los casos mencionados.

Dado y firmado en

A los 29 días del mes de septiembre de 2006

Firma de la persona que firma el Poder

NOTARIAL CERTIFICATION

On this 29th day of September
2006, the undersigned Notary

CERTIFIES

1. That **William H. Calnan**

of legal age and located at

Five Giralda Farms, Madison, New Jersey 07940 U.S.A.

set his hand on the foregoing document

2. That the grantor is to me personally known and that he/she has legal capacity to execute the instrument.

3. That the grantor has executed the foregoing document as

Assistant Secretary

of the judicial person **WYETH**

4. That the judicial person **WYETH**
having its home office in

**Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
United States of America**

is duly organized, has present legal existence and that the purposes for which the power of attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

5. That the grantor has in fact the referred to authority and that his/her representation is legal

6. That I have based certifications 3, 4 and 5 above on the following authentic documents for such purpose exhibited to me and which I mention specifically, giving their dates and their origin or source:

Minutes from the Board of Director's Meeting held on April 27, 2006.

Notary Public
Michelle L. McGowan
MICHELLE L. MCGOWAN
Notary Public, State of New Jersey
No. 2108903
Qualified in Morris County
Commission Expires Feb. 9, 2011

CERTIFICACION NOTARIAL

A los 29 días del mes de septiembre
de 2006, el suscrito Notario

DA FE

1. Que **William H. Calnan**

mayor y domiciliado en

Five Giralda Farms, Madison, New Jersey

07940 Estados Unidos de América
suscrito de su puño y letra el documento que antecede.

2. Que conozco al otorgante y que éste tiene capacidad legal para el otorgamiento.

3. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de

Subsecretario

de la persona jurídica **WYETH**

4. Que la persona jurídica **WYETH**
con sede en

**Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
Estados Unidos de América**

está legalmente constituida, que tiene existencia legal actual y que el acto para el cual se otorga el poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social

5. Que el otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta y que ésta es legítima.

6. Que he basado las certificaciones 3, 4 y 5 anteriores en los siguientes documentos auténticos que al efecto se me exhibieron y que menciono específicamente con expresión de sus fechas y de su origen o procedencia:

Actas de la reunión de la Junta Directiva celebrada el 27 de abril de 2006

El Notario Público

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
17 August 2006 (17.08.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/085938 A2

(51) International Patent Classification:

A61K 39/395 (2006 01) C07K 16/24 (2006 01)
C07H 21/04 (2006.01) C12N 5/06 (2006 01)
C12P 21/06 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2005/021454

(22) International Filing Date: 17 June 2005 (17 06 2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/581,078 17 June 2004 (17 06 2004) US
11/149,025 9 June 2005 (09 06 2005) US

(71) Applicant (for all designated States except US): WYETH
[US/US], 5 Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): TCHISTIAKOVA,
Lloudmila [CA/US], 19 Abbot Bridge Drive, Andover,
MA 01810 (US). KASAIAN, Marlon, T. [US/US];
18 Concord Street, #1, Charlestown, MA 02129 (US)
DONALDSON, Debra, D. [US/US], 108 Blakely Road,
Medford, MA 02155 (US). TAN, Xiang-Yang [US/US],
811 Gazebo Circle, Reading, MA 01867 (US) GILL,

Davinder [US/US], 208 Fox Hill Road, Burlington, MA
01803 (US). JACOBSON, Bruce [US/US], 64 Maple
Street, Framingham, MA 01702 (US). JIN, Macy, X.
[US/US], 15 Lakeview Avenue, Unit 7, Reading, MA
01867 (US). GOLDMAN, Samuel, J. [US/US], 9 Mo-
hawk Drive, Acton, MA 01720 (US) KNOPF, John
[US/US], 147 Robbins Drive, Carlisle, MA 01741 (US)
WIDOM, Angela, M. [US/US], 19 Cherokee Road,
Acton, MA 01720 (US)

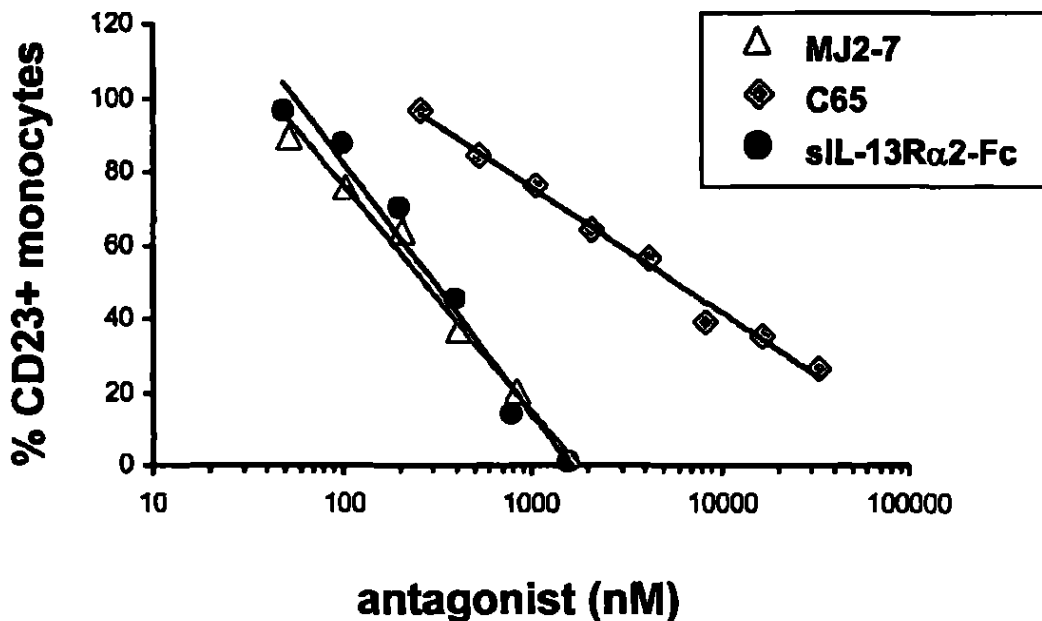
(74) Agent: TABTIANG, Ramon, FISH & RICHARDSON
PC, 225 Franklin Street, Boston, MA 02110-2804 (US)

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

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),

[Continued on next page]

(54) Title: IL-13 BINDING AGENTS



(57) Abstract: Agents (e.g., antibodies and fragments thereof) that bind specifically to IL-13 and modulate the ability of IL-13 to interact with IL-13 receptors and signaling mediators are disclosed.

WO 2006/085938 A2

WO 2006/085938 A2



European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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

Published:

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

IL-13 BINDING AGENTS

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

- [0001] This application claims priority to U.S. Patent Application Serial No. 60/581,078, filed on June 17, 2004, under 35 U.S.C. § 119, and claims priority to U.S. Patent Application Serial No. 11/____, filed on June 9, 2005, titled "ANTI-IL-13 ANTIBODIES AND COMPLEXES" and bearing attorney docket number 16163-029001. The contents of the aforementioned applications are hereby incorporated by reference.

SEQUENCE LISTING

- 10 [0002] This application incorporates the sequence listing submitted as [to be entered at a later date].

BACKGROUND

- [0003] Interleukin-13 (IL-13) is a cytokine secreted by T lymphocytes and mast cells (McKenzie et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3735-39; Bost et al. (1996) *Immunology* 87:663-41). IL-13 shares several biological activities with IL-4. For example, either IL-4 or IL-13 can cause IgE isotype switching in B cells (Tomkinson et al. (2001) *J. Immunol.* 166:5792-5800). Additionally, increased levels of cell surface CD23 and serum CD23 (sCD23) have been reported in asthmatic patients (Sanchez-Guererro et al. (1994) *Allergy* 49:587-92; DiLorenzo et al. (1999) *Allergy Asthma Proc.* 20:119-25). In addition, either IL-4 or IL-13 can upregulate the expression of MHC class II and the low-affinity IgE receptor (CD23) on B cells and monocytes, which results in enhanced antigen presentation and regulated macrophage function (Tomkinson et al., *supra*). Importantly, either IL-4 or IL-13 can increase the expression of VCAM-1 on endothelial cells, which facilitates preferential recruitment of eosinophils (and T cells) to the airway tissues (Tomkinson et al., *supra*). Either IL-4 or IL-13 can also increase airway mucus secretion, which can exacerbate airway responsiveness (Tomkinson et al., *supra*). These observations suggest that although IL-13 is not necessary for, or even capable of, inducing Th2 development, IL-13 may be a key player in the development of airway eosinophilia and AHR (Tomkinson et al., *supra*; Wills-Karp et al. (1998) *Science* 282:2258-61).

SUMMARY

- [0004] We have discovered, *inter alia*, IL-13 binding agents, in particular, anti-IL-13 antibody molecules can bind to human IL-13 and/or cynomolgus monkey IL-13, with high affinity and specificity. In one embodiment, the antibody molecules reduce at least one IL-13-associated activity, e.g., modulation of an inflammatory condition. For example, the anti-IL-13 antibody molecules can bind to IL-13 and modulate, e.g., inhibit, an interaction (e.g., binding) between IL-13 and an IL-13 receptor, e.g., IL-13 receptor $\alpha 1$ ("IL-13R $\alpha 1$ "), IL-13 receptor $\alpha 2$ ("IL-13R $\alpha 2$ "), and/or the interleukin-4 receptor alpha chain ("IL-4R α "), thereby reducing or preventing signal transduction.
- 10 [0005] An IL-13 binding agent, such as an anti-IL-13 antibody molecule can be used to modulate (e.g., inhibit) at least one IL-13-associated activity *in vivo*. The IL-13 binding agent can be used to treat or prevent an IL-13 associated-disorder, or to ameliorate at least one symptom thereof. Exemplary IL-13 associated disorders include inflammatory disorders (e.g., lung inflammation), respiratory disorders (e.g., asthma, including allergic and non-allergic asthma, chronic obstructive pulmonary disease (COPD)), as well as conditions involving airway inflammation, eosinophilia, fibrotic disorders (e.g., cystic fibrosis, liver fibrosis, and pulmonary fibrosis), scleroderma, excess mucus production; atopic disorders (e.g., atopic dermatitis, urticaria, eczema, allergic rhinitis, and allergic enterogastritis), an IL-13 associated cancer (e.g., a leukemia, glioblastoma, or lymphoma, e.g., Hodgkin's lymphoma), gastrointestinal disorders (e.g., inflammatory bowel diseases), liver disorders (e.g., cirrhosis), and viral infections.
- 20 [0006] An IL-13 binding agent can be a protein, e.g., an antibody molecule, a peptide, or a scaffold domain, that interacts with, e.g., binds to and/or inhibits IL-13, in particular, mammalian IL-13, e.g., human or nonhuman primate IL-13. The antibody molecule can be an isolated antibody molecule. In one embodiment, the binding agent is an antagonist, e.g., a binding agent that neutralizes, reduces and/or inhibits one or more IL-13-associated activities, including but not limited to, induction of CD23 expression; production of IgE by human B cells; phosphorylation of a transcription factor, e.g., STAT protein (e.g., STAT6 protein); antigen-induced eosinophilia *in vivo*; antigen-induced bronchoconstriction *in vivo*; or drug-induced airway hyperreactivity in
- 30

13

vivo, among others. For example, the binding agent has a statistically significant effect in one or more assays described herein. Beside anti-IL-13 antibody molecules, other IL-13 binding agents that can be used include IL-13 receptor-Fc fusions, other soluble forms of the IL-13 receptor, soluble forms of IL-4R α , antibodies that bind to IL-13R, and other molecules that inhibit the interaction between IL-13 and one of its receptors.

[0007] In one aspect, the invention features an IL-13 binding agent that binds to IL-13, e.g., with an affinity corresponding to a K_D of less than 5×10^{-7} M, 1×10^{-7} M, 5×10^{-8} , 1×10^{-8} , 5×10^{-9} , 1×10^{-9} M, more typically less than 5×10^{-10} , 1×10^{-10} , 5×10^{-11} M, 1×10^{-11} M, or better. The IL-13 binding agent can be, for example, an antibody molecule that includes first and second immunoglobulin variable domain sequences that include at least a sufficient portion of an immunoglobulin variable domain to form an antigen-binding site that binds to IL-13. Typically, the first and second immunoglobulin variable domain sequences correspond to immunoglobulin variable domain sequences of a heavy and light chain, e.g., a paired or otherwise compatible heavy and light chain.

[0008] In one embodiment, the IL-13 binding agent binds to one or more of the following peptides:

FVKDLLVHLKKLFREGQ₁₃₀FN (SEQ ID NO:1),
FVKDLLVHLKKLFREGR₁₃₀FN (SEQ ID NO:2),
20 FVKDLLLHLKKLFREGQ₁₃₀FN (SEQ ID NO:3),
FVKDLLLHLKKLFREGR₁₃₀FN (SEQ ID NO:4),
FVKDLLVHLKKLFREG (SEQ ID NO:5), and
FVKDLLLHLKKLFREG (SEQ ID NO:6), e.g., as isolated peptides, or to an amino acid within such a peptide when the peptide is folded in the structure of a mature IL-13 protein.

[0009] For example, the IL-13 binding agent can bind to a peptide or to an IL-13 with comparable affinity (e.g., affinities that differ by less than a factor of 8, 5, 4, or 2), regardless of whether R or Q is present at position 130. In particular, the IL-13 binding agent may bind with equal affinity to the peptide or the IL-13 regardless of whether R or Q is present at position 130.

noni
14

[0010] The IL-13 binding agent may bind to one or more of the following peptides:

5 KDLLVHLKKLFREGQFN (SEQ ID NO:7),
KDLLVHLKKLFREGRFN (SEQ ID NO:8),
KDLLLHLKKLFREGQFN (SEQ ID NO:9),
KDLLLHLKKLFREGRFN (SEQ ID NO:10),
KDLLVHLKKLFRE (SEQ ID NO:11),
KDLLLHLKKLFRE (SEQ ID NO:12), and
10 HLKKLFRE (SEQ ID NO:13), e.g., as isolated peptides, or to an amino acid within
such a peptide when the peptide is folded in the structure of a mature IL-13 protein.
The IL-13 binding agent can bind to an epitope on IL-13 that includes at least one (e.g.,
one, two, three or four) amino acid residues from a peptide sequence recited herein
(e.g., in FIG. 1B), or a corresponding peptide which differs by at least one, but no more
than one, two or three amino acid residues, e.g., a corresponding peptide from human
15 IL-13.

[0011] In one embodiment, the IL-13 binding agent contacts (e.g., makes a van
der Waals contact with) an amino acid residue in helix D (amino acid residues 114-130)
of full-length IL-13 (SEQ ID NO:24 or SEQ ID NO:178), e.g., one or more of the
following amino acid residues: residue 116, 117, 118, 122, 123, 124, 125, 126, 127, or
20 128 of SEQ ID NO:24 or SEQ ID NO:178. In one embodiment, the IL-13 binding
agent binds to an epitope on helix D, or an epitope that includes at least one amino acid
residue (e.g., at least one, two, three, or four) on helix D, and/or may inhibit interaction
of IL-13 with one or both of IL-13R α 1 and/or IL-13R α 2. Helix D corresponds to
amino acid residues 95-111 of mature, processed IL-13 (SEQ ID NO:14 or SEQ ID
25 NO:124).

[0012] In one embodiment, the IL-13 binding agent specifically binds to an
epitope, e.g., a linear or a conformational epitope, of IL-13, e.g., mammalian, e.g.,
human IL-13. For example, the IL-13 binding agent competes with MJ 2-7 and/or C65
for binding to IL-13, e.g., to human IL-13. The IL-13 binding agent may competitively
30 inhibit binding of MJ 2-7 and/or C65 to IL-13. The IL-13 binding agent may
specifically bind at least one amino acid in an epitope defined by MJ 2-7 binding to
human IL-13 or an epitope defined by C65 binding to human IL-13. In one

embodiment, the IL-13 binding agent may bind to an epitope that overlaps with that of MJ 2-7 or C65, e.g., includes at least one, two, three, or four amino acids in common, or an epitope that, when bound, sterically prevents interaction with MJ 2-7 or C65.

[0013] In still another embodiment, the IL-13 binding agent specifically binds
 5 at least one amino acid in an epitope defined by IL-13R α 1 binding to human IL-13 or an epitope defined by IL-13R α 2 binding to human IL-13, or an epitope that overlaps with such epitopes. The IL-13 binding agent may compete with IL-13R α 1 and/or IL-13R α 2 for binding to IL-13, e.g., to human IL-13. The IL-13 binding agent may competitively inhibit binding of IL-13R α 1 and/or IL-13R α 2 to IL-13. The IL-13
 10 binding agent may interact with an epitope on IL-13 which, when bound, sterically prevents interaction with IL-13R α 1 and/or IL-13R α 2.

[0014] In one embodiment, the IL-13 binding agent has a functional activity comparable to IL-13R α 2, e.g., the IL-13 binding agent reduces or inhibits IL-13 interaction with IL-13R α 1. The IL-13 binding agent may prevent formation of a
 15 complex between IL-13 and IL-13R α 1 or disrupt or destabilize a complex between IL-13 and IL-13R α 1. In one embodiment, the IL-13 binding agent inhibits ternary complex formation, e.g., formation of a complex between IL 13, IL-13R α 1 and IL4-R.

[0015] In one embodiment, the IL-13 binding agent can inhibit one or more IL-13-associated activities with an IC₅₀ of about 50 nM to 5 pM, typically about 100 to
 20 250 pM or less, e.g., better inhibition. Agents that inhibit at least one activity of IL-13 are considered IL-13 antagonists. In one embodiment, the IL-13 binding agent can associate with IL-13 with kinetics in the range of 10³ to 10⁸ M⁻¹s⁻¹, typically 10⁴ to 10⁷ M⁻¹s⁻¹. In yet another embodiment, the IL-13 binding agent has dissociation kinetics in the range of 10⁻² to 10⁻⁶ s⁻¹, typically 10⁻³ to 10⁻⁵ s⁻¹. In one embodiment, the
 25 IL-13 binding agent binds to IL-13, e.g., human IL-13, with an affinity and/or kinetics similar (e.g., within a factor 20, 10, or 5) to monoclonal antibody MJ 2-7 or C65, or modified forms thereof, e.g., chimeric forms or humanized forms thereof (e.g., a humanized form described herein). The affinity and binding kinetics of an IL-13 binding agent can be tested using, e.g., biosensor technology (BIAcore™).

[0016] The IL-13 binding agent can be an antibody molecule, e.g., an antigen-binding fragment of an antibody (such as a Fab, F(ab')₂, Fv or a single chain Fv fragment) or an antibody that includes an Fc domain. Typically, an anti-IL-13 antibody molecule is monoclonal or a mono-specific.

5 [0017] The IL-13 binding agent, particularly an anti-IL-13 antibody molecule, can be an effectively human, human, humanized, CDR-grafted, chimeric, mutated, affinity matured, deimmunized, synthetic or otherwise in vitro-generated protein. In one embodiment, the IL-13 binding agent is a humanized antibody. In one
10 embodiment, the IL-13 binding agent is not antigenic in humans or does not cause a HAMA response.

[0018] In one embodiment, the IL-13 antibody molecule includes a heavy and light chain. The heavy and light chains of an anti-IL-13 antibody molecule can be substantially full-length (e.g., an antibody molecule can include at least one, and preferably two heavy chains, and at least one, and preferably two light chains) or can
15 include an antigen-binding fragment (e.g., a Fab, F(ab')₂, Fv or a single chain Fv fragment). In yet other embodiments, the antibody molecule has a heavy chain constant region chosen from, e.g., the heavy chain constant regions of IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD, and IgE; particularly, chosen from, e.g., the heavy chain constant regions of IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4, more particularly, the heavy
20 chain constant regions IgG1 (e.g., human IgG1). Typically the heavy chain constant region is human or a modified form of a human constant region (e.g., as described in Example 5). In another embodiment, the antibody molecule has a light chain constant region chosen from, e.g., the light chain constant regions of kappa or lambda, preferably kappa (e.g., human kappa). In one embodiment, the constant region is
25 altered, e.g., mutated, to modify the properties of the antibody molecule (e.g., to increase or decrease one or more of: Fc receptor binding, antibody glycosylation, the number of cysteine residues, effector cell function, or complement function). For example, the human IgG1 constant region can be mutated at one or more residues, e.g., one or more of residues 234 and 237, as described in Example 5.

30 [0019] In one embodiment, the IL-13 binding agent (e.g., the anti-IL-13 binding molecule) includes at least one, two and preferably three CDRs from the light or heavy

. n0017
17

chain variable domain of an antibody disclosed herein, e.g., MJ 2-7. For example, the protein includes one or more of the following sequences within a CDR region:

- GFNIKDTYIH (SEQ ID NO:15),
RIDPANDNIKYDPKFQG (SEQ ID NO:16),
5 SEENWYDFFDY (SEQ ID NO:17),
RSSQSIVHSNGNTYLE (SEQ ID NO:18),
KVSNRFS (SEQ ID NO:19), and
FQGSHIPYT (SEQ ID NO:20), or a CDR having an amino acid sequence that differs by no more than 4, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, or 0.5 alterations (e.g., substitutions,
10 insertions or deletions) for every 10 amino acids (e.g., the number of differences being proportional to the CDR length) relative to a sequence listed above, e.g., at least one alteration but not more than two, three, or four per CDR.

[0020] For example, the IL-13 binding agent can include, in the light chain variable domain sequence, at least one, two, or three of the following sequences within
15 a CDR region:

- RSSQSIVHSNGNTYLE (SEQ ID NO:18),
KVSNRFS (SEQ ID NO:19), and
FQGSHIPYT (SEQ ID NO:20), or an amino acid sequence that differs by no more than 4, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, or 0.5 substitutions, insertions or deletions for every 10
20 amino acids relative to a sequence listed above.

[0021] The IL-13 binding agent can include, in the heavy chain variable domain sequence, at least one, two, or three of the following sequences within a CDR region:

- GFNIKDTYIH (SEQ ID NO:15),
RIDPANDNIKYDPKFQG (SEQ ID NO:16), and
25 SEENWYDFFDY (SEQ ID NO:17), or an amino acid sequence that differs by no more than 4, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, or 0.5 substitutions, insertions or deletions for every 10 amino acids relative to a sequence listed above. The heavy chain CDR3 region can be less than 13 or less than 12 amino acids in length, e.g., 11 amino acids in length (either using Chothia or Kabat definitions).

30 [0022] In another example, the IL-13 binding agent can include, in the light chain variable domain sequence, at least one, two, or three of the following sequences

within a CDR region (amino acids in parentheses represent alternatives for a particular position):

- (i) (RK)-S-S-Q-S-(LI)-(KV)-H-S-(ND)-G-N-(TN)-Y-L-(EDNQYAS) (SEQ ID NO:25) or (RK)-S-S-Q-S-(LI)-(KV)-H-S-(ND)-G-N-(TN)-Y-L-E (SEQ ID NO:26), or
 5 (RK)-S-S-Q-S-(LI)-(KV)-H-S-N-G-N-T-Y-L-(EDNQYAS) (SEQ ID NO:21),
 (ii) K-(LVI)-S-(NY)-(RW)-(FD)-S (SEQ ID NO:27), or K-(LV)-S-(NY)-R-F-S (SEQ ID NO:22), and
 (iii) Q-(GSA)-(ST)-(HEQ)-I-P (SEQ ID NO:28), F-Q-(GSA)-(SIT)-(HEQ)-(IL)-P (SEQ ID NO:23), or Q-(GSA)-(ST)-(HEQ)-I-P-Y-T (SEQ ID NO:193), or F-Q-
 10 (GSA)-(SIT)-(HEQ)-(IL)-P-Y-T (SEQ ID NO:29).

[0023] In one preferred embodiment, the IL-13 binding agent includes all six CDR's from MJ 2-7 or closely related CDRs, e.g., CDRs which are identical or which have at least one amino acid alteration, but not more than two, three or four alterations (e.g., substitutions, deletions, or insertions). The IL-13 binding agent can include at
 15 least two, three, four, five, six, or seven IL-13 contacting amino acid residues of MJ 2-7

[0024] In still another example, the IL-13 binding agent includes at least one, two, or three CDR regions that have the same canonical structures and the corresponding CDR regions of MJ 2-7, e.g., at least CDR1 and CDR2 of the heavy and/or light chain variable domains of MJ 2-7.

20 [0025] The IL-13 binding agent can include one of the following sequences:

- DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQS
 PQLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
 FQGSHIPYT (SEQ ID NO:30)
- DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWFQQRPGQS
 25 PRRLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
 FQGSHIPYT (SEQ ID NO:31)
- DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQS
 PQLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
 FQGSHIPYT (SEQ ID NO:32)

- DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQP
PQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
FQGSHIPYT (SEQ ID NO:33)
- 5 ▪ DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQS
PQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
FQGSHIPYT (SEQ ID NO:34)
- DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWLQQRPGQP
PRLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
FQGSHIPYT (SEQ ID NO:35)
- 10 ▪ DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRSSQSIVHSNGNTYLEWYQKPGKA
PKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
FQGSHIPYT (SEQ ID NO:36)
- DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQS
PRRLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
15 FQGSHIPYT (SEQ ID NO:37)
- DVLMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQS
PKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYC
FQGSHIPYT (SEQ ID NO:38)

or a sequence that has fewer than eight, seven, six, five, four, three, or two alterations
20 (e.g., substitutions, insertions or deletions, e.g., conservative substitutions or a
substitution for an amino acid residue at a corresponding position in MJ 2-7).
Exemplary substitutions are at one of the following Kabat positions: 2, 4, 6, 35, 36, 38,
44, 47, 49, 62, 64-69, 85, 87, 98, 99, 101, and 102. The substitutions can, for example,
substitute an amino acid at a corresponding position from MJ 2-7 into a human
25 framework region.

[0026] The IL-13 binding agent may also include one of the following
sequences:

- DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAIS - (RK) - S - S - Q - S - (LI) - (KV) -
H - S - (ND) - G - N - (TN) - Y - L - (EDNQYAS) WYLQKPGQSPQLLIYK -
30 (LVI) - S - (NY) - (RW) - (FD) -
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC F - Q - (GSA) -
(SIT) - (HEQ) - (IL) - P (SEQ 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 (SEQ 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 (SEQ 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 (SEQ ID NO:42)
- 20 ▪ DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISIC (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 (SEQ ID NO:43)
- 25 ▪ 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 (SEQ ID NO:44)
- 30 ▪ DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (RK) -S-S-Q-S- (LI) - (KV) -H-
S- (ND) -G-N- (TN) -Y-L- (EDNQYAS) WYQKPGKAPKLLIYK-
(LVI) -S- (NY) - (RW) - (FD) -
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCF-Q- (GSA) -
(SIT) - (HEQ) - (IL) -P (SEQ ID NO:45)
- 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 (SEQ ID NO:46)

or a sequence that has fewer than eight, seven, six, five, four, three, or two alterations
(e.g., substitutions, insertions or deletions, e.g., conservative substitutions or a
5 substitution for an amino acid residue at a corresponding position in MJ 2-7) in the
framework region. Exemplary substitutions are at one or more of the following Kabat
positions: 2, 4, 6, 35, 36, 38, 44, 47, 49, 62, 64-69, 85, 87, 98, 99, 101, and 102. The
substitutions can, for example, substitute an amino acid at a corresponding position
from MJ 2-7 into a human framework region. The sequences may also be followed by
10 the dipeptide Tyr-Thr. The FR4 region can include, e.g., the sequence
FGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:47).

[0027] In another example, the IL-13 binding agent can include, in the heavy
chain variable domain sequence, at least one, two, or three of the following sequences
within a CDR region (amino acids in parentheses represent alternatives for a particular
15 position):

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

20 [0028] The IL-13 binding agent can include one of the following sequences:

- QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIHWVRQAPGQGLEWM
GRIDPANDNIKYDPKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSLRSDDTAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEQ ID NO:50)
- QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIHWVRQAPGQRLEWM
25 GRIDPANDNIKYDPKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEQ ID NO:51)
- QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIHWVRQATGQGLEWM
GRIDPANDNIKYDPKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEQ ID NO:52)
- QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIHWVRQAPGQGLEWM
30 GRIDPANDNIKYDPKFQGRVTMTTDTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEQ ID NO:53)

- QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWM
GRIDPANDNIKYDPKFQGRVTMTEDTSTDYAYMELSSLRSEDYAVYYC
ATSEENWYDFFDY (SEQ ID NO:54)
- 5 ▪ QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDTYIHWVRQAPGQALEWM
GRIDPANDNIKYDPKFQGRVTITRDRSMSTAYMELSSLRSEDYAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEQ ID NO:55)
- QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIHWVRQAPGQGLEWM
GRIDPANDNIKYDPKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDYAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEQ ID NO:56)
- 10 ▪ QMQLVQSGPEVKKPGTTSVKVSCKASGFNIKDTYIHWVRQARGQRLEWI
GRIDPANDNIKYDPKFQGRVTITRDMSTSTAYMELSSLRSEDYAVYYC
AASEENWYDFFDY (SEQ ID NO:57)
- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
ARIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDYAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEQ ID NO:58)
- 15 ▪ EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
SRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDYAVYYC
AKDSEENWYDFFDY (SEQ ID NO:59)
- QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWIRQAPGKGLEWV
SRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDYAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEQ ID NO:60)
- 20 ▪ EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
GRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDYAVYYC
TTSEENWYDFFDY (SEQ ID NO:61)
- 25 ▪ EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
SRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDYAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEQ ID NO:62)
- EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
SRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDYAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEQ ID NO:63)
- 30 ▪ EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
SRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDYAVYYC
AKSEENWYDFFDY (SEQ ID NO:64)

WO 2006/085938

PCT/US2005/021454

- 5

▪ QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
ARIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
AKSEENWYDFFDY (SEQ ID NO:65)
- 5

▪ QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
ARIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEQ ID NO:66)
- 10

▪ EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
SRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDN SKNSLYLQMNSLRTEDTALYYC
AKDSEENWYDFFDY (SEQ ID NO:67)
- 10

▪ EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
SRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRDED TAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEQ ID NO:68)
- 15

▪ EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFNIKDTYIHWFRQAPGKGLEWV
GRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDN GSKSIAYLQMNSLKTED TAVYYC
TRSEENWYDFFDY (SEQ ID NO:69)
- 15

▪ EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEYV
SRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDMAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEQ ID NO:70)
- 20

▪ EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWI
GRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAED TAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEQ ID NO:71)
- 20

▪ EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
ARIDPANDNIKYDPKFQGKATISRDN AKNSLYLQMNSLRAED TAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEQ ID NO:72)
- 25

▪ EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
ARIDPANDNIKYDPKFQGRFTISADN AKNSLYLQMNSLRAED TAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEQ ID NO:73)
- 25

▪ EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
GRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAED TAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEQ ID NO:74)
- 30

▪ EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
ARIDPANDNIKYDPKFQGKATISADN AKNSLYLQMNSLRAED TAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEQ ID NO:75)

- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWI
GRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISADNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEQ ID NO:76)
- 5 ▪ EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
GRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISADNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEQ ID NO:77)
- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
ARIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDNKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEQ ID NO:78)
- 10 ▪ EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
GRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISADNAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEQ ID NO:79)
- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWI
GRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISADNAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYC
15 ARSEENWYDFFDY (SEQ ID NO:80)
- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTGSGFNIDTYIHWVRQAPGKGLEWI
GRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISADNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEQ ID NO:81)
- EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIDTYIHWVKQRPEQGLEWI
20 GRIDPANDNIKYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLNSLTSEDVAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEQ ID NO:82)

or a sequence that has fewer than eight, seven, six, five, four, three, or two alterations (e.g., substitutions, insertions or deletions, e.g., conservative substitutions or a substitution for an amino acid residue at a corresponding position in MJ 2-7).

- 25 Exemplary substitutions are at one or more of the following Kabat positions: 2, 4, 6, 25, 36, 37, 39, 47, 48, 93, 94, 103, 104, 106, and 107. Exemplary substitutions can also be at one or more of the following positions (accordingly to sequential numbering): 48, 49, 67, 68, 72, and 79. The substitutions can, for example, substitute an amino acid at a corresponding position from MJ 2-7 into a human framework region. In one
- 30 embodiment, the sequence includes (accordingly to sequential numbering) one or more of the following: Ile at 48, Gly at 49, Lys at 67, Ala at 68, Ala at 72, and Ala at 79; preferably, e.g., Ile at 48, Gly at 49, Ala at 72, and Ala at 79.

[0029] Further, the frameworks of the heavy chain variable domain sequence can include: (i) at a position corresponding to 49, Gly; (ii) at a position corresponding to 72, Ala; (iii) at positions corresponding to 48, Ile, and to 49, Gly; (iv) at positions corresponding to 48, Ile, to 49, Gly, and to 72, Ala; (v) at positions corresponding to 5 67, Lys, to 68, Ala, and to 72, Ala; and/or (vi) at positions corresponding to 48, Ile, to 49, Gly, to 72, Ala, to 79, Ala.

[0030] The IL-13 binding agent may also include one of the following sequences:

- 10 ▪ 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 -
GRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCAR SEENWYDFFDY
(SEQ ID NO: 83)
- 15 ▪ QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG- (YF) - (NT) - I - K - D - T - Y -
(MI) - H, WVRQAPGQRLEWMG (WR) - I - D - P - (GA) - N - D - N - I - K -
Y - (SD) - (PQ) - K - F - Q -
GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR SEENWYDFFDY
(SEQ ID NO: 84)
- 20 ▪ 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
(SEQ ID NO: 85)
- 25 ▪ 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 -
GRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR SEENWYDFFDY
(SEQ ID NO: 86)
- 30 ▪ 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 -

GRVTMTEDTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCAT SEENWYDFFDY
(SEQ ID NO:87)

5 QMQLVQSGAEVKKTGSSVKV SCKASG- (YF) - (NT) - I-K-D-T-Y-
(MI) -H, WVRQAPGQALEWMG (WR) - I-D-P- (GA) -N-D-N-I-K-
Y- (SD) - (PQ) -K-F-Q-
GRVTITRDRSMSTAYMELSSLRSED TAMYICAR SEENWYDFFDY
(SEQ ID NO:88)

10 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-
GRVTIMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAR SEENWYDFFDY
(SEQ ID NO:89)

15 QMQLVQSGPEVKKPGT SVKV SCKASG- (YF) - (NT) - I-K-D-T-Y-
(MI) -H, WVRQARGQRLEWIG (WR) - I-D-P- (GA) -N-D-N-I-K-
Y- (SD) - (PQ) -K-F-Q-
GRVTITRDMSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAA SEENWYDFFDY
(SEQ ID NO:90)

20 EVQLVESGGGLVQP GGSRLRLSCAASG- (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 AKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCAR SEENWYDFFDY
(SEQ ID NO:91)

25 EVQLVESGGGLVQP GRSLRLSCAASG- (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 TALYYCAK DSEENWYDFFDY
(SEQ ID NO:92)

30 QVQLVESGGGLVKP GGSRLRLSCAASG- (YF) - (NT) - I-K-D-T-Y-
(MI) -H, WIRQAPGKGLEWVS (WR) - I-D-P- (GA) -N-D-N-I-K-
Y- (SD) - (PQ) -K-F-Q-
GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCAR SEENWYDFFDY
(SEQ ID NO:93)

- 5

▪ EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG- (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-
 GRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT SEENWYDFFDY
 (SEQ ID NO:94)
- 10

▪ EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASG- (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-
 GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYHCAR SEENWYDFFDY
 (SEQ ID NO:95)
- 15

▪ EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG- (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-
 GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR SEENWYDFFDY
 (SEQ ID NO:96)
- 20

▪ EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG- (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-
 GRFTISRDNASKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK SEENWYDFFDY
 (SEQ ID NO:97)
- 25

▪ QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG- (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-
 GRFTISRDNASKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK SEENWYDFFDY
 (SEQ ID NO:98)
- 30

▪ QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG- (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-
 GRFTISRDNASKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR SEENWYDFFDY
 (SEQ ID NO:99)
- 30

▪ EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASG- (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-

WO 2006/085938

PCT/US2005/021454

GRFTISRDN SKNSLYLQMNSLR TEDTALYYCAK DSEENWYDFFDY
(SEQ ID NO:100)

- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS 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 -

5

GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLR DEDTAVYYCAR SEENWYDFFDY
(SEQ ID NO:101)

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

10

GRFTISR DGS KSIAYLQMNSLR KTEDTAVYYCTR SEENWYDFFDY
(SEQ ID NO:102)

- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS 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 -

15

GRFTISRDN SKNTLYLQMGSLRAEDMAVYYCAR SEENWYDFFDY
(SEQ 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 -

20

GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAR SEENWYDFFDY
(SEQ 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 -

25

GKATISRDN AKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAR SEENWYDFFDY
(SEQ 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 -

30

GRFTISADN AKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAR SEENWYDFFDY
(SEQ ID NO:106)

- 5

▪ 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 -
 GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR SEENWYDFFDY
 (SEQ ID NO:107)
- 10

▪ 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 -
 GKATISADNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR SEENWYDFFDY
 (SEQ ID NO:108)
- 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 -
 GRFTISADNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR SEENWYDFFDY
 (SEQ ID NO:109)
- 20

▪ 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
 (SEQ ID NO:110)
- 25

▪ 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 -
 GRFTISRDNAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR SEENWYDFFDY
 (SEQ ID NO:111)
- 30

▪ 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
 (SEQ ID NO:112)
- 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
(SEQ ID NO:113)

- 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
(SEQ ID NO:114)

- 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
(SEQ ID NO:115)

or a sequence that has fewer than eight, seven, six, five, four, three, or two alterations (e.g., substitutions, insertions or deletions, e.g., conservative substitutions or a substitution for an amino acid residue at a corresponding position in MJ 2-7) in the framework region. Exemplary substitutions are at one or more of the following Kabat positions: 2, 4, 6, 25, 36, 37, 39, 47, 48, 93, 94, 103, 104, 106, and 107. The substitutions can, for example, substitute an amino acid at a corresponding position from MJ 2-7 into a human framework region. The FR4 region can include, e.g., the sequence WGQGTTLVSS (SEQ ID NO:116) or WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:117).

[0031] In one embodiment, the heavy chain variable domain sequence is at least 90, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% identical or identical to the heavy chain variable domain of V2.1, V2.2, V2.3, V2.4, V2.5, V2.6, V2.7, V2.11, or other heavy chain variable domain described herein. In one embodiment, the heavy chain variable domain sequence includes variable domain sequence comprises a sequence encoded by a nucleic acid that hybridizes under high stringency conditions to the complement of a nucleic acid encoding the heavy chain variable domain of V2.1, V2.2, V2.3, V2.4, V2.5, V2.6, V2.7, V2.11, or other heavy chain variable domain described herein. In one embodiment, the light chain variable domain sequence is at least 90, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% identical or identical to the light chain variable domain of V2.11 or other light chain variable domain described herein. In one embodiment, the light chain

variable domain sequence comprises a sequence encoded by a nucleic acid that hybridizes under high stringency conditions to the complement of a nucleic acid encoding the light chain variable domain of V2.11 or other light chain variable domain described herein.

5 [0032] In one embodiment, the heavy chain framework (e.g., FR1, FR2, FR3, individually, or a sequence encompassing FR1, FR2, and FR3, but excluding CDRs) includes an amino acid sequence, which is at least 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% or higher identical to the heavy chain framework of one of the following germline V segment sequences: DP-25, DP-1, DP-12, DP-9, DP-7, DP-31, DP-32, DP-33, DP-
10 58, or DP-54, or another V gene which is compatible with the canonical structure class 1-3 (see, e.g., Chothia et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227:799-817; Tomlinson et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227:776-798). Other frameworks compatible with the canonical structure class 1-3 include frameworks with the one or more of the following residues according to Kabat numbering: Ala, Gly, Thr, or Val at position 26; Gly at position 26; Tyr, Phe,
15 or Gly at position 27; Phe, Val, Ile, or Leu at position 29; Met, Ile, Leu, Val, Thr, Trp, or Ile at position 34; Arg, Thr, Ala, Lys at position 94; Gly, Ser, Asn, or Asp at position 54; and Arg at position 71.

[0033] In one embodiment, the light chain framework (e.g., FR1, FR2, FR3, individually, or a sequence encompassing FR1, FR2, and FR3, but excluding CDRs)
20 includes an amino acid sequence, which is at least 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% or higher identical to the light chain framework of a V κ II subgroup germline sequence or one of the following germline V segment sequences: A17, A1, A18, A2, A19/A3, or A23 or another V gene which is compatible with the canonical structure class 4-1 (see, e.g., Tomlinson et al. (1995) *EMBO J.* 14:4628). Other frameworks
25 compatible with the canonical structure class 4-1 include frameworks with the one or more of the following residues according to Kabat numbering: Val or Leu or Ile at position 2; Ser or Pro at position 25; Ile or Leu at position 29; Gly at position 31d; Phe or Leu at position 33; and Phe at position 71.

[0034] In another embodiment, the light chain framework (e.g., FR1, FR2, FR3,
30 individually, or a sequence encompassing FR1, FR2, and FR3, but excluding CDRs) includes an amino acid sequence, which is at least 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%,

WO 2006/085938

PCT/US2005/021454

99% or higher identical to the light chain framework of a V κ I subgroup germline sequence, e.g., a DPK9 sequence.

[0035] In another embodiment, the heavy chain framework (e.g., FR1, FR2, FR3, individually, or a sequence encompassing FR1, FR2, and FR3, but excluding
5 CDRs) includes an amino acid sequence, which is at least 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% or higher identical to the light chain framework of a V H I subgroup germline sequence, e.g., a DP-25 sequence or a V H III subgroup germline sequence, e.g., a DP-54 sequence.

[0036] In one embodiment, the IL-13 binding agent includes at least one, two
10 and preferably three CDR's from the light or heavy chain variable domain of an antibody disclosed herein, e.g., C65. For example, the IL-13 binding agent includes one or more of the following sequences within a CDR region:

QASQGTSINLN (SEQ ID NO:118),
GASNLED (SEQ ID NO:119), and
15 LQHSYLPWT (SEQ ID NO:120)
GFSLTGYGVN (SEQ ID NO:121),
IIWGDGSTDYNSAL (SEQ ID NO:122), and
DKTFYYDGFYRGRMDY (SEQ ID NO:123), or a CDR having an amino acid
sequence that differs by no more than 4, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, or 0.5 substitutions, insertions
20 or deletions for every 10 amino acids (e.g., the number of differences being
proportional to the CDR length) relative to a sequence listed above, e.g., at least one
alteration but not more than two, three, or four per CDR. For example, the protein can
include, in the light chain variable domain sequence, at least one, two, or three of the
following sequences within a CDR region:

25 QASQGTSINLN (SEQ ID NO:118),
GASNLED (SEQ ID NO:119), and
LQHSYLPWT (SEQ ID NO:120), or an amino acid sequence that differs by no
more than 4, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, or 0.5 substitutions, insertions or deletions for every 10
amino acids relative to a sequence listed above.

30 [0037] The IL-13 binding agent can include, in the heavy chain variable domain
sequence, at least one, two, or three of the following sequences within a CDR region:

GFSLTGYGVN (SEQ ID NO:121),
 IIWGDGSTDYNSAL (SEQ ID NO:122), and
 DKTFYYDGFYRGRMDY (SEQ ID NO:123), or an amino acid sequence that
 differs by no more than 4, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, or 0.5 substitutions, insertions or deletions
 5 for every 10 amino acids relative to a sequence listed above.

[0038] In one preferred embodiment, the IL-13 binding agent includes all six
 CDRs from C65 or closely related CDRs, e.g., CDRs which are identical or which have
 at least one amino acid alteration, but not more than two, three or four alterations (e.g.,
 substitutions, deletions, or insertions).

10 [0039] In still another embodiment, the IL-13 binding agent includes at least
 one, two or three CDR regions that have the same canonical structures and the
 corresponding CDR regions of C65, e.g., at least CDR1 and CDR2 of the heavy and/or
 light chain variable domains of C65.

[0040] In one embodiment, the heavy chain framework (e.g., FR1, FR2, FR3,
 15 individually, or a sequence encompassing FR1, FR2, and FR3, but excluding CDRs)
 includes an amino acid sequence, which is at least 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%,
 99% or higher identical to the heavy chain framework of one of the following germline
 V segment sequences: DP-71 or DP-67 or another V gene which is compatible with the
 canonical structure class of C65 (see, e.g., Chothia et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227:799-
 20 817; Tomlinson et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227:776-798).

[0041] In one embodiment, the light chain framework (e.g., FR1, FR2, FR3,
 individually, or a sequence encompassing FR1, FR2, and FR3, but excluding CDRs)
 includes an amino acid sequence, which is at least 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%,
 99% or higher identical to the light chain framework of DPK-1 or DPK-9 germline
 25 sequence or another V gene which is compatible with the canonical structure class of
 C65 (see, e.g., Tomlinson et al. (1995) *EMBO J.* 14:4628).

[0042] In another embodiment, the light chain framework (e.g., FR1, FR2, FR3,
 individually, or a sequence encompassing FR1, FR2, and FR3, but excluding CDRs)
 includes an amino acid sequence, which is at least 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%,

99% or higher identical to the light chain framework of a V κ I subgroup germline sequence, e.g., a DPK-9 or DPK-1 sequence.

[0043] In another embodiment, the heavy chain framework (e.g., FR1, FR2, FR3, individually, or a sequence encompassing FR1, FR2, and FR3, but excluding
5 CDRs) includes an amino acid sequence, which is at least 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% or higher identical to the light chain framework of a VH IV subgroup germline sequence, e.g., a DP-71 or DP-67 sequence.

[0044] In one embodiment, the light or the heavy chain variable framework (e.g., the region encompassing at least FR1, FR2, FR3, and optionally FR4) can be
10 chosen from: (a) a light or heavy chain variable framework including at least 80%, 85%, 90%, 95%, or 100% of the amino acid residues from a human light or heavy chain variable framework, e.g., a light or heavy chain variable framework residue from a human mature antibody, a human germline sequence, a human consensus sequence, or a human antibody described herein; (b) a light or heavy chain variable framework
15 including from 20% to 80%, 40% to 60%, 60% to 90%, or 70% to 95% of the amino acid residues from a human light or heavy chain variable framework, e.g., a light or heavy chain variable framework residue from a human mature antibody, a human germline sequence, a human consensus sequence; (c) a non-human framework (e.g., a rodent framework); or (d) a non-human framework that has been modified, e.g., to
20 remove antigenic or cytotoxic determinants, e.g., deimmunized, or partially humanized. In one embodiment, the heavy chain variable domain sequence includes human residues or human consensus sequence residues at one or more of the following positions (preferably at least five, ten, twelve, or all): (in the FR of the variable domain of the light chain) 4L, 35L, 36L, 38L, 43L, 44L, 58L, 46L, 62L, 63L, 64L, 65L, 66L,
25 67L, 68L, 69L, 70L, 71L, 73L, 85L, 87L, 98L, and/or (in the FR of the variable domain of the heavy chain) 2H, 4H, 24H, 36H, 37H, 39H, 43H, 45H, 49H, 58H, 60H, 67H, 68H, 69H, 70H, 73H, 74H, 75H, 78H, 91H, 92H, 93H, and/or 103H (according to the Kabat numbering).

[0045] In one embodiment, the IL-13 binding agent includes at least one non-
30 human CDR, e.g., a murine CDR, e.g., a CDR from MJ 2-7 or C65, or a mutant thereof, and at least one framework which differs from a framework of MJ 2-7 or C65 by at

least one amino acid, e.g., at least 5, 8, 10, 12, 15, or 18 amino acids. For example, the proteins include one, two, three, four, five, or six such non-human CDRs and includes at least one amino acid difference in at least three of HC FR1, HC FR2, HC FR3, LC FR1, LC FR2, and LC FR3.

5 [0046] In one embodiment, the heavy or light chain variable domain sequence of the anti-IL-13 antibody molecule includes an amino acid sequence, which is at least 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% or higher identical to a variable domain sequence of an antibody described herein, e.g., MJ 2-7 or C65; or which differs at at least 1 or 5 residues, but less than 40, 30, 20, or 10 residues, from a variable domain
10 sequence of an antibody described herein, e.g., MJ 2-7 or C65. In one embodiment, the heavy or light chain variable domain sequence of the protein includes an amino acid sequence encoded by a nucleic acid sequence described herein or a nucleic acid that hybridizes to a nucleic acid sequence described herein or its complement, e.g., under low stringency, medium stringency, high stringency, or very high stringency
15 conditions.

[0047] In one embodiment, one or both of the variable domain sequences include amino acid positions in the framework region that are variously derived from both a non-human antibody (e.g., a murine antibody such as mAb13.2) and a human antibody or germline sequence. For example, a variable domain sequence can include a
20 number of positions at which the amino acid residue is identical to both the non-human antibody and the human antibody (or human germline sequence) because the two are identical at that position. Of the remaining framework positions where the non-human and human differ, at least 50, 60, 70, 80, or 90% of the positions of the variable domain are preferably identical to the human antibody (or human germline sequence) rather
25 than the non-human. For example, none, or at least one, two, three, or four of such remaining framework position may be identical to the non-human antibody rather than to the human. For example, in HC FR1, one or two such positions can be non-human; in HC FR2, one or two such positions can be non-human; in FR3, one, two, three, or four such positions can be non-human; in LC FR1, one, two, three, or four such
30 positions can be non-human; in LC FR2, one or two such positions can be non-human; in LC FR3, one or two such positions can be non-human. The frameworks can include additional non-human positions.

[0048] The IL-13 binding agent, e.g., anti-IL-13 antibody molecule, can be derivatized or linked to another functional molecule, e.g., another peptide or protein (e.g., an Fab fragment). For example, the binding agent can be functionally linked (e.g., by chemical coupling, genetic fusion, noncovalent association or otherwise) to one or more other molecular entities, such as another antibody molecule (e.g., to form a bispecific or a multispecific antibody molecule), toxins, radioisotopes, cytotoxic or cytostatic agents, among others.

[0049] In another embodiment, the IL-13 binding agent, e.g., anti-IL-13 antibody molecule, interferes with the interaction of IL-13 with the receptor IL-13R α 1. In one embodiment, the IL-13 binding agent can interfere with the interaction of Phe107 of IL-13 (SEQ ID NO:124; FIG. 13A) with a hydrophobic pocket of IL-13R α 1 formed by the side chains of residues Leu319, Cys257, Arg256, and Cys320 (SEQ ID NO:125; FIG. 13B), e.g., by direct binding to these residues or steric hindrance. In another embodiment, the IL-13 binding agent can interfere with van der Waals interactions between amino acid residues Ile254, Ser255, Arg256, Lys318, Cys320, and Tyr321 of IL-13R α 1 (SEQ ID NO:125) and amino acid residues Arg11, Glu12, Leu13, Ile14, Glu15, Lys104, Lys105, Leu106, Phe107, and Arg108 of IL-13 (SEQ ID NO:124), e.g., by direct binding to these residues or steric hindrance.

[0050] In one embodiment, the IL-13 binding agent, e.g., the anti-IL-13 antibody, molecule has no significant cross-reactivity when screened against at least half, two-thirds, three-quarter, 90%, or all the tissues on the "suggested list of human tissues to be used for immunohistochemical investigations of cross-reactivity" in Annex II of the DC CPMP Guideline III/5271/94 Draft 5, "Production and quality control of monoclonal antibodies" and at least half, two-thirds, three-quarter, 90%, or all of the tissues recommended in Table 2 of the 1997 US FDA/CBER "Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use."

[0051] In one embodiment, the IL-13 binding agent, e.g., the anti-IL-13 antibody, specifically binds to IL-13, e.g., a mammalian IL-13, e.g., human or non-human primate IL-13. For example, the binding agent binds to IL-13 with an affinity that is at least two-fold, 10-fold, 50-fold, 100-fold, or better (smaller K_d) than its affinity for binding to a non-specific antigen (e.g., BSA, casein) other than IL-13, or

37
000237

with an affinity that is at least two-fold, 10-fold, 50-fold, 100-fold, or better (smaller K_d) than its affinity for binding to another human interleukin other than IL-13. In some embodiments, the IL-13 binding agent only detects a single prominent band when blotted against the crude sample of human IL-13 described in Example 1 ("Quaternary
5 Screen"). In some embodiments, a precipitate made by pulling down proteins from that crude sample using beads to which the IL-13 binding agent is immobilized is a composition in which IL-13 is at least 5%, 10%, 50%, or 80% pure.

[0052] In another aspect, an IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, or a pharmaceutical composition thereof, is administered to treat or prevent
10 an IL-13-associated disorder. Treating refers to improving or maintaining (or so attempting) the condition of subject. In a typical case, treating improves the condition of the subject to an extent discernable to a physician or prevents worsening of the condition. Examples of IL-13-associated disorders include, but are not limited to, disorders chosen from one or more of: respiratory disorders, e.g., asthma (e.g., allergic
15 and nonallergic asthma (e.g., asthma due to infection with, e.g., respiratory syncytial virus (RSV), e.g., in younger children)), chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and other conditions involving airway inflammation, eosinophilia, fibrosis and excess mucus production, e.g., cystic fibrosis and pulmonary fibrosis; atopic disorders, e.g., resulting from an increased sensitivity to IL-13, (e.g., atopic dermatitis,
20 urticaria, eczema, allergic rhinitis, and allergic enterogastritis); inflammatory and/or autoimmune conditions of, the skin (e.g., atopic dermatitis), gastrointestinal disorders (e.g., inflammatory bowel diseases (IBD), such as ulcerative colitis and/or Crohn's disease), liver (e.g., cirrhosis, hepatocellular carcinoma), and scleroderma; tumors or cancers (e.g., soft tissue or solid tumors), such as leukemia, glioblastoma, and
25 lymphoma, e.g., Hodgkin's lymphoma; viral infections (e.g., from HTLV-1); fibrosis of other organs, e.g., fibrosis of the liver, (e.g., fibrosis caused by a hepatitis B and/or C virus); and suppression of expression of protective type 1 immune responses, (e.g., during vaccination), e.g., as described herein.

[0053] The IL-13 binding agent (e.g., the anti-IL-13 antibody molecule, such as
30 one described herein) can be administered in an amount effective to treat or prevent the disorder. In the case of prophylactic use (e.g., to prevent onset or delay onset), the subject may or may not have one or more symptoms of the disorder. The amount can

also be selected to be effective to ameliorate at least one symptom of the disorder. Preferably, the subject is a mammal, e.g., a human suffering from an IL-13-associated disorder as described herein. For respiratory disorders, e.g., asthma, the IL-13 binding agent can be delivered by inhalation.

5 [0054] In one embodiment, the method includes administering doses of an antibody molecule that binds to IL-13. For example, the antibody molecule inhibits or neutralizes IL-13. In one embodiment, each dose is administered subcutaneously, e.g., in an amount of about 0.5-10 mg/kg (e.g., 0.7-3.3 mg/kg) at a frequency of no more than once per week, e.g., every other week or once or twice monthly. In one
10 embodiment, the antibody is an antibody described herein. For example, the antibody is an antibody that inhibits binding of IL-13R α 1. The antibody can, e.g., confers a post-injection protective effect against exposure to *Ascaris* antigen in a sheep model at least 6 weeks after injection.

[0055] In one embodiment, the IL-13 binding agent is administered in
15 combination with another therapeutic agent. The combination therapy can include an IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, coformulated with and/or coadministered with one or more additional therapeutic agents, e.g., one or more cytokine and growth factor inhibitors, immunosuppressants, anti-inflammatory agents (e.g., systemic anti-inflammatory agents), metabolic inhibitors, enzyme inhibitors,
20 and/or cytotoxic or cytostatic agents, as described in more herein. The IL-13 binding agent and the other therapeutic can also be administered separately.

[0056] Examples of preferred additional therapeutic agents that can be coadministered and/or coformulated with an IL-13 binding agent include: inhaled steroids; beta-agonists, e.g., short-acting or long-acting beta-agonists; antagonists of
25 leukotrienes or leukotriene receptors; combination drugs such as ADVAIR[®]; IgE inhibitors, e.g., anti-IgE antibodies (e.g., XOLAIR[®]); phosphodiesterase inhibitors (e.g., PDE4 inhibitors); xanthines; anticholinergic drugs; mast cell-stabilizing agents such as cromolyn; IL-4 inhibitors; IL-5 inhibitors; eotaxin/CCR3 inhibitors; and antihistamines. Such combinations can be used to treat asthma and other respiratory
30 disorders. Additional examples of therapeutic agents that can be coadministered and/or coformulated with an IL-13 binding agent include one or more of: TNF antagonists

39
u 00022

(e.g., a soluble fragment of a TNF receptor, e.g., p55 or p75 human TNF receptor or derivatives thereof, e.g., 75 kD TNFR-IgG (75 kD TNF receptor-IgG fusion protein, ENBREL™)); TNF enzyme antagonists, e.g., TNF α converting enzyme (TACE) inhibitors; muscarinic receptor antagonists; TGF- β antagonists; interferon gamma; 5 perfenidone; chemotherapeutic agents, e.g., methotrexate, leflunomide, or a sirolimus (rapamycin) or an analog thereof, e.g., CCI-779; COX2 and cPLA2 inhibitors; NSAIDs; immunomodulators; p38 inhibitors, TPL-2, M κ -2 and NF κ B inhibitors, among others.

[0057] In another aspect, this application provides compositions, e.g., 10 pharmaceutical compositions, that include a pharmaceutically acceptable carrier and at least one IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule. In one embodiment, the compositions, e.g., pharmaceutical compositions, comprise a combination of two or more IL-13 binding agents, e.g., two or more anti-IL-13 antibody molecules. Combinations of the IL-13 binding agent, e.g., the anti-IL-13 15 antibody molecule, and a drug, e.g., a therapeutic agent (e.g., one or more cytokine and growth factor inhibitors, immunosuppressants, anti-inflammatory agents (e.g., systemic anti-inflammatory agents), metabolic inhibitors, enzyme inhibitors, and/or cytotoxic or cytostatic agents, as described herein, can also be used.

[0058] This application also features nucleic acids that include nucleotide 20 sequences that encode an IL-13 binding agent described herein or a component thereof, e.g., a heavy and/or light chain variable domain sequence of an anti-IL-13 antibody molecule, e.g., an antibody molecule described herein. For example, the application features a first and second nucleic acid encoding heavy and light chain variable domain sequences, respectively, of an anti-IL-13 antibody chosen from one or more of, e.g., 25 MJ 2-7 or C65, e.g., as described herein. In another aspect, the application features host cells and vectors containing the nucleic acids described herein.

[0059] The invention also features the epitope of IL-13, e.g., human IL-13, recognized by one or more of, e.g., MJ 2-7 or C65. For example, proteins and peptides that include the epitope can be used to generate or screen for other binding compounds 30 that interact with the epitope, e.g., proteins such as antibodies or small molecules. For example, a peptide that includes the epitope can be used as an immunogen or as a target

for screening an expression library. It is also possible to evaluate compounds for ability to interact with the peptide, or, by mapping or structure determination, to evaluate compounds for ability to interact with the epitope, e.g., in the context of a mature IL-13.

- 5 [0060] In another aspect, this application features a method of modulating, e.g., interfering with (e.g., inhibiting, blocking or otherwise reducing), an interaction, e.g., binding, between IL-13 and a cognate IL-13 binding protein, e.g., an IL-13 receptor complex, e.g., a complex comprising IL-13R α 1 and IL-4R α , or a subunit thereof. The modulating can be effected *in vivo* or *in vitro*. In other embodiments, the IL-13
- 10 binding agent, e.g., the anti-IL-13 antibody molecule, binds to IL-13, and interferes with (e.g., inhibits, blocks or otherwise reduces) an interaction, e.g., binding, between IL-13 and a subunit of the IL-13 receptor complex, e.g., IL-13R α 1 or IL-4R α , individually. In yet another embodiment, the IL-13 binding agent, e.g., the anti-IL-13 antibody molecule, binds to IL-13, and interferes with (e.g., inhibits, blocks or
- 15 otherwise reduces) an interaction, e.g., binding, between IL-13 and IL-13R α 1. In another embodiment, the IL-13 binding agent, e.g., the anti-IL-13 antibody molecule, binds to IL-13, and interferes with (e.g., inhibits, blocks or otherwise reduces) an interaction, e.g., binding, between IL-13 and IL-13R α 1. Typically, the anti-IL-13 antibody molecule interferes with (e.g., inhibits, blocks or otherwise reduces) an
- 20 interaction, e.g., binding, of IL-13 and IL-13R α 1.

- [0061] In another aspect, this application features a method of modulating interaction between IL-13 and an IL-13 receptor protein, e.g., IL-13R α 1 or IL-13R α 2. For example, an IL-13 binding agent, e.g., an agent described herein, can be used to reduce or inhibit binding, between IL-13 and IL-13R α 1 or IL-13R α 2, or to reduce
- 25 formation of a complex that includes IL-13R α 1 and IL-4R α (e.g., a complex as described herein). The method comprises contacting IL-13 or a complex that contains IL-13 with an IL-13 binding agent, e.g., a protein described herein.

- [0062] The subject methods can be used on cells *in vitro* (e.g., in a cell-free system), in culture, e.g. *in vitro* or *ex vivo*. For example, IL-13 receptor-expressing
- 30 cells can be cultured *in vitro* in culture medium and the contacting step can be effected by adding an IL-13 binding agent to the culture medium. Alternatively, the method can

41
no. 11

be performed on cells present in a subject, e.g., as part of an *in vivo* (e.g., therapeutic or prophylactic) protocol. For example, the IL-13 binding agent can be delivered locally or systemically.

[0063] The method can include contacting IL-13 with the IL-13 receptor complex, or subunit thereof, under conditions that allow an interaction between IL-13 and the IL-13 receptor complex, or subunit thereof, to occur to thereby form an IL-13/IL-13 receptor mixture. Generally, the IL-13 binding agent is provided in an effective amount, e.g., so that contacting the IL-13/IL-13 receptor mixture modulates, e.g., interferes with (e.g., inhibits, blocks or otherwise reduces) the interaction between IL-13 and the receptor protein or at least one function of IL-13, e.g., IL-13 mediated signaling.

[0064] In another aspect, this application provides a method for detecting the presence of IL-13 in a sample *in vitro* (e.g., a biological sample, such as serum, plasma, tissue, biopsy). The subject method can be used to diagnose a disorder, e.g., an immune cell-associated disorder. The method includes: (i) contacting the sample or a control sample with an IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, e.g., as described herein; and (ii) detecting formation of a complex between the IL-13 binding agent and the sample or the control sample, wherein a statistically significant change in the formation of the complex in the sample relative to the control sample is indicative of the presence of the IL-13 in the sample.

[0065] In yet another aspect, this application provides a method for detecting the presence of IL-13 *in vivo* (e.g., *in vivo* imaging in a subject). The subject method can be used to diagnose a disorder, e.g., an IL-13-associated disorder. The method includes: (i) administering an IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, e.g., as described herein, to a subject or a control subject under conditions that allow binding of the binding agent to IL-13; and (ii) detecting formation of a complex between the binding agent and IL-13, wherein a statistically significant change in the formation of the complex in the subject relative to the control subject is indicative of the presence of IL-13.

[0066] For example, the antibody molecule is directly or indirectly labeled with a detectable substance to facilitate detection of the bound or unbound antibody.

Suitable detectable substances include various enzymes, prosthetic groups, fluorescent materials, luminescent materials and radioactive materials.

[0067] Methods for delivering or targeting an agent, e.g., a therapeutic or a cytotoxic agent, to an IL-13-expressing cell *in vivo* are also disclosed.

- 5 [0068] In one aspect, the invention features a polypeptide that comprises the sequence, or a functional fragment thereof:

SPVPPSTALKELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGVYCAALESLINVSGCSA
IEKTQRMINGFCPHKVSAGQFSSLRVRDTKIEVAQFVKDLLVHLKKLFREGQFN (SEQ
ID NO:14)

10

[0069] The polypeptide can further include:

MALLLTMVIALTCLGGFASP (SEQ ID NO:127),

- e.g., as an N-terminal signal sequence. For example, the polypeptide is an IL-13 protein from cynomolgus monkey (herein, "NHP-IL-13"). The, NHP-IL-13 can be a
15 mature IL-13 protein or an unprocessed full length IL-13 protein. Peptides of the above sequence, e.g., peptides that differ from corresponding peptides in human IL-13, can be used, e.g., as an immunogen or target compound.

- [0070] Also featured are related polypeptides that differ from human IL-13 at one or more of the boldfaced positions above but are identical to human IL-13 at the
20 non-boldface positions above. For example, one or more of the boldfaced positions can be an alanine, or a conservative substitution of the corresponding residue in the cynomolgus sequence (above) or the corresponding residue in the human sequence. The invention also features peptides, e.g., of at least 5 or 6 amino acids from the above sequence. The peptides can be included in a heterologous protein (e.g., a protein other
25 than an IL-13), a chimeric protein (e.g., a human IL-13) or can be in an isolated peptide, e.g., one that does not include other sequences. The peptides can also be fused or conjugated to other compounds, e.g., a carrier. In one embodiment, the peptide includes at least one amino acid residue that differs from human IL-13. Exemplary peptides are described below.

- 30 [0071] Also featured are nucleic acids encoding the cynomolgus IL-13 sequence and variants thereof. The polypeptide can be used to provide an IL-13

binding agent that binds the cynomolgus monkey IL-13, and, optionally, also an IL-13 protein from another species, e.g., a human IL-13.

[0072] In one aspect, the invention features a method of providing a target binding molecule that specifically binds to a human target protein. For example, the target binding molecule is an antibody molecule. The method includes: providing a target protein that comprises at least a portion of a non-human protein, the portion being homologous to (at least 70, 75, 80, 85, 87, 90, 92, 94, 95, 96, 97, or 98% identical to) a corresponding portion of a human target protein, but differing by at least one amino acid (e.g., at least one, two, three, four, five, six, seven, eight, or nine amino acids); obtaining a binding agent that specifically binds to the antigen; and evaluating if the binding agent specifically binds to the human target protein or evaluating efficacy of the binding agent in modulating activity of the human target protein. The method can further include administering the binding agent (e.g., an antibody molecule) or a derivative (e.g., a humanized antibody molecule) to a human subject. In one embodiment, the human target protein is a cytokine, e.g., an interleukin, e.g., IL-13 or IL-4. The non-human protein can be from a non-human primate, e.g., a rhesus monkey, a cynomolgus monkey, or a pigtail macaque.

[0073] In one embodiment, the step of obtaining comprises using a protein expression library, e.g., a phage or ribosome display library. For example, the library displays antibody molecules such as Fab's or scFv's. In one embodiment, the step of obtaining comprises immunizing an animal using the antigen as an immunogen. For example, the animal can be a rodent, e.g., a mouse or rat. The animal can be a transgenic animal that has at least one human immunoglobulin gene.

[0074] All publications, patent applications, patents, and other references mentioned herein are incorporated by reference in their entirety.

[0075] Definitions

[0076] The term "IL-13 binding agent," as used herein, refers to any compound, such as a protein (e.g., a multi-chain polypeptide, a polypeptide) or a peptide, that includes an interface that binds to an IL-13 protein, e.g., a mammalian IL-13, particularly a human or non-human primate IL-13. The binding agent generally binds

with a K_d of less than 5×10^{-7} M. An exemplary IL-13 binding agent is a protein that includes an antigen binding site, e.g., an antibody molecule.

[0077] As used herein, the term "antibody molecule" refers to a protein comprising at least one immunoglobulin variable domain sequence. The term antibody molecule includes, for example, full-length, mature antibodies and antigen-binding fragments of an antibody. For example, an antibody molecule can include a heavy (H) chain variable domain sequence (abbreviated herein as VH), and a light (L) chain variable domain sequence (abbreviated herein as VL). In another example, an antibody molecule includes two heavy (H) chain variable domain sequences and two light (L) chain variable domain sequence, thereby forming two antigen binding sites. Examples of antigen-binding fragments include: (i) a Fab fragment, a monovalent fragment consisting of the VL, VH, CL and CH1 domains; (ii) a F(ab')₂ fragment, a bivalent fragment comprising two Fab fragments linked by a disulfide bridge at the hinge region; (iii) a Fd fragment consisting of the VH and CH1 domains; (iv) a Fv fragment consisting of the VL and VH domains of a single arm of an antibody, (v) a dAb fragment, which consists of a VH domain; (vi) a camelid or camelized variable domain; and (vii) a single chain Fv (scFv).

[0078] The VH and VL regions can be further subdivided into regions of hypervariability, termed "complementarity determining regions" (CDR), interspersed with regions that are more conserved, termed "framework regions" (FR). The extent of the framework region and CDRs has been precisely defined by a number of methods (see, 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; and the AbM definition used by Oxford Molecular's AbM antibody modelling software. See, generally, e.g., *Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains*. In: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). Generally, unless specifically indicated, the following definitions are used: AbM definition of CDR1 of the heavy chain variable domain and Kabat definitions for the other CDRs. In addition, embodiments of the invention described with respect to Kabat or AbM CDRs may also be implemented using Chothia hypervariable loops. Each VH and VL typically includes three CDRs and four FRs,

arranged from amino-terminus to carboxy-terminus in the following order: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

[0079] As used herein, an "immunoglobulin variable domain sequence" refers to an amino acid sequence which can form the structure of an immunoglobulin variable domain. For example, the sequence may include all or part of the amino acid sequence of a naturally-occurring variable domain. For example, the sequence may or may not include one, two, or more N- or C-terminal amino acids, or may include other alterations that are compatible with formation of the protein structure.

[0080] The term "antigen-binding site" refers to the part of an IL-13 binding agent that comprises determinants that form an interface that binds to the IL-13, e.g., a mammalian IL-13, e.g., human or non-human primate IL-13, or an epitope thereof. With respect to proteins (or protein mimetics), the antigen-binding site typically includes one or more loops (of at least four amino acids or amino acid mimics) that form an interface that binds to IL-13. Typically, the antigen-binding site of an antibody molecule includes at least one or two CDRs, or more typically at least three, four, five or six CDRs.

[0081] The terms "monoclonal antibody" or "monoclonal antibody composition" as used herein refer to a preparation of antibody molecules of single molecular composition. A monoclonal antibody composition displays a single binding specificity and affinity for a particular epitope. A monoclonal antibody can be made by hybridoma technology or by methods that do not use hybridoma technology (e.g., recombinant methods).

[0082] An "effectively human" protein is a protein that does not evoke a neutralizing antibody response, e.g., the human anti-murine antibody (HAMA) response. HAMA can be problematic in a number of circumstances, e.g., if the antibody molecule is administered repeatedly, e.g., in treatment of a chronic or recurrent disease condition. A HAMA response can make repeated antibody administration potentially ineffective because of an increased antibody clearance from the serum (see, e.g., Saleh et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 32:180-190 (1990)) and also because of potential allergic reactions (see, e.g., LoBuglio et al., *Hybridoma*, 5:5117-5123 (1986)).

[0083] The term "isolated" refers to a molecule that is substantially free of its natural environment. For instance, an isolated protein is substantially free of cellular material or other proteins from the cell or tissue source from which it is derived. The term refers to preparations where the isolated protein is sufficiently pure to be
5 administered as a therapeutic composition, or at least 70% to 80% (w/w) pure, more preferably, at least 80%-90% (w/w) pure, even more preferably, 90-95% pure; and, most preferably, at least 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, or 100% (w/w) pure. A "separated" compound refers to a compound that is removed from at least 90% of at least one component of a sample from which the compound was obtained. Any
10 compound described herein can be provided as an isolated or separated compound.

[0084] An "epitope" refers to the site on a target compound that is bound by a binding agent, e.g., an antibody molecule. An epitope can be a linear or conformational epitope, or a combination thereof. In the case where the target compound is a protein, for example, an epitope may refer to the amino acids that are bound by the binding
15 agent. Overlapping epitopes include at least one common amino acid residue.

[0085] As used herein, the term "hybridizes under low stringency, medium stringency, high stringency, or very high stringency conditions" describes conditions for hybridization and washing. Guidance for performing hybridization reactions can be found in *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989),
20 6.3.1-6.3.6. Aqueous and nonaqueous methods are described in that reference and either can be used. Specific hybridization conditions referred to herein are as follows: 1) low stringency hybridization conditions in 6X sodium chloride/sodium citrate (SSC) at about 45 °C, followed by two washes in 0.2X SSC, 0.1% SDS at least at 50 °C (the temperature of the washes can be increased to 55°C for low stringency conditions); 2)
25 medium stringency hybridization conditions in 6X SSC at about 45 °C, followed by one or more washes in 0.2X SSC, 0.1% SDS at 60°C; 3) high stringency hybridization conditions in 6X SSC at about 45 °C, followed by one or more washes in 0.2X SSC, 0.1% SDS at 65 °C; and preferably 4) very high stringency hybridization conditions are 0.5 M sodium phosphate, 7% SDS at 65 °C, followed by one or more washes at 0.2X
30 SSC, 1% SDS at 65 °C. Very high stringency conditions (4) are the preferred conditions and the ones that are used unless otherwise specified.

47

5 [0087] The term "IL-13" includes the full length unprocessed form of the cytokines known in the art as IL-13 (irrespective of species origin, and including mammalian, e.g., human and non-human primate IL-13) as well as mature, processed forms thereof, as well as any fragment (of at least 5 amino acids) or variant of such cytokines. Positions within the IL-13 sequence can be designated in accordance to the numbering for the full length, unprocessed human IL-13 sequence. For an exemplary full-length monkey IL-13, see SEQ ID NO:24; for mature, processed monkey IL-13, see SEQ ID NO:14; for full-length human IL-13, see SEQ ID NO:178, and for mature, processed human IL-13, see SEQ ID NO:124. An exemplary sequence is recited as follows:

15 MALLLTTVIALTCLGGFASPGPVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVW
SINLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTK
IEVAQFVKDLLLHLKKLFREGRFN (SEQ ID NO:178)

[0088] For example, position 130 is a site of a common polymorphism.

[0089] Exemplary sequences of IL-13 receptor proteins (e.g., IL-13R α 1 and
20 IL-13R α 2) are described, e.g., in Donaldson *et al.* (1998) *J Immunol.* 161:2317-24;
U.S. 6,214,559; U.S. 6,248,714; and U.S. 6,268,480.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0090] FIG. 1A is an alignment of full-length human and cynomolgus monkey IL-13, SEQ ID NO:178 and SEQ ID NO:14, respectively.

25 [0091] FIG. 1B is a list of exemplary peptides from cynomolgus monkey IL-13, (SEQ ID NOs:179-188, respectively).

[0092] FIG. 2 is a graph depicting the neutralization of NHP IL-13 activity by various IL-13 binding agents, as measured by percentage of CD23⁺ monocytes (y-axis).

Concentration of MJ2-7 (Δ), C65 ($\diamond$), and sIL-13R α 2-Fc ($\bullet$) are indicated on the x-axis.

[0093] FIG 3 is a graph depicting the neutralization of NHP IL-13 activity by MJ2-7 (murine; $\bullet$) or humanized MJ2-7 v2.11 ($\circ$). NHP IL-13 activity was measured by phosphorylation of STAT6 (y-axis) as a function of antibody concentration (x-axis).

[0094] FIG 4 is a graph depicting the neutralization of NHP IL-13 activity by MJ2-7 v2.11 ($\circ$) or sIL-13R α 2-Fc ($\blacktriangle$). NHP IL-13 activity was measured by phosphorylation of STAT6 (y-axis) as a function of antagonist concentration (x-axis).

[0095] FIG 5 is a graph depicting the neutralization of NHP IL-13 activity by MJ2-7 (Δ), C65 ($\diamond$), or sIL-13R α 2-Fc ($\bullet$). NHP IL-13 activity was measured by phosphorylation of STAT6 (y-axis) as a function of antagonist concentration (x-axis).

[0096] FIG 6A is a graph depicting induction of tenascin production (y-axis) by native human IL-13 (x-axis).

[0097] FIG 6B is a graph depicting the neutralization of NHP IL-13 activity by MJ2-7, as measured by inhibition of induction of tenascin production (y-axis) as a function of antibody concentration (x-axis).

[0098] FIG 7 is a graph depicting binding of MJ2-7 or control antibodies to NHP-IL-13 bound to sIL-13R α 2-Fc coupled to a SPR chip.

[0099] FIG 8 is a graph depicting binding of varying concentrations (0.09-600 nM) of NHP IL-13 to captured hMJ2-7 V2-11 antibody.

[0100] FIG 9 is a graph depicting the neutralization of NHP IL-13 activity by mouse MJ2-7 ($\bullet$) or humanized Version 1 ($\circ$), Version 2 ($\diamond$), or Version 3 (Δ) antibodies. NHP IL-13 activity was measured by phosphorylation of STAT6 (y-axis) as a function of antibody concentration (x-axis).

[0101] FIG 10 is a graph depicting the neutralization of NHP IL-13 activity by antibodies including mouse MJ2-7 VH and VL ($\bullet$), mouse VH and humanized Version 2 VL (Δ), or Version 2 VH and VL ($\diamond$). NHP IL-13 activity was measured by phosphorylation of STAT6 (y-axis) as a function of antibody concentration (x-axis).

.. 00049
49

[0102] FIGs. 11A and 11B are graphs depicting inhibition of binding of IL-13 to immobilized IL-13 receptor by MJ2-7 antibody, as measured by ELISA. Binding is depicted as absorbance at 450 nm (y-axis). Concentration of MJ2-7 antibody is depicted on the x-axis. FIG. 11A depicts binding to IL-13R α 1. FIG. 11B depicts
5 binding to IL-13R α 2.

[0103] FIG. 12 is an alignment of DPK18 germline amino acid sequence (SEQ ID NO:193) and humanized MJ2-7 Version 3 VL (SEQ ID NO:190).

[0104] FIG. 13A is an amino acid sequence (SEQ ID NO:124) of mature, processed human IL-13.

10 [0105] FIG. 13B is an amino acid sequence (SEQ ID NO:125) of human IL-13R α 1.

DETAILED DESCRIPTION

[0106] Binding agents (e.g., anti-IL13 antibody molecules) that bind specifically to IL-13 and modulate the ability of IL-13 to interact with IL-13 receptors
15 and signaling mediators are disclosed. The agents can be used to modulate (e.g., inhibit) one or more IL-13-associated activities. IL-13 binding agents, e.g., as described herein, can be used to modulate one or more IL-13-associated activities, e.g., in vivo, e.g., to treat or prevent IL-13-mediated disorders (e.g., asthma, airway inflammation, atopic disorders, allergic responses, eosinophilia, fibrosis, and IL-13
20 associated cancers).

[0107] Anti- IL-13 Antibody Molecules

[0108] Numerous methods are available for obtaining antibody molecules. One exemplary method includes screening protein expression libraries, e.g., phage or ribosome display libraries. Phage display is described, for example, in Ladner *et al.*,
25 U.S. Patent 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; and WO 90/02809. In addition to the use of display libraries, other methods can be used to obtain an anti-IL-13 antibody molecule. For example, an IL-13 protein or a peptide thereof can be used as an antigen in a non-human animal, e.g., a rodent, e.g., a
30 mouse, hamster, or rat.

[0109] In one embodiment, the non-human animal includes at least a part of a human immunoglobulin gene. For example, it is possible to engineer mouse strains deficient in mouse antibody production with large fragments of the human Ig loci. Using the hybridoma technology, antigen-specific monoclonal antibodies derived from
5 the genes with the desired specificity may be produced and selected. See, e.g., XENOMOUSE™, Green *et al.* (1994) *Nature Genetics* 7:13-21, US 2003-0070185, WO 96/34096, published Oct. 31, 1996, and PCT Application No. PCT/US96/05928, filed Apr. 29, 1996.

[0110] In another embodiment, a monoclonal antibody is obtained from the
10 non-human animal, and then modified, e.g., humanized or deimmunized. Winter describes an exemplary CDR-grafting method that may be used to prepare the humanized antibodies described herein (U.S. Patent No. 5,225,539). All of the CDRs of a particular human antibody may be replaced with at least a portion of a non-human CDR, or only some of the CDRs may be replaced with non-human CDRs. It is only
15 necessary to replace the number of CDRs required for binding of the humanized antibody to a predetermined antigen.

[0111] Humanized antibodies can be generated by replacing sequences of the Fv variable domain that are not directly involved in antigen binding with equivalent sequences from human Fv variable domains. Exemplary methods for generating
20 humanized antibody molecules are provided by Morrison (1985) *Science* 229:1202-1207; by Oi *et al.* (1986) *BioTechniques* 4:214; and by US 5,585,089; US 5,693,761; US 5,693,762; US 5,859,205; and US 6,407,213. Those methods include isolating, manipulating, and expressing the nucleic acid sequences that encode all or part of immunoglobulin Fv variable domains from at least one of a heavy or light chain. Such
25 nucleic acids may be obtained from a hybridoma producing an antibody against a predetermined target, as described above, as well as from other sources. The recombinant DNA encoding the humanized antibody molecule can then be cloned into an appropriate expression vector.

[0112] An IL-13-binding antibody molecule may also be modified by specific
30 deletion of human T cell epitopes or "deimmunization" by the methods disclosed in WO 98/52976 and WO 00/34317. Briefly, the heavy and light chain variable domains

of an antibody can be analyzed for peptides that bind to MHC Class II; these peptides represent potential T-cell epitopes (as defined in WO 98/52976 and WO 00/34317). For detection of potential T-cell epitopes, a computer modeling approach termed "peptide threading" can be applied, and in addition a database of human MHC class II binding peptides can be searched for motifs present in the V_H and V_L sequences, as described in WO 98/52976 and WO 00/34317. These motifs bind to any of the 18 major MHC class II DR allotypes, and thus constitute potential T cell epitopes. Potential T-cell epitopes detected can be eliminated by substituting small numbers of amino acid residues in the variable domains, or preferably, by single amino acid substitutions. Typically, conservative substitutions are made. Often, but not exclusively, an amino acid common to a position in human germline antibody sequences may be used. Human germline sequences, e.g., are disclosed in Tomlinson, *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 227:776-798; Cook, G. P. *et al.* (1995) *Immunol. Today* Vol. 16 (5): 237-242; Chothia, D. *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 227:799-817; and Tomlinson *et al.* (1995) *EMBO J.* 14:4628-4638. The V BASE directory provides a comprehensive directory of human immunoglobulin variable region sequences (compiled by Tomlinson, I.A. *et al.* MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK). These sequences can be used as a source of human sequence, e.g., for framework regions and CDRs. Consensus human framework regions can also be used, e.g., as described in US 6,300,064.

[0113] Additionally, chimeric, humanized, and single-chain antibody molecules (e.g., proteins that include both human and nonhuman portions), may be produced using standard recombinant DNA techniques. Humanized antibodies may also be produced, for example, using transgenic mice that express human heavy and light chain genes, but are incapable of expressing the endogenous mouse immunoglobulin heavy and light chain genes.

[0114] Additionally, the antibody molecules described herein also include those that bind to IL-13, interfere with the formation of a functional IL-13 signaling complex, and have mutations in the constant regions of the heavy chain. It is sometimes desirable to mutate and inactivate certain fragments of the constant region. For example, mutations in the heavy constant region can be made to produce antibodies with reduced binding to the Fc receptor (FcR) and/or complement; such mutations are

well known in the art. An example of such a mutation to the amino sequence of the constant region of the heavy chain of IgG is provided in SEQ ID NO:128. Certain active fragments of the CL and CH subunits (e.g., CH1) are covalently link to each other. A further aspect provides a method for obtaining an antigen-binding site that is specific for a surface of IL-13 that participates in forming a functional IL-13 signaling complex.

[0115] Exemplary antibody molecules can include sequences of VL chains as set forth in SEQ ID NOs:30-46, and/or of VH chains as set forth in and SEQ ID NOs:50-115, but also can include variants of these sequences that retain IL-13 binding ability. Such variants may be derived from the provided sequences using techniques well known in the art. Amino acid substitutions, deletions, or additions, can be made in either the FRs or in the CDRs. Whereas changes in the framework regions are usually designed to improve stability and reduce immunogenicity of the antibody molecule, changes in the CDRs are usually designed to increase affinity of the antibody molecule for its target. Such affinity-increasing changes are typically determined empirically by altering the CDR region and testing the antibody molecule. Such alterations can be made according to the methods described in *Antibody Engineering*, 2nd. ed. (1995), ed. Borrebaeck, Oxford University Press.

[0116] An exemplary method for obtaining a heavy chain variable domain sequence that is a variant of a heavy chain variable domain sequence described herein, includes adding, deleting, substituting, or inserting one or more amino acids in a heavy chain variable domain sequence described herein, optionally combining the heavy chain variable domain sequence with one or more light chain variable domain sequences, and testing a protein that includes the modified heavy chain variable domain sequence for specific binding to IL-13, and (preferably) testing the ability of such antigen-binding domain to modulate one or more IL-13-associated activities. An analogous method may be employed using one or more sequence variants of a light chain variable domain sequence described herein.

[0117] Variants of antibody molecules can be prepared by creating libraries with one or more varied CDRs and screening the libraries to find members that bind to IL-13, e.g., with improved affinity. For example, Marks et al. (*Bio/Technology* (1992)

00053 53

10:779-83) describe methods of producing repertoires of antibody variable domains in which consensus primers directed at or adjacent to the 5' end of the variable domain area are used in conjunction with consensus primers to the third framework region of human VH genes to provide a repertoire of VH variable domains lacking a CDR3. The repertoire may be combined with a CDR3 of a particular antibody. Further, the CDR3-derived sequences may be shuffled with repertoires of VH or VL domains lacking a CDR3, and the shuffled complete VH or VL domains combined with a cognate VL or VH domain to provide specific antigen-binding fragments. The repertoire may then be displayed in a suitable host system such as the phage display system of WO 92/01047, so that suitable antigen-binding fragments can be selected. Analogous shuffling or combinatorial techniques are also disclosed by Stemmer (*Nature* (1994) 370:389-91). A further alternative is to generate altered VH or VL regions using random mutagenesis of one or more selected VH and/or VL genes to generate mutations within the entire variable domain. See, e.g., Gram et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (1992) 89:3576-80.

15 [0118] Another method that may be used is to direct mutagenesis to CDR regions of VH or VL genes. Such techniques are disclosed by, e.g., Barbas et al. (*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (1994) 91:3809-13) and Schier et al. (*J. Mol. Biol.* (1996) 263:551-67). Similarly, one or more, or all three CDRs may be grafted into a repertoire of VH or VL domains, or even some other scaffold (such as a fibronectin domain). The resulting protein is evaluated for ability to bind to IL-13.

[0119] In one embodiment, a binding agent that binds to a target is modified, e.g., by mutagenesis, to provide a pool of modified binding agents. The modified binding agents are then evaluated to identify one or more altered binding agents which have altered functional properties (e.g., improved binding, improved stability, lengthened stability in vivo). In one implementation, display library technology is used to select or screen the pool of modified binding agents. Higher affinity binding agents are then identified from the second library, e.g., by using higher stringency or more competitive binding and washing conditions. Other screening techniques can also be used.

30 [0120] In some embodiments, the mutagenesis is targeted to regions known or likely to be at the binding interface. If, for example, the identified binding agents are

antibody molecules, then mutagenesis can be directed to the CDR regions of the heavy or light chains as described herein. Further, mutagenesis can be directed to framework regions near or adjacent to the CDRs, e.g., framework regions, particular within 10, 5, or 3 amino acids of a CDR junction. In the case of antibodies, mutagenesis can also be limited to one or a few of the CDRs, e.g., to make step-wise improvements.

[0121] In one embodiment, mutagenesis is used to make an antibody more similar to one or more germline sequences. One exemplary germlining method can include: identifying one or more germline sequences that are similar (e.g., most similar in a particular database) to the sequence of the isolated antibody. Then mutations (at the amino acid level) can be made in the isolated antibody, either incrementally, in combination, or both. For example, a nucleic acid library that includes sequences encoding some or all possible germline mutations is made. The mutated antibodies are then evaluated, e.g., to identify an antibody that has one or more additional germline residues relative to the isolated antibody and that is still useful (e.g., has a functional activity). In one embodiment, as many germline residues are introduced into an isolated antibody as possible.

[0122] In one embodiment, mutagenesis is used to substitute or insert one or more germline residues into a CDR region. For example, the germline CDR residue can be from a germline sequence that is similar (e.g., most similar) to the variable domain being modified. After mutagenesis, activity (e.g., binding or other functional activity) of the antibody can be evaluated to determine if the germline residue or residues are tolerated. Similar mutagenesis can be performed in the framework regions.

[0123] Selecting a germline sequence can be performed in different ways. For example, a germline sequence can be selected if it meets a predetermined criteria for selectivity or similarity, e.g., at least a certain percentage identity, e.g., at least 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, or 99.5% identity. The selection can be performed using at least 2, 3, 5, or 10 germline sequences. In the case of CDR1 and CDR2, identifying a similar germline sequence can include selecting one such sequence. In the case of CDR3, identifying a similar germline sequence can include selecting one such sequence, but may including using two germline sequences that separately contribute to the amino-terminal portion and the carboxy-terminal portion.

. 0005 55

In other implementations more than one or two germline sequences are used, e.g., to form a consensus sequence.

[0124] In other embodiments, the antibody may be modified to have an altered glycosylation pattern (i.e., altered from the original or native glycosylation pattern). As used in this context, "altered" means having one or more carbohydrate moieties deleted, and/or having one or more glycosylation sites added to the original antibody. Addition of glycosylation sites to the presently disclosed antibodies may be accomplished by altering the amino acid sequence to contain glycosylation site consensus sequences; such techniques are well known in the art. Another means of increasing the number of carbohydrate moieties on the antibodies is by chemical or enzymatic coupling of glycosides to the amino acid residues of the antibody. These methods are described in, e.g., WO 87/05330, and Aplin and Wriston (1981) *CRC Crit. Rev. Biochem.* 22:259-306. Removal of any carbohydrate moieties present on the antibodies may be accomplished chemically or enzymatically as described in the art (Hakimuddin *et al.* (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52; Edge *et al.* (1981) *Anal. Biochem.* 118:131; and Thotakura *et al.* (1987) *Meth. Enzymol.* 138:350). See, e.g., U.S. 5,869,046 for a modification that increases *in vivo* half life by providing a salvage receptor binding epitope.

[0125] In one embodiment, an antibody molecule has CDR sequences that differ only insubstantially from those of MJ 2-7 or C65. Insubstantial differences include minor amino acid changes, such as substitutions of 1 or 2 out of any of typically 5-7 amino acids in the sequence of a CDR, e.g., a Chothia or Kabat CDR. Typically, an amino acid is substituted by a related amino acid having similar charge, hydrophobic, or stereochemical characteristics. Such substitutions are within the ordinary skills of an artisan. Unlike in CDRs, more substantial changes in structure framework regions (FRs) can be made without adversely affecting the binding properties of an antibody. Changes to FRs include, but are not limited to, humanizing a nonhuman-derived framework or engineering certain framework residues that are important for antigen contact or for stabilizing the binding site, e.g., changing the class or subclass of the constant region, changing specific amino acid residues which might alter an effector function such as Fc receptor binding (Lund *et al.* (1991) *J. Immunol.* 147:2657-62; Morgan *et al.* (1995) *Immunology* 86:319-24), or changing the species

from which the constant region is derived. Antibodies may have mutations in the CH2 region of the heavy chain that reduce or alter effector function, e.g., Fc receptor binding and complement activation. For example, antibodies may have mutations such as those described in U.S. Patent Nos. 5,624,821 and 5,648,260. In the IgG1 or IgG2 heavy chain, for example, such mutations may be made to resemble the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:17. Antibodies may also have mutations that stabilize the disulfide bond between the two heavy chains of an immunoglobulin, such as mutations in the hinge region of IgG4, as disclosed in the art (e.g., Angal *et al.* (1993) *Mol. Immunol.* 30:105-08).

[0126] The IL-13 binding agents can be in the form of intact antibodies, antigen-binding fragments of antibodies, e.g., Fab, F(ab')₂, Fd, dAb, and scFv fragments, and intact antibodies and fragments that have been mutated either in their constant and/or variable domain (e.g., mutations to produce chimeric, partially humanized, or fully humanized antibodies, as well as to produce antibodies with a desired trait, e.g., enhanced IL-13 binding and/or reduced FcR binding).

[0127] **Antibody Production.** Some antibody molecules, e.g., Fabs, can be produced in bacterial cells, e.g., *E. coli* cells. For example, if the Fab is encoded by sequences in a phage display vector that includes a suppressible stop codon between the display entity and a bacteriophage protein (or fragment thereof), the vector nucleic acid can be transferred into a bacterial cell that cannot suppress a stop codon. In this case, the Fab is not fused to the gene III protein and is secreted into the periplasm and/or media.

[0128] Antibody molecules can also be produced in eukaryotic cells. In one embodiment, the antibodies (e.g., scFv's) are expressed in a yeast cell such as *Pichia* (see, e.g., Powers *et al.* (2001) *J Immunol Methods.* 251:123-35), *Hansenula*, or *Saccharomyces*.

[0129] In one preferred embodiment, antibody molecules are produced in mammalian cells. Preferred mammalian host cells for expressing the clone antibodies or antigen-binding fragments thereof include Chinese Hamster Ovary (CHO cells) (including *dhfr*⁻ CHO cells, described in Urlaub and Chasin (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, used with a DHFR selectable marker, e.g., as described in

57
non-~~57~~

Kaufman and Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), lymphocytic cell lines, e.g., NS0 myeloma cells and SP2 cells, COS cells, and a cell from a transgenic animal, e.g., a transgenic mammal. For example, the cell is a mammary epithelial cell.

[0130] In addition to the nucleic acid sequences encoding the antibody molecule, the recombinant expression vectors may carry additional sequences, such as sequences that regulate replication of the vector in host cells (e.g., origins of replication) and selectable marker genes. The selectable marker gene facilitates selection of host cells into which the vector has been introduced (see e.g., U.S. Patents Nos. 4,399,216, 4,634,665 and 5,179,017). For example, typically the selectable marker gene confers resistance to drugs, such as G418, hygromycin, or methotrexate, on a host cell into which the vector has been introduced.

[0131] In an exemplary system for recombinant expression of an antibody molecule, a recombinant expression vector encoding both the antibody heavy chain and the antibody light chain is introduced into *dhfr*⁻ CHO cells by calcium phosphate-mediated transfection. Within the recombinant expression vector, the antibody heavy and light chain genes are each operatively linked to enhancer/promoter regulatory elements (e.g., derived from SV40, CMV, adenovirus and the like, such as a CMV enhancer/AdMLP promoter regulatory element or an SV40 enhancer/AdMLP promoter regulatory element) to drive high levels of transcription of the genes. The recombinant expression vector also carries a DHFR gene, which allows for selection of CHO cells that have been transfected with the vector using methotrexate selection/amplification. The selected transformant host cells can be cultured to allow for expression of the antibody heavy and light chains and intact antibody is recovered from the culture medium. Standard molecular biology techniques can be used to prepare the recombinant expression vector, transfect the host cells, select for transformants, culture the host cells and recover the antibody molecule from the culture medium. For example, some antibody molecules can be isolated by affinity chromatography with a Protein A or Protein G coupled matrix.

[0132] For antibody molecules that include an Fc domain, the antibody production system preferably synthesizes antibodies in which the Fc region is glycosylated. For example, the Fc domain of IgG molecules is glycosylated at

asparagine 297 in the CH2 domain. This asparagine is the site for modification with biantennary-type oligosaccharides. It has been demonstrated that this glycosylation is required for effector functions mediated by Fcγ receptors and complement C1q (Burton and Woof (1992) *Adv. Immunol.* 51:1-84; Jefferis *et al.* (1998) *Immunol. Rev.* 163:59-76). In one embodiment, the Fc domain is produced in a mammalian expression system that appropriately glycosylates the residue corresponding to asparagine 297. The Fc domain can also include other eukaryotic post-translational modifications.

[0133] Antibody molecules can also be produced by a transgenic animal. For example, U.S. Patent No. 5,849,992 describes a method of expressing an antibody in the mammary gland of a transgenic mammal. A transgene is constructed that includes a milk-specific promoter and nucleic acids encoding the antibody molecule and a signal sequence for secretion. The milk produced by females of such transgenic mammals includes, secreted-therein, the antibody of interest. The antibody molecule can be purified from the milk, or for some applications, used directly.

15 [0134] Characterization

[0135] The binding properties of a binding agent may be measured by any method, e.g., one of the following methods: BIACORE™ analysis, Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), x-ray crystallography, sequence analysis and scanning mutagenesis. The ability of a protein to neutralize and/or inhibit one or more IL-13-associated activities may be measured by the following methods: assays for measuring the proliferation of an IL-13 dependent cell line, e.g. TFI; assays for measuring the expression of IL-13-mediated polypeptides, e.g., flow cytometric analysis of the expression of CD23; assays evaluating the activity of downstream signaling molecules, e.g., STAT6; assays evaluating production of tenascin; assays testing the efficiency of an antibody described herein to prevent asthma in a relevant animal model, e.g., the cynomolgus monkey, and other assays. An IL-13 binding agent, particularly an IL-13 antibody molecule, can have a statistically significant effect in one or more of these assays. Exemplary assays for binding properties include the following.

[0136] The binding interaction of a IL-13 binding agent and a target (e.g., IL-13) can be analyzed using surface plasmon resonance (SPR). SPR or Biomolecular Interaction Analysis (BIA) detects biospecific interactions in real time, without labeling

any of the interactants. Changes in the mass at the binding surface (indicative of a binding event) of the BIA chip result in alterations of the refractive index of light near the surface. The changes in the refractivity generate a detectable signal, which are measured as an indication of real-time reactions between biological molecules.

- 5 Methods for using SPR are described, for example, in U.S. Patent No. 5,641,640; Raether (1988) *Surface Plasmons* Springer Verlag; Sjolander and Urbaniczky (1991) *Anal. Chem.* 63:2338-2345; Szabo *et al.* (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705 and on-line resources provide by BIAcore International AB (Uppsala, Sweden).

- [0137] Information from SPR can be used to provide an accurate and
10 quantitative measure of the equilibrium dissociation constant (K_d), and kinetic parameters, including K_{on} and K_{off} , for the binding of a molecule to a target. Such data can be used to compare different molecules. Information from SPR can also be used to develop structure-activity relationships (SAR). For example, the kinetic and equilibrium binding parameters of different antibody molecule can be evaluated.
- 15 Variant amino acids at given positions can be identified that correlate with particular binding parameters, e.g., high affinity and slow K_{off} . This information can be combined with structural modeling (e.g., using homology modeling, energy minimization, or structure determination by x-ray crystallography or NMR). As a result, an understanding of the physical interaction between the protein and its target can be
20 formulated and used to guide other design processes.

[0138] Respiratory Disorders

- [0139] IL-13 binding agents, e.g., anti-IL-13 antibody molecules, can be used to treat or prevent respiratory disorders including, but are not limited to asthma (e.g., allergic and nonallergic asthma (e.g., due to infection, e.g., with respiratory syncytial
25 virus (RSV), e.g., in younger children)); bronchitis (e.g., chronic bronchitis); chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (e.g., emphysema (e.g., cigarette-induced emphysema); conditions involving airway inflammation, eosinophilia, fibrosis and excess mucus production, e.g., cystic fibrosis, pulmonary fibrosis, and allergic rhinitis. For example, an IL-13 binding agent (e.g., an anti-IL-13 antibody molecule) can be
30 administered in an amount effective to treat or prevent the disorder or to ameliorate at least one symptom of the disorder.

[0140] Asthma can be triggered by myriad conditions, e.g., inhalation of an allergen, presence of an upper-respiratory or ear infection, etc. (Oppenwall (2003) *Nurs. Clin. North Am.* 38:697-711). Allergic asthma is characterized by airway hyperresponsiveness (AHR) to a variety of specific and nonspecific stimuli, elevated
5 serum immunoglobulin E (IgE), excessive airway mucus production, edema, and bronchial epithelial injury (Wills-Karp, supra). Allergic asthma begins when the allergen provokes an immediate early airway response, which is frequently followed several hours later by a delayed late-phase airway response (LAR) (Henderson et al. (2000) *J. Immunol.* 164:1086-95). During LAR, there is an influx of eosinophils,
10 lymphocytes, and macrophages throughout the airway wall and the bronchial fluid. (Henderson et al., supra). Lung eosinophilia is a hallmark of allergic asthma and is responsible for much of the damage to the respiratory epithelium (Li et al. (1999) *J. Immunol.* 162:2477-87).

[0141] CD4⁺ T helper (Th) cells are important for the chronic inflammation
15 associated with asthma (Henderson et al., supra). Several studies have shown that commitment of CD4⁺ cells to type 2 T helper (Th2) cells and the subsequent production of type 2 cytokines (e.g., IL-4, IL-5, IL-10, and IL-13) are important in the allergic inflammatory response leading to AHR (Tomkinson et al. (2001) *J. Immunol.* 166:5792-5800, and references cited therein). First, CD4⁺ T cells have been shown to
20 be necessary for allergy-induced asthma in murine models. Second, CD4⁺ T cells producing type 2 cytokines undergo expansion not only in these animal models but also in patients with allergic asthma. Third, type 2 cytokine levels are increased in the airway tissues of animal models and asthmatics. Fourth, Th2 cytokines have been implicated as playing a central role in eosinophil recruitment in murine models of
25 allergic asthma, and adoptively transferred Th2 cells have been correlated with increased levels of eotaxin (a potent eosinophil chemoattractant) in the lung as well as lung eosinophilia (Wills-Karp et al., supra; Li et al., supra).

[0142] The methods for treating or preventing asthma described herein include those for extrinsic asthma (also known as allergic asthma or atopic asthma), intrinsic
30 asthma (also known as non-allergic asthma or non-atopic asthma) or combinations of both, which has been referred to as mixed asthma. Extrinsic or allergic asthma includes incidents caused by, or associated with, e.g., allergens, such as pollens, spores, grasses

or weeds, pet danders, dust, mites, etc. As allergens and other irritants present themselves at varying points over the year, these types of incidents are also referred to as seasonal asthma. Also included in the group of extrinsic asthma is bronchial asthma and allergic bronchopulmonary aspergillosis.

5 [0143] Disorders that can be treated or alleviated by the agents described herein include those respiratory disorders and asthma caused by infectious agents, such as viruses (e.g., cold and flu viruses, respiratory syncytial virus (RSV), paramyxovirus, rhinovirus and influenza viruses. RSV, rhinovirus and influenza virus infections are common in children, and are one leading cause of respiratory tract illnesses in infants
10 and young children. Children with viral bronchiolitis can develop chronic wheezing and asthma, which can be treated using the methods described herein. Also included are the asthma conditions which may be brought about in some asthmatics by exercise and/or cold air. The methods are useful for asthmas associated with smoke exposure (e.g., cigarette-induced and industrial smoke), as well as industrial and occupational
15 exposures, such as smoke, ozone, noxious gases, sulfur dioxide, nitrous oxide, fumes, including isocyanates, from paint, plastics, polyurethanes, varnishes, etc., wood, plant or other organic dusts, etc. The methods are also useful for asthmatic incidents associated with food additives, preservatives or pharmacological agents. Also included are methods for treating, inhibiting or alleviating the types of asthma referred to as
20 silent asthma or cough variant asthma.

[0144] The methods disclosed herein are also useful for treatment and alleviation of asthma associated with gastroesophageal reflux (GERD), which can stimulate bronchoconstriction. GERD, along with retained bodily secretions, suppressed cough, and exposure to allergens and irritants in the bedroom can contribute
25 to asthmatic conditions and have been collectively referred to as nighttime asthma or nocturnal asthma. In methods of treatment, inhibition or alleviation of asthma associated with GERD, a pharmaceutically effective amount of the IL-13 binding agent can be used as described herein in combination with a pharmaceutically effective amount of an agent for treating GERD. These agents include, but are not limited to,
30 proton pump inhibiting agents like PROTONIX® brand of delayed-release pantoprazole sodium tablets, PRILOSEC® brand omeprazole delayed release capsules, ACIPHEX®

brand rebeprazole sodium delayed release tablets or PREVACID® brand delayed release lansoprazole capsules.

[0145] Atopic Disorders and Symptoms Thereof

[0146] It has been observed that cells from atopic patients have enhanced
5 sensitivity to IL-13. Accordingly, an IL-13 binding agent (e.g., an IL-13 binding agent such as an antibody molecule described herein) can be administered in an amount effective to treat or prevent an atopic disorder. "Atopic" refers to a group of diseases in which there is often an inherited tendency to develop an allergic reaction.

[0147] Examples of atopic disorders include allergy, allergic rhinitis, atopic
10 dermatitis, asthma and hay fever. Asthma is a phenotypically heterogeneous disorder associated with intermittent respiratory symptoms such as, e.g., bronchial hyperresponsiveness and reversible airflow obstruction. Immunohistopathologic features of asthma include, e.g., denudation of airway epithelium, collagen deposition beneath the basement membrane; edema; mast cell activation; and inflammatory cell
15 infiltration (e.g., by neutrophils, eosinophils, and lymphocytes). Airway inflammation can further contribute to airway hyperresponsiveness, airflow limitation, acute bronchoconstriction, mucus plug formation, airway wall remodeling, and other respiratory symptoms. An IL-13 binding agent (e.g., an IL-13 binding agent such as an antibody molecule described herein) can be administered in an amount effective to
20 ameliorate one or more of these symptoms.

[0148] Symptoms of allergic rhinitis (hay fever) include itchy, runny, sneezing, or stuffy nose, and itchy eyes. An IL-13 binding agent can be administered to ameliorate one or more of these symptoms. Atopic dermatitis is a chronic (long-lasting) disease that affects the skin. Information about atopic dermatitis is available,
25 e.g., from NIH Publication No. 03-4272. In atopic dermatitis, the skin can become extremely itchy, leading to redness, swelling, cracking, weeping clear fluid, and finally, crusting and scaling. In many cases, there are periods of time when the disease is worse (called exacerbations or flares) followed by periods when the skin improves or clears up entirely (called remissions). Atopic dermatitis is often referred to as
30 "eczema," which is a general term for the several types of inflammation of the skin. Atopic dermatitis is the most common of the many types of eczema. Examples of

atopic dermatitis include: allergic contact eczema (dermatitis: a red, itchy, weepy reaction where the skin has come into contact with a substance that the immune system recognizes as foreign, such as poison ivy or certain preservatives in creams and lotions); contact eczema (a localized reaction that includes redness, itching, and burning where the skin has come into contact with an allergen (an allergy-causing substance) or with an irritant such as an acid, a cleaning agent, or other chemical); dyshidrotic eczema (irritation of the skin on the palms of hands and soles of the feet characterized by clear, deep blisters that itch and burn); neurodermatitis (scaly patches of the skin on the head, lower legs, wrists, or forearms caused by a localized itch (such as an insect bite) that become intensely irritated when scratched); nummular eczema (coin-shaped patches of irritated skin-most common on the arms, back, buttocks, and lower legs-that may be crusted, scaling, and extremely itchy); seborrheic eczema (yellowish, oily, scaly patches of skin on the scalp, face, and occasionally other parts of the body). Additional particular symptoms include stasis dermatitis, atopic pleat (Dennie-Morgan fold), cheilitis, hyperlinear palms, hyperpigmented eyelids (eyelids that have become darker in color from inflammation or hay fever), ichthyosis, keratosis pilaris, lichenification, papules, and urticaria. An IL-13 binding agent can be administered to ameliorate one or more of these symptoms.

[0149] An exemplary method for treating allergic rhinitis or other allergic disorder can include initiating therapy with an IL-13 binding agent prior to exposure to an allergen, e.g., prior to seasonal exposure to an allergen, e.g., prior to allergen blooms. Such therapy can include one or more doses, e.g., doses at regular intervals.

[0150] Cancer

[0151] IL-13 and its receptors may be involved in the development of at least some types of cancer, e.g., a cancer derived from hematopoietic cells or a cancer derived from brain or neuronal cells (e.g., a glioblastoma). For example, blockade of the IL-13 signaling pathway, e.g., via use of a soluble IL-13 receptor or a STAT6 -/- deficient mouse, leads to delayed tumor onset and/or growth of Hodgkins lymphoma cell lines or a metastatic mammary carcinoma, respectively (Trieu et al. (2004) *Cancer Res.* 64: 3271-75; Ostrand-Rosenberg et al. (2000) *J. Immunol.* 165: 6015-6019).

Cancers that express IL-13R(2 (Husain and Puri (2003) *J. Neurooncol.* 65:37-48; Mintz et al. (2003) *J. Neurooncol.* 64:117-23) can be specifically targeted by anti-IL-13 antibodies described herein. IL-13 binding agents, e.g., anti-IL-13 antibody molecules, can be useful to inhibit cancer cell proliferation or other cancer cell activity. A cancer
5 refers to one or more cells that has a loss of responsiveness to normal growth controls, and typically proliferates with reduced regulation relative to a corresponding normal cell.

[0152] Examples of cancers against which IL-13 binding agents (e.g., an IL-13 binding agent such as an antibody or antigen binding fragment described herein) can be
10 used for treatment include leukemias, e.g., B-cell chronic lymphocytic leukemia, acute myelogenous leukemia, and human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) transformed T cells; lymphomas, e.g. T cell lymphoma, Hodgkin's lymphoma; glioblastomas; pancreatic cancers; renal cell carcinoma; ovarian carcinoma; and AIDS-Kaposi's sarcoma. . For example, an IL-13 binding agent (e.g., an anti-IL-13 antibody
15 molecule) can be administered in an amount effective to treat or prevent the disorder, e.g., to reduce cell proliferation, or to ameliorate at least one symptom of the disorder.

[0153] Fibrosis

[0154] IL-13 binding agents can also be useful in treating inflammation and fibrosis, e.g., fibrosis of the liver. IL-13 production has been correlated with the
20 progression of liver inflammation (e.g., viral hepatitis) toward cirrhosis, and possibly, hepatocellular carcinoma (de Lalla et al. (2004) *J. Immunol.* 173:1417-1425). Fibrosis occurs, e.g., when normal tissue is replaced by scar tissue, often following inflammation. Hepatitis B and hepatitis C viruses both cause a fibrotic reaction in the liver, which can progress to cirrhosis. Cirrhosis, in turn, can evolve into severe
25 complications such as liver failure or hepatocellular carcinoma. Blocking IL-13 activity using the IL-13 binding agents, e.g., anti-IL-13 antibodies, described herein can reduce inflammation and fibrosis, e.g., the inflammation, fibrosis, and cirrhosis associated with liver diseases, especially hepatitis B and C. For example, an IL-13 binding agent (e.g., an anti-IL-13 antibody molecule) can be administered in an amount
30 effective to treat or prevent the disorder or to ameliorate at least one symptom of the inflammatory and/or fibrotic disorder.

[0155] Inflammatory Bowel Disease

[0156] Inflammatory bowel disease (IBD) is the general name for diseases that cause inflammation of the intestines. Two examples of inflammatory bowel disease are Crohn's disease and ulcerative colitis. IL-13/STAT6 signaling has been found to be involved in inflammation-induced hypercontractivity of mouse smooth muscle, a model of inflammatory bowel disease (Akiho et al. (2002) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 282:G226-232). For example, an IL-13 binding agent (e.g., an anti-IL-13 antibody molecule) can be administered in an amount effective to treat or prevent the disorder or to ameliorate at least one symptom of the inflammatory bowel disorder.

10 [0157] Additional IL-13 Binding agents

[0158] Also provided are binding agents, other than binding agents that are antibodies and fragments thereof, that bind to IL-13, particularly binding agents that compete with MJ2-7 or C65 and other antibodies described herein for binding to IL-13. For example, the binding agents can bind to the same epitope or an overlapping epitope as MJ2-7 or C65 on IL-13. The binding agents preferably inhibit or neutralize IL-13 activity. For example, the binding agents inhibit binding of IL-13 to IL 13R α 1 and, e.g., does not prevent binding of IL-13 to IL-4R α . Such binding agents can be used in the methods described herein, e.g., the methods of treating and preventing disorders. All embodiments described herein can be adapted for use with IL-13 binding agents.

20 [0159] Binding agents can be identified by a number of means, including modifying a variable domain described herein or grafting one or more CDRs of a variable domain described herein onto another scaffold domain. Binding agents can also be identified from diverse libraries, e.g., by screening. One method for screening protein libraries uses phage display. Particular regions of a protein are varied and proteins that interact with IL-13 are identified, e.g., by retention on a solid support or by other physical association. To identify particular binding agents that bind to the same epitope or an overlapping epitope as MJ2-7 or C65 on IL-13, binding agents can be eluted by adding MJ2-7 or C65 (or related antibody), or binding agents can be evaluated in competition experiments with MJ2-7 or C65 (or related antibody). It is also possible to deplete the library of agents that bind to other epitopes by contacting the library to a complex that contains IL-13 and MJ2-7 or C65 (or related antibody).

The depleted library can then be contacted to IL-13 to obtain a binding agent that binds to IL-13 but not to IL-13 when it is bound by MJ 2-7 or C65. It is also possible to use peptides from IL-13 that contain the MJ 2-7 or C65 epitope as a target.

[0160] Phage display is described, for example, in U.S. Patent No. 5,223,409; 5 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) *Science* 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J Mol Biol* 226:889-896; 10 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; and Barbas *et al.* (1991) *PNAS* 88:7978-7982. Yeast surface display is described, e.g., in Boder and Wittrup (1997) *Nat. Biotechnol.* 15:553-557. Another form of display is ribosome display. See, e.g., Mattheakis *et al.* (1994) *Proc.* 15 *Natl. Acad. Sci. USA* 91:9022 and Hanes *et al.* (2000) *Nat Biotechnol.* 18:1287-92; Hanes *et al.* (2000) *Methods Enzymol.* 328:404-30. and Schaffitzel *et al.* (1999) *J Immunol Methods.* 231(1-2):119-35.

[0161] Binding agents that bind to IL-13 can have structural features of one scaffold proteins, e.g., a folded domain. An exemplary scaffold domain, based on an 20 antibody, is a "minibody" scaffold has been designed by deleting three beta strands from a heavy chain variable domain of a monoclonal antibody (Tramontano *et al.*, 1994, *J. Mol. Recognit.* 7:9; and Martin *et al.*, 1994, *EMBO J.* 13:5303-5309). This domain includes 61 residues and can be used to present two hypervariable loops, e.g., one or more hypervariable loops of a variable domain described herein or a variant 25 described herein. In another approach, the binding agent includes a scaffold domain that is a V-like domain (Coia *et al.* WO 99/45110). V-like domains refer to a domain that has similar structural features to the variable heavy (VH) or variable light (VL) domains of antibodies. Another scaffold domain is derived from tendamistatin, a 74 residue, six-strand beta sheet sandwich held together by two disulfide bonds 30 (McConnell and Hoess, 1995, *J. Mol. Biol.* 250:460). This parent protein includes three loops. The loops can be modified (e.g., using CDRs or hypervariable loops described herein) or varied, e.g., to select domains that bind to IL-13. WO 00/60070 describes a

β -sandwich structure derived from the naturally occurring extracellular domain of CTLA-4 that can be used as a scaffold domain.

[0162] Still another scaffold domain for an IL-13 binding agent is a domain based on the fibronectin type III domain or related fibronectin-like proteins. The overall fold of the fibronectin type III (Fn3) domain is closely related to that of the smallest functional antibody fragment, the variable domain of the antibody heavy chain. Fn3 is a β -sandwich similar to that of the antibody VH domain, except that Fn3 has seven β -strands instead of nine. There are three loops at the end of Fn3; the positions of BC, DE and FG loops approximately correspond to those of CDR1, 2 and 3 of the VH domain of an antibody. Fn3 is advantageous because it does not have disulfide bonds. Therefore, Fn3 is stable under reducing conditions, unlike antibodies and their fragments (see WO 98/56915; WO 01/64942; WO 00/34784). An Fn3 domain can be modified (e.g., using CDRs or hypervariable loops described herein) or varied, e.g., to select domains that bind to IL-13.

[0163] Still other exemplary scaffold domains include: T-cell receptors; MHC proteins; extracellular domains (e.g., fibronectin Type III repeats, EGF repeats); protease inhibitors (e.g., Kunitz domains, ecotin, BPTI, and so forth); TPR repeats; trifoil structures; zinc finger domains; DNA-binding proteins; particularly monomeric DNA binding proteins; RNA binding proteins; enzymes, e.g., proteases (particularly inactivated proteases), RNase; chaperones, e.g., thioredoxin, and heat shock proteins; and intracellular signaling domains (such as SH2 and SH3 domains). US 20040009530 describes examples of some alternative scaffolds.

[0164] Examples of small scaffold domains include: Kunitz domains (58 amino acids, 3 disulfide bonds), *Cucurbita maxima* trypsin inhibitor domains (31 amino acids, 3 disulfide bonds), domains related to guanylin (14 amino acids, 2 disulfide bonds), domains related to heat-stable enterotoxin IA from gram negative bacteria (18 amino acids, 3 disulfide bonds), EGF domains (50 amino acids, 3 disulfide bonds), kringle domains (60 amino acids, 3 disulfide bonds), fungal carbohydrate-binding domains (35 amino acids, 2 disulfide bonds), endothelin domains (18 amino acids, 2 disulfide bonds), and Streptococcal G IgG-binding domain (35 amino acids, no disulfide bonds).

Examples of small intracellular scaffold domains include SH2, SH3, and EVH domains. Generally, any modular domain, intracellular or extracellular, can be used.

[0165] Exemplary criteria for evaluating a scaffold domain can include: (1) amino acid sequence, (2) sequences of several homologous domains, (3) 3-dimensional structure, and/or (4) stability data over a range of pH, temperature, salinity, organic solvent, oxidant concentration. In one embodiment, the scaffold domain is a small, stable protein domains, e.g., a protein of less than 100, 70, 50, 40 or 30 amino acids. The domain may include one or more disulfide bonds or may chelate a metal, e.g., zinc.

[0166] Still other binding agents are based on peptides, e.g., proteins with an amino acid sequence that are less than 30, 25, 24, 20, 18, 15, or 12 amino acids. Peptides can be incorporated in a larger protein, but typically a region that can independently bind to IL-13, e.g., to an epitope described herein. Peptides can be identified by phage display. See, e.g., US 20040071705.

[0167] An IL-13 binding agent may include non-peptide linkages and other chemical modification. For example, part or all of the binding agent may be synthesized as a peptidomimetic, e.g., a peptoid (see, e.g., Simon et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9367-71 and Horwell (1995) *Trends Biotechnol.* 13:132-4). A binding agent may include one or more (e.g., all) non-hydrolyzable bonds. Many non-hydrolyzable peptide bonds are known in the art, along with procedures for synthesis of peptides containing such bonds. Exemplary non-hydrolyzable bonds include --[CH₂NH]-- reduced amide peptide bonds, --[COCH₂]-- ketomethylene peptide bonds, --[CH(CN)NH]--(cyanomethylene)amino peptide bonds, --[CH₂CH(OH)]-- hydroxyethylene peptide bonds, --[CH₂O]--peptide bonds, and --[CH₂S]-- thiomethylene peptide bonds (see e.g., U.S. Pat. No. 6,172,043).

25 [0168] Pharmaceutical Compositions

[0169] The IL-13 binding agents, e.g. antibody molecules that bind to IL-13 (such as those described herein) can be used *in vitro*, *ex vivo*, or *in vivo*. They can be incorporated into a pharmaceutical composition, e.g., by combining the IL-13 binding agent with a pharmaceutically acceptable carrier. Such a composition may contain, in addition to the IL-13 binding agent and carrier, various diluents, fillers, salts, buffers,

stabilizers, solubilizers, and other materials well known in the art. Pharmaceutically acceptable materials is generally a nontoxic material that does not interfere with the effectiveness of the biological activity of an IL-13 binding agent. The characteristics of the carrier can depend on the route of administration.

5 [0170] The pharmaceutical composition described herein may also contain other factors, such as, but not limited to, other anti-cytokine antibody molecules or other anti-inflammatory agents as described in more detail below. Such additional factors and/or agents may be included in the pharmaceutical composition to produce a synergistic effect with an IL-13 binding agent, e.g., anti-IL-13 antibody molecule,
10 described herein. For example, in the treatment of allergic asthma, a pharmaceutical composition described herein may include anti-IL-4 antibody molecules or drugs known to reduce an allergic response.

[0171] The pharmaceutical composition described herein may be in the form of a liposome in which an IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule,
15 such as one described herein is combined, in addition to other pharmaceutically acceptable carriers, with amphipathic agents such as lipids that exist in aggregated form as micelles, insoluble monolayers, liquid crystals, or lamellar layers while in aqueous solution. Suitable lipids for liposomal formulation include, without limitation, monoglycerides, diglycerides, sulfatides, lysolecithin, phospholipids, saponin, bile
20 acids, and the like. Exemplary methods for preparing such liposomal formulations include methods described in U.S. Patent Nos. 4,235,871; 4,501,728; 4,837,028; and 4,737,323.

[0172] As used herein, the term "therapeutically effective amount" means the total amount of each active component of the pharmaceutical composition or method
25 that is sufficient to show a meaningful patient benefit, e.g., amelioration of symptoms of, healing of, or increase in rate of healing of such conditions. When applied to an individual active ingredient, administered alone, the term refers to that ingredient alone. When applied to a combination, the term refers to combined amounts of the active ingredients that result in the therapeutic effect, whether administered in combination,
30 serially or simultaneously.

[0173] In practicing the method of treatment or use, a therapeutically effective amount of IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, e.g., an antibody molecule that binds to IL-13 and interferes with the formation of a functional IL-13 signaling complex (and, e.g., neutralizes or inhibits one or more IL-13-associated activities), is administered to a subject, e.g., mammal (e.g., a human). An IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, may be administered in accordance with a method described herein either alone as well as in combination with other therapies such as treatments employing cytokines, lymphokines or other hematopoietic factors, cancer therapeutics, or anti-inflammatory agents. When coadministered with one or more agents, an IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, may be administered either simultaneously with the second agent, or sequentially. If administered sequentially, a physician can select an appropriate sequence for administering the IL-13 binding agent in combination with other agents.

[0174] Administration of an IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, used in the pharmaceutical composition can be carried out in a variety of conventional ways, such as oral ingestion, inhalation, or cutaneous, subcutaneous, or intravenous injection. When a therapeutically effective amount of an IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, is administered by intravenous, cutaneous or subcutaneous injection, the binding agent can be prepared as a pyrogen-free, parenterally acceptable aqueous solution. The composition of such parenterally acceptable protein solutions can be adapted in view factors such as pH, isotonicity, stability, and the like, e.g., to optimize the composition for physiological conditions, binding agent stability, and so forth. A pharmaceutical composition for intravenous, cutaneous, or subcutaneous injection can contain, e.g., an isotonic vehicle such as Sodium Chloride Injection, Ringer's Injection, Dextrose Injection, Dextrose and Sodium Chloride Injection, Lactated Ringer's Injection, or other vehicle as known in the art. The pharmaceutical composition may also contain stabilizers, preservatives, buffers, antioxidants, or other additive.

[0175] The amount of an IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, in the pharmaceutical composition can depend upon the nature and severity of the condition being treated, and on the nature of prior treatments that the patient has undergone. The pharmaceutical composition can be administered to normal patients or

patients who do not show symptoms, e.g., in a prophylactic mode. An attending physician may decide the amount of IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, with which to treat each individual patient. For example, an attending physician can administer low doses of antagonist and observe the patient's response.

- 5 Larger doses of antagonist may be administered until the optimal therapeutic effect is obtained for the patient, and at that point the dosage is not generally increased further. For example, a pharmaceutical may contain between about 0.1 mg to 50 mg antibody per kg body weight, e.g., between about 0.1 mg and 5 mg or between about 8 mg and 50 mg antibody per kg body weight. In one embodiment in which the antibody is
- 10 delivered subcutaneously at a frequency of no more than twice per month, e.g., every other week or monthly, the composition includes an amount of about 0.7-3.3, e.g., 1.0-3.0 mg/kg, e.g., about 0.8-1.2, 1.2-2.8, or 2.8-3.3 mg/kg.

- [0176] The duration of therapy using the pharmaceutical composition may vary, depending on the severity of the disease being treated and the condition and potential
- 15 idiosyncratic response of each individual patient. In one embodiment, the IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, can also be administered via the subcutaneous route, e.g., in the range of once a week, once every 24, 48, 96 hours, or not more frequently than such intervals. Exemplary dosages can be in the range of 0.1-20 mg/kg, more preferably 1-10 mg/kg. The agent can be administered, e.g., by
- 20 intravenous infusion at a rate of less than 20, 10, 5, or 1 mg/min to reach a dose of about 1 to 50 mg/m² or about 5 to 20 mg/m².

- [0177] In one embodiment, an administration of a IL-13 binding agent to the patient includes varying the dosage of the protein, e.g., to reduce or minimize side effects. For example, the subject can be administered a first dosage, e.g., a dosage less
- 25 than a therapeutically effective amount. In a subsequent interval, e.g., at least 6, 12, 24, or 48 hours later, the patient can be administered a second dosage, e.g., a dosage that is at least 25, 50, 75, or 100% greater than the first dosage. For example, the second and/or a comparable third, fourth and fifth dosage can be at least about 70, 80, 90, or 100% of a therapeutically effective amount.

[0178] Inhalation

- [0179] A composition that includes an IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, can be formulated for inhalation or other mode of pulmonary delivery. Accordingly, the IL-13 binding agent can be administered by inhalation to pulmonary tissue. The term "pulmonary tissue" as used herein refers to any tissue of the respiratory tract and includes both the upper and lower respiratory tract, except where otherwise indicated. An IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, can be administered in combination with one or more of the existing modalities for treating pulmonary diseases.
- 10 [0180] In one example the IL-13 binding agent is formulated for a nebulizer. In one embodiment, the IL-13 binding agent can be stored in a lyophilized form (e.g., at room temperature) and reconstituted in solution prior to inhalation. It is also possible to formulate the IL-13 binding agent for inhalation using a medical device, e.g., an inhaler. See, e.g., U.S. 6,102,035 (a powder inhaler) and 6,012,454 (a dry powder
- 15 inhaler). The inhaler can include separate compartments for the IL-13 binding agent at a pH suitable for storage and another compartment for a neutralizing buffer and a mechanism for combining the IL-13 binding agent with a neutralizing buffer immediately prior to atomization. In one embodiment, the inhaler is a metered dose inhaler.
- 20 [0181] The three common systems used to deliver drugs locally to the pulmonary air passages include dry powder inhalers (DPIs), metered dose inhalers (MDIs) and nebulizers. MDIs, the most popular method of inhalation administration, may be used to deliver medicaments in a solubilized form or as a dispersion. Typically MDIs comprise a Freon or other relatively high vapor pressure propellant that forces
- 25 aerosolized medication into the respiratory tract upon activation of the device. Unlike MDIs, DPIs generally rely entirely on the inspiratory efforts of the patient to introduce a medicament in a dry powder form to the lungs. Nebulizers form a medicament aerosol to be inhaled by imparting energy to a liquid solution. Direct pulmonary delivery of drugs during liquid ventilation or pulmonary lavage using a fluorochemical
- 30 medium has also been explored. These and other methods can be used to deliver an IL-13 binding agent, e.g., anti-IL-13 antibody molecule. In one embodiment, the IL-13

binding agent is associated with a polymer, e.g., a polymer that stabilizes or increases half-life of the compound.

[0182] For example, for administration by inhalation, an IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, is delivered in the form of an aerosol spray from
 5 pressured container or dispenser which contains a suitable propellant or a nebulizer. The IL-13 binding agent may be in the form of a dry particle or as a liquid. Particles that include the IL-13 binding agent can be prepared, e.g., by spray drying, by drying an aqueous solution of the IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, with a charge neutralizing agent and then creating particles from the dried powder or by
 10 drying an aqueous solution in an organic modifier and then creating particles from the dried powder.

[0183] The IL-13 binding agent may be conveniently delivered in the form of an aerosol spray presentation from pressurized packs or a nebulizer, with the use of a suitable propellant, e.g., dichlorodifluoromethane, trichlorofluoromethane,
 15 dichlorotetrafluoroethane, carbon dioxide or other suitable gas. In the case of a pressurized aerosol, the dosage unit may be determined by providing a valve to deliver a metered amount. Capsules and cartridges for use in an inhaler or insufflator may be formulated containing a powder mix of an IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, and a suitable powder base such as lactose or starch, if the particle
 20 is a formulated particle. In addition to the formulated or unformulated compound, other materials such as 100% DPPC or other surfactants can be mixed with the IL-13 binding agent to promote the delivery and dispersion of formulated or unformulated compound. Methods of preparing dry particles are described, for example, in WO 02/32406.

[0184] An IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, can be formulated for aerosol delivery, e.g., as dry aerosol particles, such that when administered it can be rapidly absorbed and can produce a rapid local or systemic therapeutic result. Administration can be tailored to provide detectable activity within 2 minutes, 5 minutes, 1 hour, or 3 hours of administration. In some embodiments, the
 30 peak activity can be achieved even more quickly, e.g., within one half hour or even within ten minutes. An IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, can

non-
74

be formulated for longer biological half-life (e.g., by association with a polymer such as PEG) for use as an alternative to other modes of administration, e.g., such that the IL-13 binding agent enters circulation from the lung and is distributed to other organs or to a particular target organ.

5 [0185] In one embodiment, the IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, is delivered in an amount such that at least 5% of the mass of the polypeptide is delivered to the lower respiratory tract or the deep lung. Deep lung has an extremely rich capillary network. The respiratory membrane separating capillary lumen from the alveolar air space is very thin ($\leq 6 \mu\text{m}$) and extremely permeable. In addition, the liquid layer lining the alveolar surface is rich in lung surfactants. In other
10 embodiments, at least 2%, 3%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, or 80% of the composition of an IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, is delivered to the lower respiratory tract or to the deep lung. Delivery to either or both of these tissues results in efficient absorption of the IL-13 binding agent and high
15 bioavailability. In one embodiment, the IL-13 binding agent is provided in a metered dose using, e.g., an inhaler or nebulizer. For example, the IL-13 binding agent is delivered in a dosage unit form of at least about 0.02, 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 5, 10, 20, 40, or 50 mg/puff or more. The percent bioavailability can be calculated as follows: the percent bioavailability = $(\text{AUC}_{\text{non-invasive}} / \text{AUC}_{\text{i.v. or s.c.}}) \times (\text{dose}_{\text{i.v. or s.c.}} / \text{dose}_{\text{non-invasive}}) \times$
20 100.

[0186] Although not necessary, delivery enhancers such as surfactants can be used to further enhance pulmonary delivery. A "surfactant" as used herein refers to a IL-13 binding agent having a hydrophilic and lipophilic moiety, which promotes absorption of a drug by interacting with an interface between two immiscible phases.
25 Surfactants are useful in the dry particles for several reasons, e.g., reduction of particle agglomeration, reduction of macrophage phagocytosis, etc. When coupled with lung surfactant, a more efficient absorption of the IL-13 binding agent can be achieved because surfactants, such as DPPC, will greatly facilitate diffusion of the compound. Surfactants are well known in the art and include but are not limited to
30 phosphoglycerides, e.g., phosphatidylcholines, L-alpha-phosphatidylcholine dipalmitoyl (DPPC) and diphosphatidyl glycerol (DPPG); hexadecanol; fatty acids; polyethylene glycol (PEG); polyoxyethylene-9-; auryl ether; palmitic acid; oleic acid;

sorbitan trioleate (Span 85); glycocholate; surfactin; poloxomer; sorbitan fatty acid ester; sorbitan trioleate; tyloxapol; and phospholipids.

[0187] Stabilization

[0188] In one embodiment, an IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, is physically associated with a moiety that improves its stabilization and/or retention in circulation, e.g., in blood, serum, lymph, bronchopulmonary lavage, or other tissues, e.g., by at least 1.5, 2, 5, 10, or 50 fold.

[0189] For example, an IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, can be associated with a polymer, e.g., a substantially non-antigenic polymers, such as polyalkylene oxides or polyethylene oxides. Suitable polymers will vary substantially by weight. Polymers having molecular number average weights ranging from about 200 to about 35,000 (or about 1,000 to about 15,000, and 2,000 to about 12,500) can be used.

[0190] For example, an IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, can be conjugated to a water soluble polymer, e.g., hydrophilic polyvinyl polymers, e.g. polyvinylalcohol and polyvinylpyrrolidone. A non-limiting list of such polymers includes polyalkylene oxide homopolymers such as polyethylene glycol (PEG) or polypropylene glycols, polyoxyethylenated polyols, copolymers thereof and block copolymers thereof, provided that the water solubility of the block copolymers is maintained. Additional useful polymers include polyoxyalkylenes such as polyoxyethylene, polyoxypropylene, and block copolymers of polyoxyethylene and polyoxypropylene (Pluronics); polymethacrylates; carbomers; branched or unbranched polysaccharides which comprise the saccharide monomers D-mannose, D- and L-galactose, fucose, fructose, D-xylose, L-arabinose, D-glucuronic acid, sialic acid, D-galacturonic acid, D-mannuronic acid (e.g. polymannuronic acid, or alginic acid), D-glucosamine, D-galactosamine, D-glucose and neuraminic acid including homopolysaccharides and heteropolysaccharides such as lactose, amylopectin, starch, hydroxyethyl starch, amylose, dextran sulfate, dextran, dextrans, glycogen, or the polysaccharide subunit of acid mucopolysaccharides, e.g. hyaluronic acid; polymers of sugar alcohols such as polysorbitol and polymannitol; heparin or heparan.

76
.. 000278

[0191] The conjugates of an IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, and a polymer can be separated from the unreacted starting materials, e.g., by gel filtration or ion exchange chromatography, e.g., HPLC. Heterologous species of the conjugates are purified from one another in the same fashion. Resolution of
5 different species (e.g. containing one or two PEG residues) is also possible due to the difference in the ionic properties of the unreacted amino acids. See, e.g., WO 96/34015.

[0192] Use of IL-13 binding agents to modulate one or more IL-13-associated activities *in vivo*

10 [0193] In yet another aspect, the invention features a method for modulating (e.g., decreasing, neutralizing and/or inhibiting) one or more associated activities of IL-13 *in vivo* by administering an IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, described herein in an amount sufficient to inhibit its activity. An IL-13
15 binding agent can also be administered to subjects for whom inhibition of an IL-13-mediated inflammatory response is required. These conditions include, e.g., airway inflammation, asthma, fibrosis, eosinophilia and increased mucus production.

[0194] The efficacy of an IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, described herein can be evaluated, e.g., by evaluating ability of the antagonist to modulate airway inflammation in cynomolgus monkeys exposed to an
20 *Ascaris suum* allergen. An IL-13 binding agent, particularly one that inhibits at least one IL-13 activity, can be used to neutralize or inhibit one or more IL-13-associated activities, e.g., to reduce IL-13 mediated inflammation *in vivo*, e.g., for treating or preventing IL-13-associated pathologies, including asthma and/or its associated symptoms.

25 [0195] In one embodiment, an IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, e.g., pharmaceutical compositions thereof, is administered in combination therapy, i.e., combined with other agents, e.g., therapeutic agents, that are useful for treating pathological conditions or disorders, such as allergic and inflammatory disorders. The term "in combination" in this context means that the agents are given
30 substantially contemporaneously, either simultaneously or sequentially. If given sequentially, at the onset of administration of the second compound, the first of the two

compounds is preferably still detectable at effective concentrations at the site of treatment.

[0196] For example, the combination therapy can include one or more IL-13 binding agents, e.g., anti-IL-13 antibodies and fragments thereof, e.g., that bind to IL-13 and interfere with the formation of a functional IL-13 signaling complex, 5 coformulated with, and/or coadministered with, one or more additional therapeutic agents, e.g., one or more cytokine and growth factor inhibitors, immunosuppressants, anti-inflammatory agents, metabolic inhibitors, enzyme inhibitors, and/or cytotoxic or cytostatic agents, as described in more detail below. Furthermore, one or more an 10 IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, may be used in combination with two or more of the therapeutic agents described herein. Such combination therapies may advantageously utilize lower dosages of the administered therapeutic agents, thus avoiding possible toxicities or complications associated with the various monotherapies. Moreover, the therapeutic agents disclosed herein act on pathways that 15 differ from the IL-13 / IL-13-receptor pathway, and thus are expected to enhance and/or synergize with the effects of the IL-13 binding agents.

[0197] Therapeutic agents that interfere with different triggers of asthma or airway inflammation, e.g., therapeutic agents used in the treatment of allergy, upper respiratory infections, or ear infections, may be used in combination with an IL-13 20 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule. In one embodiment, one or more IL-13 binding agents, e.g., anti-IL-13 antibodies and fragments thereof, may be coformulated with, and/or coadministered with, one or more additional agents, such as other cytokine or growth factor antagonists (e.g., soluble receptors, peptide inhibitors, small molecules, adhesins), antibody molecules that bind to other targets (e.g., 25 antibodies that bind to other cytokines or growth factors, their receptors, or other cell surface molecules), and anti-inflammatory cytokines or agonists thereof. Nonlimiting examples of the agents that can be used in combination with IL-13 binding agents, e.g., anti-IL-13 antibodies and fragments thereof, include, but are not limited to, inhaled steroids; beta-agonists, e.g., short-acting or long-acting beta-agonists; antagonists of 30 leukotrienes or leukotriene receptors; combination drugs such as ADVAIR®; IgE inhibitors, e.g., anti-IgE antibodies (e.g., XOLAIR®); phosphodiesterase inhibitors (e.g., PDE4 inhibitors); xanthines; anticholinergic drugs; mast cell-stabilizing agents

such as cromolyn; IL-4 inhibitors; IL-5 inhibitors; eotaxin/CCR3 inhibitors; and antihistamines.

[0198] In other embodiments, one or more IL-13 binding agents, e.g., anti-IL-13 antibody molecules, can be coformulated with, and/or coadministered with, one or more anti-inflammatory drugs, immunosuppressants, or metabolic or enzymatic inhibitors. Examples of the drugs or inhibitors that can be used in combination with the IL-13 binding agents, e.g., anti-IL-13 antibodies and fragments thereof, include, but are not limited to, one or more of: Additional examples of therapeutic agents that can be coadministered and/or coformulated with one or more anti-IL-13 antibodies or fragments thereof include one or more of: TNF antagonists (e.g., a soluble fragment of a TNF receptor, e.g., p55 or p75 human TNF receptor or derivatives thereof, e.g., 75 kD TNFR-IgG (75 kD TNF receptor-IgG fusion protein, ENBREL™)); TNF enzyme antagonists, e.g., TNF α converting enzyme (TACE) inhibitors; muscarinic receptor antagonists; TGF- β antagonists; interferon gamma; perfenidone; chemotherapeutic agents, e.g., methotrexate, leflunomide, or a sirolimus (rapamycin) or an analog thereof, e.g., CCI-779; COX2 and cPLA2 inhibitors; NSAIDs; immunomodulators; p38 inhibitors, TPL-2, Mk-2 and NF κ B inhibitors, among others.

[0199] Vaccine Formulations

[0200] In another aspect, the invention features a method of modifying an immune response associated with immunization. An IL-13 binding agent (e.g., an anti-IL-13 antibody molecule), can be used to increase the efficacy of immunization by inhibiting IL-13 activity. IL-13 binding agents can be administered before, during, or after delivery of an immunogen, e.g., administration of a vaccine. In one embodiment, the immunity raised by the vaccination is a cellular immunity, e.g., an immunity against cancer cells or virus infected, e.g., retrovirus infected, e.g., HIV infected, cells. In one embodiment, the vaccine formulation contains one or more IL-13 binding agents and an antigen, e.g., an immunogen. In another embodiment, the IL-13 binding agent and the immunogen are administered separately, e.g., within one hour, three hours, one day, or two days of each other. The IL-13 binding agent can be one that neutralizes or inhibits one or more IL-13 activities.

. nnn29 79

[0201] Inhibition of IL-13 can improve the efficacy of, e.g., cellular vaccines, e.g., vaccines against diseases such as cancer and viral infection, e.g., retroviral infection, e.g., HIV infection. Induction of CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes (CTL) by vaccines is down modulated by CD4⁺ T cells, likely through the cytokine IL-13.

- 5 Inhibition of IL-13 has been shown to enhance vaccine induction of CTL response (Ahlers et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:13020-10325). An IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, an antibody described herein, can be used in conjunction with a vaccine to increase vaccine efficacy. Cancer and viral infection (such as retroviral (e.g., HIV) infection) are exemplary disorders against which a
- 10 cellular vaccine response can be effective. Vaccine efficacy is enhanced by blocking IL-13 signaling at the time of vaccination (Ahlers et al. (2002) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99:13020-25). A vaccine formulation may be administered to a subject in the form of a pharmaceutical or therapeutic composition.

[0202] Methods for Diagnosing, Prognosing, and Monitoring Disorders

- 15 [0203] IL-13 binding agents can be used *in vitro* and *in vivo* as diagnostic agents. One exemplary method includes: (i) administering the IL-13 binding agent (e.g., an IL-13 antibody molecule) to a subject; and (ii) detecting the IL-13 binding agent in the subject. The detecting can include determining location of the IL-13 binding agent in the subject. Another exemplary method includes contacting an IL-13
- 20 binding agent to a sample, e.g., a sample from a subject. The presence or absence of IL-13 or the level of IL-13 (either qualitative or quantitative) in the sample can be determined.

- [0204] In another aspect, the present invention provides a diagnostic method for detecting the presence of a IL-13, *in vitro* (e.g., a biological sample, such as tissue,
- 25 biopsy) or *in vivo* (e.g., *in vivo* imaging in a subject).

- [0205] The method includes: (i) contacting a sample with IL-13 binding agent; and (ii) detecting formation of a complex between the IL-13 binding agent and the sample. The method can also include contacting a reference sample (e.g., a control sample) with the binding agent, and determining the extent of formation of the complex
- 30 between the binding agent an the sample relative to the same for the reference sample. A change, e.g., a statistically significant change, in the formation of the complex in the

80
nnnnn

sample or subject relative to the control sample or subject can be indicative of the presence of IL-13 in the sample.

[0206] Another method includes: (i) administering the IL-13 binding agent to a subject; and (ii) detecting formation of a complex between the IL-13 binding agent and the subject. The detecting can include determining location or time of formation of the complex.

[0207] The IL-13 binding agent can be directly or indirectly labeled with a detectable substance to facilitate detection of the bound or unbound protein. Suitable detectable substances include various enzymes, prosthetic groups, fluorescent materials, luminescent materials and radioactive materials.

[0208] Complex formation between the IL-13 binding agent and IL-13 can be detected by measuring or visualizing either the binding agent bound to the IL-13 or unbound binding agent. Conventional detection assays can be used, e.g., an enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), a radioimmunoassay (RIA) or tissue immunohistochemistry. Further to labeling the IL-13 binding agent, the presence of IL-13 can be assayed in a sample by a competition immunoassay utilizing standards labeled with a detectable substance and an unlabeled IL-13 binding agent. In one example of this assay, the biological sample, the labeled standards and the IL-13 binding agent are combined and the amount of labeled standard bound to the unlabeled binding agent is determined. The amount of IL-13 in the sample is inversely proportional to the amount of labeled standard bound to the IL-13 binding agent.

[0209] Methods for Diagnosing, Prognosing, and/or Monitoring Asthma

[0210] The binding agents described herein can be used, e.g., in methods for diagnosing, prognosing, and monitoring the progress of asthma by measuring the level of IL-13 in a biological sample. In addition, this discovery enables the identification of new inhibitors of IL-13 signaling, which will also be useful in the treatment of asthma.

[0211] Such methods for diagnosing allergic and nonallergic asthma can include detecting an alteration (e.g., a decrease or increase) of IL-13 in a biological sample, e.g., serum, plasma, bronchoalveolar lavage fluid, sputum, etc. "Diagnostic" or "diagnosing" means identifying the presence or absence of a pathologic condition.

Diagnostic methods involve detecting the presence of IL-13 by determining a test amount of IL-13 polypeptide in a biological sample, e.g., in bronchoalveolar lavage fluid, from a subject (human or nonhuman mammal), and comparing the test amount with a normal amount or range (i.e., an amount or range from an individual(s) known
 5 not to suffer from asthma) for the IL-13 polypeptide. While a particular diagnostic method may not provide a definitive diagnosis of asthma, it suffices if the method provides a positive indication that aids in diagnosis.

[0212] Methods for prognosing asthma and/or atopic disorders can include detecting upregulation of IL-13, at the mRNA or protein level. "Prognostic" or
 10 "prognosing" means predicting the probable development and/or severity of a pathologic condition. Prognostic methods involve determining the test amount of IL-13 in a biological sample from a subject, and comparing the test amount to a prognostic amount or range (i.e., an amount or range from individuals with varying severities of asthma) for IL-13. Various amounts of the IL-13 in a test sample are consistent with
 15 certain prognoses for asthma. The detection of an amount of IL-13 at a particular prognostic level provides a prognosis for the subject.

[0213] The present application also provides methods for monitoring the course of asthma by detecting the upregulation of IL-13. Monitoring methods involve determining the test amounts of IL-13 in biological samples taken from a subject at a
 20 first and second time, and comparing the amounts. A change in amount of IL-13 between the first and second time can indicate a change in the course of asthma and/or atopic disorder, with a decrease in amount indicating remission of asthma, and an increase in amount indicating progression of asthma and/or atopic disorder. Such monitoring assays are also useful for evaluating the efficacy of a particular therapeutic
 25 intervention (e.g., disease attenuation and/or reversal) in patients being treated for an IL-13 associated disorder.

[0214] Fluorophore- and chromophore-labeled binding agents can be prepared. The fluorescent moieties can be selected to have substantial absorption at wavelengths above 310 nm, and preferably above 400 nm. A variety of suitable fluorescers and
 30 chromophores are described by Stryer (1968) *Science*, 162:526 and Brand, L. et al. (1972) *Annual Review of Biochemistry*, 41:843-868. The binding agents can be labeled

with fluorescent chromophore groups by conventional procedures such as those disclosed in U.S. Patent Nos. 3,940,475, 4,289,747, and 4,376,110. One group of fluorescers having a number of the desirable properties described above is the xanthene dyes, which include the fluoresceins and rhodamines. Another group of fluorescent compounds are the naphthylamines. Once labeled with a fluorophore or chromophore, the binding agent can be used to detect the presence or localization of the IL-13 in a sample, e.g., using fluorescent microscopy (such as confocal or deconvolution microscopy).

[0215] **Histological Analysis.** Immunohistochemistry can be performed using the binding agents described herein. For example, in the case of an antibody, the antibody can be synthesized with a label (such as a purification or epitope tag), or can be detectably labeled, e.g., by conjugating a label or label-binding group. For example, a chelator can be attached to the antibody. The antibody is then contacted to a histological preparation, e.g., a fixed section of tissue that is on a microscope slide. After an incubation for binding, the preparation is washed to remove unbound antibody. The preparation is then analyzed, e.g., using microscopy, to identify if the antibody bound to the preparation. The antibody (or other polypeptide or peptide) can be unlabeled at the time of binding. After binding and washing, the antibody is labeled in order to render it detectable.

[0216] **Protein Arrays.** An IL-13 binding agent (e.g., a protein that is an IL-13 binding agent) can also be immobilized on a protein array. The protein array can be used as a diagnostic tool, e.g., to screen medical samples (such as isolated cells, blood, sera, biopsies, and the like). The protein array can also include other binding agents, e.g., ones that bind to IL-13 or to other target molecules.

[0217] Methods of producing protein arrays are described, e.g., in 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 and WO 99/51773A1. Polypeptides for the array can be spotted at high speed, e.g., using commercially available robotic apparatus, e.g., from Genetic Microsystems or BioRobotics. The array substrate can be, for example, nitrocellulose, plastic, glass, e.g., surface-modified glass. The array can also

. n n n n n 83

include a porous matrix, e.g., acrylamide, agarose, or another polymer. For example, the array can be an array of antibodies, e.g., as described in De Wildt, *supra*. Cells that produce the protein can be grown on a filter in an arrayed format. proteins production is induced, and the expressed protein are immobilized to the filter at the location of the
5 cell.

[0218] A protein array can be contacted with a sample to determine the extent of IL-13 in the sample. If the sample is unlabeled, a sandwich method can be used, e.g., using a labeled probe, to detect binding of the IL-13. Information about the extent of binding at each address of the array can be stored as a profile, e.g., in a computer
10 database. The protein array can be produced in replicates and used to compare binding profiles, e.g., of different samples.

[0219] **Flow Cytometry.** The IL-13 binding agent can be used to label cells, e.g., cells in a sample (e.g., a patient sample). The binding agent can be attached (or attachable) to a fluorescent compound. The cells can then be analyzed by flow
15 cytometry and/or sorted using fluorescent activated cell sorted (e.g., using a sorter available from Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose CA; see also U.S. Patent No. 5,627,037; 5,030,002; and 5,137,809). As cells pass through the sorter, a laser beam excites the fluorescent compound while a detector counts cells that pass through and determines whether a fluorescent compound is attached to the cell by
20 detecting fluorescence. The amount of label bound to each cell can be quantified and analyzed to characterize the sample. The sorter can also deflect the cell and separate cells bound by the binding agent from those cells not bound by the binding agent. The separated cells can be cultured and/or characterized.

[0220] ***In vivo* Imaging.** In still another embodiment, the invention provides a
25 method for detecting the presence of a IL-13 within a subject *in vivo*. The method includes (i) administering to a subject (e.g., a patient having an IL-13 associated disorder) an anti-IL-13 antibody, conjugated to a detectable marker; (ii) exposing the subject to a means for detecting the detectable marker. For example, the subject is imaged, e.g., by NMR or other tomographic means.

30 [0221] Examples of labels useful for diagnostic imaging include radiolabels such as ¹³¹I, ¹¹¹In, ¹²³I, ^{99m}Tc, ³²P, ³³P, ¹²⁵I, ³H, ¹⁴C, and ¹⁸⁸Rh, fluorescent labels such as

74

active ^{19}F atom, as described by Pykett (1982) *Scientific American*, 246:78-88 to locate and image IL-13 distribution.

[0223] Also within the scope described herein are kits comprising an IL-13 binding agent and instructions for diagnostic use, e.g., the use of the IL-13 binding agent (e.g., an antibody molecule or other polypeptide or peptide) to detect IL-13, *in vitro*, e.g., in a sample, e.g., a biopsy or cells from a patient having an IL-13 associated disorder, or *in vivo*, e.g., by imaging a subject. The kit can further contain a least one additional reagent, such as a label or additional diagnostic agent. For *in vivo* use the binding agent can be formulated as a pharmaceutical composition.

10 [0224] Kits

[0225] An IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, can be provided in a kit, e.g., as a component of a kit. For example, the kit includes (a) an IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, and, optionally (b) informational material. The informational material can be descriptive, instructional, marketing or other material that relates to a method, e.g., a method described herein. The informational material of the kits is not limited in its form. In one embodiment, the informational material can include information about production of the compound, molecular weight of the compound, concentration, date of expiration, batch or production site information, and so forth. In one embodiment, the informational material relates to using the IL-13 binding agent to treat, prevent, diagnose, prognose, or monitor a disorder described herein.

[0226] In one embodiment, the informational material can include instructions to administer an IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, in a suitable manner to perform the methods described herein, e.g., in a suitable dose, dosage form, or mode of administration (e.g., a dose, dosage form, or mode of administration described herein). In another embodiment, the informational material can include instructions to administer an IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, to a suitable subject, e.g., a human, e.g., a human having, or at risk for, allergic asthma, non-allergic asthma, or an IL-13 mediated disorder, e.g., an allergic and/or inflammatory disorder, or HTLV-1 infection. IL-13 production has been correlated with HTLV-1 infection (Chung et al., (2003) *Blood* 102: 4130-36).

[0227] For example, the material can include instructions to administer an IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, to a patient, a patient with or at risk for allergic asthma, non-allergic asthma, or an IL-13 mediated disorder, e.g., an allergic and/or inflammatory disorder, or HTLV-1 infection.

5 [0228] The kit can include one or more containers for the composition containing an IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule. In some embodiments, the kit contains separate containers, dividers or compartments for the composition and informational material. For example, the composition can be contained in a bottle, vial, or syringe, and the informational material can be contained
10 in a plastic sleeve or packet. In other embodiments, the separate elements of the kit are contained within a single, undivided container. For example, the composition is contained in a bottle, vial or syringe that has attached thereto the informational material in the form of a label. In some embodiments, the kit includes a plurality (e.g., a pack) of individual containers, each containing one or more unit dosage forms (e.g., a dosage
15 form described herein) of an IL-13 binding agent, e.g., anti-IL-13 antibody molecule. For example, the kit includes a plurality of syringes, ampules, foil packets, atomizers or inhalation devices, each containing a single unit dose of an IL-13 binding agent, e.g., an anti-IL-13 antibody molecule, or multiple unit doses.

[0229] The kit optionally includes a device suitable for administration of the
20 composition, e.g., a syringe, inhalant, pipette, forceps, measured spoon, dropper (e.g., eye dropper), swab (e.g., a cotton swab or wooden swab), or any such delivery device. In a preferred embodiment, the device is an implantable device that dispenses metered doses of the binding agent.

[0230] The Examples that follow are set forth to aid in the understanding of the
25 inventions but are not intended to, and should not be construed to, limit its scope in any way.

EXAMPLES

[0231] Example 1

[0232] (a) Cloning of NHP-IL-13 and homology to human IL-13

nonseq 87

[0233] The cynomolgus monkey IL-13 (NHP IL-13) was cloned using hybridization probes. A comparison of the cynomolgus monkey IL-13 amino acid sequence to that of human IL-13 is shown in FIG. 1A. There is 94% amino acid identity between the two sequences, due to 8 amino acid differences. One of these
5 differences, R130Q, represents a common human polymorphism preferentially expressed in asthmatic subjects (Heinzmann et al. (2000) *Hum. Mol. Genet.* 9:549-559).

[0234] (b) Binding of NHP-IL-13 to human IL13R α 2

[0235] Human IL-13 binds with high affinity to the alpha2 form of IL-13
10 receptor (IL13R α 2). A soluble form of this receptor was expressed with a human IgG1 Fc tail (sIL13R α 2-Fc). By binding to IL-13 and sequestering the cytokine from the cell surface IL13R α 1-IL4R signaling complex, sIL13R α 2-Fc can act as a potent inhibitor of human IL-13 bioactivity. sIL13R α 2-Fc was shown to bind to NHP-IL-13 produced by CHO cells or *E. coli*.

15 [0236] (c) Bioactivity of NHP-IL-13 on human monocytes

[0237] (i) CD23 expression on human monocytes. cDNA encoding cynomolgus monkey IL-13 was expressed in *E. coli* and refolded to maintain bioactivity. Reactivity of human cells to cynomolgus IL-13 was demonstrated using a bioassay in which normal peripheral blood mononuclear cells from healthy donors were
20 treated with IL-13 overnight at 37 °C. This induced up-regulation of CD23 expression on the surface of monocytes. Results showed that cynomolgus IL-13 had bioactivity on primary human monocytes.

[0238] (ii) STAT6 phosphorylation on HT-29 cells. The human HT-29 epithelial cell line responds to IL-13 by undergoing STAT6 phosphorylation, a
25 consequence of signal transduction through the IL-13 receptor. To assay the ability of recombinant NHP-IL-13 to induce STAT6 phosphorylation, HT-29 cells were challenged with the NHP-IL-13 for 30 minutes at 37 °C, then fixed, permeabilized, and stained with fluorescent antibody to phospho-STAT6. Results showed that cynomolgus IL-13 efficiently induced STAT6 phosphorylation in this human cell line.

30 [0239] (d) Generation of antibodies that bind to NHP-IL-13

[0240] Mice or other appropriate animals may be immunized and boosted with cynomolgus IL-13, e.g., using one or more of the following methods. One method for immunization may be combined with either the same or different method for boosting:

- 5 [0241] (i) Immunization with cynomolgus IL-13 protein expressed in *E. coli*, purified from inclusion bodies, and refolded to preserve biological activity. For immunization, the protein is emulsified with complete Freund's adjuvant (CFA), and mice are immunized according to standard protocols. For boosting, the same protein is emulsified with incomplete Freund's adjuvant (IFA).
- 10 [0242] (ii) Immunization with peptides spanning the entire sequence of mature cynomolgus IL-13. Each peptide contains at least one amino acid that is unique to cynomolgus IL-13 and not present in the human protein. See FIG. 1B. Where the peptide has a C-terminal residue other than cysteine, a cysteine is added for conjugation to a carrier protein. The peptides are conjugated to an immunogenic carrier protein
- 15 such as KLH, and used to immunize mice according to standard protocols. For immunization, the protein is emulsified with complete Freund's adjuvant (CFA), and mice are immunized according to standard protocols. For boosting, the same protein is emulsified with incomplete Freund's adjuvant (IFA).
- 20 [0243] (iii) Immunization with NHP-IL-13 - encoding cDNA expressed. The cDNA encoding NHP-IL-13, including leader sequence, is cloned into an appropriate vector. This DNA is coated onto gold beads which are injected intradermally by gene gun.
- [0244] (iv) The protein or peptides can be used as a target for screening a
- 25 protein library, e.g., a phage or ribosome display library. For example, the library can display varied immunoglobulin molecules, e.g., Fab's, scFv's, or Fd's.
- [0245] (e) Selection of antibody clones cross-reactive with NHP and optionally a human IL-13, e.g., a native human IL-13.

[0246] Primary screen

[0247] The primary screen for antibodies was selection for binding to recombinant NHP-IL-13 by ELISA. In this ELISA, wells are coated with recombinant NHP IL-13. The immune serum was added in serial dilutions and incubated for one hour at room temperature. Wells were washed with PBS containing 0.05% TWEEN®-20 (PBS-Tween). Bound antibody was detected using horseradish peroxidase (HRP)-labeled anti-mouse IgG and tetramethylbenzidine (TMB) substrate. Absorbance was read at 450 nm. Typically, all immunized mice generated high titers of antibody to NHP-IL-13.

[0248] Secondary screen

10 [0249] The secondary screen was selection for inhibition of binding of recombinant NHP-IL-13 to sIL-13R α 1-Fc by ELISA. Wells were coated with soluble IL-13R α 1-Fc, to which FLAG-tagged NHP-IL-13 could bind. This binding was detected with anti-FLAG antibody conjugated to HRP. Hydrolysis of TMB substrate was read as absorbance at 450 nm. In the assay, the FLAG-tagged NHP-IL-13 was added together with increasing concentrations of immune serum. If the immune serum contained antibody that bound to NHP-IL-13 and prevented its binding to the sIL13R α 1-Fc coating the wells, the ELISA signal was decreased. All immunized mice produced antibody that competed with sIL13R α 1-Fc binding to NHP-IL-13, but the titers varied from mouse to mouse. Spleens were selected for fusion from animals whose serum showed inhibited sIL13R α 1-Fc binding to NHP-IL-13 at the highest dilution.

[0250] Tertiary screen

[0251] The tertiary screen tested for inhibition of NHP-IL-13 bioactivity. Several bioassays were available to be used, including the TF-1 proliferation assay, the monocyte CD23 expression assay, and the HT-29 cell STAT6 phosphorylation assay. Immune sera were tested for inhibition of NHP-IL-13 - mediated STAT6 phosphorylation. The HT-29 human epithelial cell line was challenged for 30 minutes at 37 °C with recombinant NHP-IL-13 in the presence or absence of the indicated concentration of mouse immune serum. Cells were then fixed, permeabilized, and stained with ALEXA™ Fluor 488-conjugated mAb to phospho-STAT6 (Pharmingen).

nnnnn 90

The percentage of cells responding to IL-13 by undergoing STAT6 phosphorylation was determined by flow cytometry. Spleens of mice with the most potent neutralization activity, determined as the strongest inhibition of NHP-IL-13 bioactivity at a high serum dilution, were selected for generation of hybridomas.

5 [0252] Quaternary Screen

[0253] A crude preparation containing human IL-13 was generated from human umbilical cord blood mononuclear cells (BioWhittaker/Cambrex). The cells were cultured in a 37 °C incubator at 5% CO₂, in RPMI media containing 10% heat-inactivated FCS, 50 U/ml penicillin, 50 mg/ml streptomycin, and 2 mM L-glutamine.

10 Cells were stimulated for 3 days with the mitogen PHA-P (Sigma), and skewed toward Th2 with recombinant human IL-4 (R&D Systems) and anti-human IL-12. The Th2 cells were expanded for one week with IL-2, then activated to produce cytokine by treatment with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and ionomycin for three days. The supernatant was collected and dialyzed to remove PMA and ionomycin. To

15 deplete GM-CSF and IL-4, which could interfere with bioassays for IL-13, the supernatant was treated with biotinylated antibodies to GM-CSF and IL-4 (R&D Systems, Inc), then incubated with streptavidin-coated magnetic beads (Dyna). The final concentration of IL-13 was determined by ELISA (Biosource), and for total protein by Bradford assay (Bio-Rad). The typical preparation contains < 0.0005% IL-

20 13 by weight.

[0254] Selection of hybridoma clones

[0255] Using established methods, hybridomas were generated from spleens of mice selected as above, fused to the P3X63_{AG8.653} myeloma cell line (ATCC). Cells were plated at limiting dilution and clones were selected according to the

25 screening criteria described above. Data was collected for the selection of clones based on ability to compete for NHP-IL-13 binding to sIL13R α 1-Fc by ELISA. Clones were further tested for ability to neutralize the bioactivity of NHP-IL-13. Supernatants of the hybridomas were tested for competition of STAT-6 phosphorylation induced by NHP-IL-13 in the HT-29 human epithelial cell line

[0256] Example 2: MJ 2-7 Antibody

[0257] Total RNA was prepared from MJ 2-7 hybridoma cells using the QIAGEN RNEASY™ Mini Kit (Qiagen). RNA was reverse transcribed to cDNA using the SMART™ PCR Synthesis Kit (BD Biosciences Clontech). The variable
 5 region of MJ 2-7 heavy chain was extrapolated by PCR using SMART™ oligonucleotide as a forward primer and mIgG1 primer annealing to DNA encoding the N-terminal part of CH1 domain of mouse IgG1 constant region as a reverse primer. The DNA fragment encoding MJ 2-7 light chain variable region was generated using SMART™ and mouse kappa specific primers. The PCR reaction was performed using
 10 DEEP VENT™ DNA polymerase (New England Biolabs) and 25 nM of dNTPs for 24 cycles (94 °C for 1 minute, 60 °C for 1 minute, 72 °C for 1 minute). The PCR products were subcloned into the pED6 vector, and the sequence of the inserts was identified by DNA sequencing. N-terminal protein sequencing of the purified mouse MJ 2-7 antibody was used to confirm that the translated sequences corresponded to the
 15 observed protein sequence.

[0258] Exemplary nucleotide and amino acid sequences of mouse monoclonal antibody MJ 2-7 which interacts with NHP IL-13 and which has characteristics which suggest that it may interact with human IL-13 are as follows:

[0259] An exemplary nucleotide sequence encoding the heavy chain variable
 20 domain includes:

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

WO 2006/085938

PCT/US2005/021454

[0260] An exemplary amino acid sequence for the heavy chain variable domain includes:

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLEWIGRIDP
ANDNIKYDPKFOGKATITADTSSNTAYLQLNSLTSEDTAVYYCARSEENWYD
 5 FFDYWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO:130)

[0261] CDRs are underlined. The variable domain optionally is preceded by a leader sequence. e.g., MKCSWVIFFLMAVVTGVNS (SEQ ID NO:131). An exemplary nucleotide sequence encoding the light chain variable domain includes:

10 GAT GTTTTGATGA CCCAAACTCC ACTCTCCCTG CCTGTCACTC
 TTGGAGATCA AGCCTCCATC TCTTGCAGGT CTAGTCAGAG CATTGTACAT
 AGTAATGGAA ACACCTATTT AGAATGGTAC CTGCAGAAAC CAGGCCAGTC
 15 TCCAAAGCTC CTGATCTACA AAGTTTCCAA CCGATTTTCT GGGGTCCCAG
 ACAGGTTTCA TGGCAGTGGA TCAGGGACAG ATTTACACT CAAGATTAGC
 20 AGAGTGGAGG CTGAGGATCT GGGAGTTTAT TACTGCTTTC AAGGTTTACA
 TATTCCGTAC ACGTTCGGAG GGGGGACCAA GCTGGAAATA AAA (SEQ ID NO:132)

[0262] An exemplary amino acid sequence for the light chain variable domain
 25 includes:

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQ
 SPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFOGSHIPY
IFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:133)

30 [0263] CDRs are underlined. The amino acid sequence optionally is preceded by a leader sequence, e.g., MKLPVRLLVLMFWIPASSS (SEQ ID NO:134). The term "MJ 2-7" is used interchangeably with the term "mAb7.1.1," herein.

[0264] Example 3: C65 Antibody

[0265] Exemplary nucleotide and amino acid sequences of mouse monoclonal
 35 antibody C65, which interacts with NHP IL-13 and which has characteristics that suggest that it may interact with human IL-13 are as follows:

WO 2006/085938

PCT/US2005/021454

[0266] An exemplary nucleic acid sequence for the heavy chain variable domain includes:

```

      1  ATGGCTGTCC TGGCATTACT CTTCTGCCTG GTAACATTCC CAAGCTGTAT
5      51  CCTTTCCCAG GTGCAGCTGA AGGAGTCAGG ACCTGGCCTG GTGGCGCCCT
      101  CACAGAGCCT GTCCATCACA TGCACCGTCT CAGGGTTCTC ATTAACCGGC
      151  TATGGTGTAA ACTGGGTTCG CCAGCCTCCA GGAAAGGGTC TGGAGTGGCT
10     201  GGGATAATT TGGGGTGATG GAAGCACAGA CTATAATTCA GCTCTCAAAT
      251  CCAGACTGAT CATCAACAAG GACAACTCCA AGAGCCAAGT TTTCTTAAAA
      301  ATGAACAGTC TGCAAACTGA TGACACAGCC AGGTACTTCT GTGCCAGAGA
15     351  TAAGACTTTT TACTACGATG GTTCTACAG GGGCAGGATG GACTACTGGG
      401  GTCAAGGAAC CTCAGTCACC GTCTCCTCA (SEQ ID NO:135)
20

```

[0267] An exemplary amino acid sequence for the heavy chain variable domain includes:

```

QVQLKESGPGL VAPSQSLST CTVSGFSLTG YGVNWVRQPP GKGLEWLGI
WGDGSTDYNS ALKSRLINK DNSKSQVFLK MNSLQTDDTA RYFCARDKTF
25 YYDGFYRGRM DYWGQGTSVT VSS (SEQ ID NO:136)

```

CDRs are underlined. The amino acid sequence optionally is preceded by a leader sequence, e.g., MAVLALLFCL VTFPSCILS (SEQ ID NO:137).

[0268] An exemplary nucleotide sequence encoding the light chain variable domain includes:

```

30      1  ATGAACACGA GGGCCCCTGC TGAGTTCCTT GGGTTCCTGT TGCTCTGGTT
      51  TTTAGGTGCC AGATGTGATG TCCAGATGAT TCAGTCTCCA TCCTCCCTGT
      101  CTGCATCTTT GGGAGACATT GTCACCATGA CTTGCCAGGC AAGTCAGGGC
35     151  ACTAGCATTA ATTTAAACTG GTTTCAGCAA AAACCAGGGA AAGCTCCTAA
      201  GCTCCTGATC TTTGGTGCAA GCAACTTGGA AGATGGGGTC CCATCAAGGT
      251  TCAGTGGCAG TAGATATGGG ACAAATTTCA CTCTCACCAT CAGCAGCCTG
40     301  GAGGATGAAG ATATGGCAAC TTATTTCTGT CTACAGCATA GTTATCTCCC
      351  GTGGACGTTT GGTGGCGGCA CCAAAGTGA AATCAAA (SEQ ID NO:138)

```

[0269] An exemplary amino acid sequence for the light chain variable domain includes:

DVQMIQSP SSSLASLGDI VTMTCOASOG TSINLNWFQQ KPGKAPKLLI
 5 FGASNLEDGV PSRFGSRYG TNFTLTISL EDEDMATYFC LOHSYLPWTF
 GGGTKLEIK (SEQ ID NO:139)

CDRs are underlined. The amino acid sequence optionally is preceded by a leader sequence, e.g., MNTRAPAEFLGFLLLWFLGARC (SEQ ID NO:140).

10 [0270] Example 4: Cynomolgus Monkey Model

[0271] The efficacy of an antibody to neutralize one or more IL-13-associated activities *in vivo* can be tested using a model of antigen-induced airway inflammation in cynomolgus monkeys naturally allergic to *Ascaris suum*. In this model, challenge of an allergic monkey with *Ascaris suum* antigen results in an influx of inflammatory
 15 cells, especially eosinophils, into the airways. To test the ability of an antibody to prevent this influx of cells, the antibody can be administered 24 hours prior to challenge with *Ascaris suum* antigen. On the day of challenge, a baseline bronchoalveolar lavage (BAL) sample can be taken from the left lung. The antigen can then be instilled intratracheally into the right lung. Twenty-four hours later, the right
 20 lung is lavaged, and the BAL fluid from animals treated intravenously with 10 mg/kg recombinant antibody expressed from CHO cells are compared to BAL fluid from untreated animals. If the antibody reduces airway inflammation, an increase in percent BAL eosinophils may be observed among the untreated group, but not for the antibody-treated group. These assays can be used to confirm that the antibody effectively
 25 prevents airway eosinophilia in allergic animals challenged with an allergen.

[0272] Example 5: Fc sequences

[0273] The Ser at position #1 of SEQ ID NO:128 represents amino acid residue #119 in a first exemplary full length antibody numbering scheme in which the Ser is preceded by residue #118 of a heavy chain variable domain. In the first exemplary full
 30 length antibody numbering scheme, mutated amino acids are at numbered 234 and 237, and correspond to positions 116 and 119 of SEQ ID NO:128. Thus, the following

sequence represents an Fc domain with two mutations: L234A and G237A, according to the first exemplary full length antibody numbering scheme.

STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
5 PPCPAPEALGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK (SEQ ID NO:128)

10 [0274] The following is another exemplary human Fc domain sequence:

STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
15 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALINHYTQ
KSLSLSPGK (SEQ ID NO:141)

[0275] Other exemplary alterations that can be used to decrease effector function include L234A;L235A), (L235A;G237A), and N297A.

20

[0276] Example 6: IL-13 and IgE in Mice

[0277] IL-13 is involved in the production of IgE, an important mediator of atopic disease. Mice deficient in IL-13 had partial reductions in serum IgE and mast cell IgE responses, whereas mice lacking the natural IL-13 binding agent, IL-13R α 2 $^{-/-}$
25 , had enhanced levels of IgE and IgE effector function.

[0278] BALB/c female mice were obtained from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). IL-13R α 2 $^{-/-}$ mice are described, e.g., in Wood et al. (2003) *J. Exp. Med.* 197:703-9. Mice deficient in IL-13 are described, e.g., in McKenzie et al. (1998) *Immunity* 9:423-32. All mutant strains were on the BALB/c background.

[0279] Serum IgE levels were measured by ELISA. ELISA plates (MaxiSorp; Nunc, Rochester, NY) were coated overnight at 4 °C with rat anti-mouse IgE (BD Biosciences, San Diego, CA). Plates were blocked for 1 hour at room temperature with 0.5% gelatin in PBS, washed in PBS containing 0.05% TWEEN®-20 (PBS-Tween),
5 and incubated for six hours at room temperature with purified mouse IgE (BD Biosciences) as standards or with serum dilutions. Binding was detected with biotinylated anti-mouse IgE (BD Biosciences) using mouse IgG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) as a blocker. Binding was detected with peroxidase-linked streptavidin (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL) and SURE BLUE™
10 substrate (KPL Inc., Gaithersburg, MD).

[0280] In order to investigate the requirement for IL-13 to support resting IgE levels in naive mice, serum was examined in the absence of specific immunization from wild-type mice and from mice genetically deficient in IL-13 and IL-13Rα2. Mice deficient in IL-13 had virtually undetectable levels of serum IgE. In contrast, mice
15 lacking the inhibitory receptor IL-13Rα2 displayed elevated levels of serum IgE. These results demonstrate that blocking IL-13 can be useful for treating or preventing atopic disorders.

[0281] Example 7: IL-13 and Atopic Disorders

[0282] The ability of MJ2-7 to inhibit the bioactivity of native human IL-13 (at
20 1 ng/ml) was evaluated in an assay for STAT6 phosphorylation. MJ2-7 inhibited the activity of native human IL-13 with an IC50 of about 0.293 nM in this assay. An antibody with the murine heavy chain of MJ2-7 and a humanized light chain inhibited the activity of native human IL-13 with an IC50 of about 0.554 nM in this assay.[0283]

The ability of MJ2-7 to inhibit non-human primate IL-13 (at 1 ng/ml)
25 was evaluated in an assay for CD23 expression. The MJ2-7 inhibited the activity of non-human primate IL-13 with an IC50 of about 0.242 nM in this assay. An antibody with the murine heavy chain of MJ2-7 and a humanized light chain inhibited the activity of non-human primate IL-13 with an IC50 of about 0.308 nM in this assay.

[0284] Example 8: Nucleotide and amino acid sequences of mouse MJ 2-7
30 antibody

WO 2006/085938

PCT/US2005/021454

[0285] The nucleotide sequence encoding the heavy chain variable region (with an optional leader) is as follows:

```

1  ATGAAATGCA GCTGGGTTAT CTTCTTCCTG ATGGCAGTGG TTACAGGGGT
5  51  CAATTCAGAG GTTCAGCTGC AGCAGTCTGG GGCAGAGCTT GTGAAGCCAG
    101  GGGCCTCAGT CAAGTTGTCC TGCACAGGTT CTGGCTTCAA CATTAAAGAC
    151  ACCTATATAC ACTGGGTGAA GCAGAGGCCT GAACAGGGCC TGGAGTGGAT
10  201  TGGAAGGATT GATCCTGCGA ATGATAATAT TAAATATGAC CCGAAGTTCC
    251  AGGGCAAGGC CACTATAACA GCAGACACAT CCTCCAACAC AGCCTACCTA
    301  CAGCTCAACA GCCTGACATC TGAGGACACT GCCGTCTATT ACTGTGCTAG
    351  ATCTGAGGAA AATTGGTACG ACTTTTTTGA CTACTGGGGC CAAGGCACCA
    401  CTCTCACAGT CTCCTCA (SEQ ID NO:142)
20

```

[0286] The amino acid sequence of the heavy chain variable region with an optional leader (underscored) is as follows:

```

25  1  MKCSWVIFFL MAVVTGVNSE VQLQQSGAEL VKPGASVKLS CTGSGFNIKD
    51  TYIHWVKQRP EQGLEWIGRI DPANDNIKYD PKFQ GKATIT ADTSSNTAYL
    101  QLNSLTSEDV AVYYCARSEE NWYDFFDYWG QGTTLTVSS
30  (SEQ ID NO:143)

```

[0287] The nucleotide sequence encoding the light chain variable region is as follows:

```

1  ATGAAGTTGC CTGTTAGGCT GTTGGTGCTG ATGTTCTGGA TTCCTGCTTC
51  CAGCAGTGAT GTTTTGATGA CCCAAACTCC ACTCTCCCTG CCTGTCAGTC
40  101  TTGGAGATCA AGCCTCCATC TCTTGCAGGT CTAGTCAGAG CATTGTACAT
    151  AGTAATGGAA ACACCTATTT AGAATGGTAC CTGCAGAAAC CAGGCCAGTC
    201  TCCAAAGCTC CTGATCTACA AAGTTTCCAA CCGATTTTCT GGGGTCCCAG
45  251  ACAGGTTTCTG TGGCAGTGGA TCAGGGACAG ATTTACACT CAAGATTAGC
    301  AGAGTGGAGG CTGAGGATCT GGGAGTTTAT TACTGCTTTC AAGGTTTACA

```

351 TATTCCGTAC ACGTTCGGAG GGGGGACCAA GCTGGAAATA AAA (SEQ ID NO:144)

5 [0288] The amino acid sequence of the light chain variable region with an optional leader (underscored) is as follows:

1 MKLPVRLLVLMFWIPASSSD VLMTQTPLSL PVSLGDQASI SCRSSQSIVH
 51 SNGNTYLEWY LQKPGQSPKL LIYKVSNRFS GVPDRFSGSG SGTDFTLKIS
 10 101 RVEAEDLG VY YCFQGSHIPY TFGGGTKLEI K (SEQ ID NO:145)

15 [0289] Example 9: Nucleotide and amino acid sequences of exemplary first humanized variants of the MJ 2-7 antibody

[0290] Humanized antibody Version 1 (V1) is based on the closest human germline clones. The nucleotide sequence of hMJ 2-7 V1 heavy chain variable region (hMJ 2-7 VH V1) (with a sequence encoding an optional leader sequence) is as follows:

20 1 ATGGATTGGA CCTGGCGCAT CCTGTTCTCTG GTGGCCGCTG CCACCGGCGC
 51 TCACTCTCAG GTGCAGCTGG TGCAGTCTGG CGCCGAGGTG AAGAAGCCTG
 101 GCGCTTCCGT GAAGGTGTCC TGTAAGGCCT CCGGCTTCAA CATCAAGGAC
 25 151 ACCTACATCC ACTGGGTGCG GCAGGCTCCC GGCCAGCGGC TGGAGTGGAT
 201 GGGCCGGATC GATCCTGCCA ACGACAACAT CAAGTACGAC CCCAAGTTTC
 30 251 AGGGCCGCGT GACCATCACC CGCGATACCT CCGCTTCTAC CGCCTACATG
 301 GAGCTGTCTA GCCTGCGGAG CGAGGATACC GCCGTGTACT ACTGCGCCCCG
 351 CTCCGAGGAG AACTGGTACG ACTTCTTCGA CTACTGGGGC CAGGGCACCC
 35 401 TGGTGACCGT GTCCTCT (SEQ ID NO:146)

40 [0291] The amino acid sequence of the heavy chain variable region (hMJ 2-7 V1) is based on a CDR grafted to DP- 25, VH-I, 1-03. The amino acid sequence with an optional leader (first underscored region; CDRs based on AbM definition shown in subsequent underscored regions) is as follows:

1 MDWTWRILFL VAAATGAHS - Q VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGFTNIKD

51 TYIHWVRQAP GQRLEWMGRI DPANDNIKYD PKFOGRVTTT RDTSASTAYM
 101 ELSSLRSEDV AVYYCARSEE NWYDFDYWG QGTLVTVSSG ESCR (SEQ ID NO:147)

5 [0292] The nucleotide sequence of the hMJ 2-7 V1 light chain variable region (hMJ 2-7 VL V1) (with a sequence encoding an optional leader sequence) is as follows:

1 ATGCGGCTGC CCGCTCAGCT GCTGGGCCTG CTGATGCTGT GGGTGCCCGG
 10 51 CTCTTCCGGC GACGTGGTGA TGACCCAGTC CCCTCTGTCT CTGCCCGTGA
 101 CCCTGGGCCA GCGCGCTTCT ATCTCTTGCC GGTCTCTCCA GTCCATCGTG
 15 151 CACTCCAACG GCAACACCTA CCTGGAGTGG TTTCAGCAGA GACCCGGCCA
 201 GTCTCCTCGG CGGCTGATCT ACAAGGTGTC CAACCGCTTT TCCGGCGTGC
 251 CCGATCGGTT CTCCGGCAGC GGCTCCGGCA CCGATTTCAC CCTGAAGATC
 20 301 AGCCGCGTGG AGGCCGAGGA TGTGGGCGTG TACTACTGCT TCCAGGGCTC
 351 CCACATCCCT TACACCTTTG GCGGCGGAAC CAAGGTGGAG ATCAAG
 25 (SEQ ID NO:148)

[0293] This version is based on a CDR graft to DPK18, V kappaII. The amino acid sequence of hMJ 2-7 V1 light chain variable region (hMJ 2-7 VL V1) (with optional leader as first underscored region; CDRs based on AbM definition in subsequent underscored regions) is as follows:

1 MRLPAOLLGL LMLWVPGSSG -DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCRSSQSIV
 51 HSNGNTYLEW FQQRPGQSPR RLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI
 35 101 SRVEAEDVGV YYCFOGSHIP YTFGGGTKVE IK (SEQ ID NO:149)

[0294] Example 10: Nucleotide and amino acid sequences of exemplary second humanized variants of the MJ 2-7 antibody

40 [0295] The following heavy chain variable region is based on a CDR graft to DP-54, VH-3, 3-07. The nucleotide sequence of hMJ 2-7 Version 2 (V2) heavy chain variable region (hMJ 2-7 VH V2) (with a sequence encoding an optional leader sequence) is as follows.

1 ATGGAGCTGG GCCTGTCTTG GGTGTTCTTG GTGGCTATCC TGGAGGGCGT
 51 GCAGTGCGAG GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG CGGCGGACTG GTGCAGCCTG
 5 101 GCGGCTCTCT GCGGCTGTCT TGCGCCGCTT CCGGCTTCAA CATCAAGGAC
 151 ACCTACATCC ACTGGGTGCG GCAGGCTCCC GGCAAGGGCC TGGAGTGGGT
 201 GGCCCGGATC GATCCTGCCA ACGACAACAT CAAGTACGAC CCCAAGTTCC
 10 251 AGGGCCGGTT CACCATCTCT CGCGACAACG CCAAGAACTC CCTGTACCTC
 301 CAGATGAACT CTCTGCGCGC CGAGGATACC GCCGTGTACT ACTGCGCCCG
 15 351 GAGCGAGGAG AACTGGTACG ACTTCTTCGA CTACTGGGGC CAGGGCACCC
 401 TGGTGACCGT GTCCTCT (SEQ ID NO:150)

[0296] The amino acid sequence of hMJ 2-7 V2 heavy chain variable region
 20 (hMJ 2-7 VH V2) with an optional leader (first underscored region; CDRs based on
 AbM definition shown in subsequent underscored regions) is as follows:

1 MELGLSWVFL VAILEGVQC- E VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFNIKD
 51 TYIHWVRQAP GKGLEWVARI DPANDNIKYD PKFOGRFTIS RDNAKNSLYL
 25 101 QMNSLRAEDT:AVYYCARSEE NWYDFFDYWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO:151)

[0297] The hMJ 2-7 V2 light chain variable region was based on a CDR graft to
 30 DPK9, V kappaI, 02. The nucleotide sequence of hMJ 2-7 V2 light chain variable
 region (hMJ 2-7 VL V2) (with a sequence encoding an optional leader sequence) is as
 follows:

1 ATGGATATGC GCGTGCCCGC TCAGCTGCTG GGCCTGCTGC TGCTGTGGCT
 35 51 GCGCGGAGCC CGCTGCGATA TCCAGATGAC CCAGTCCCCT TCTTCTCTGT
 101 CCGCCTCTGT GGGCGATCGC GTGACCATCA CCTGTCGGTC CTCCCAGTCC
 151 ATCGTGCACT CCAACGGCAA CACCTACCTG GAGTGGTATC AGCAGAAGCC
 40 201 CGGCAAGGCC CCTAAGCTGC TGATCTACAA GGTGTCCAAC CGCTTTTCCG
 251 GCGTGCCTTC TCGGTTCTCC GGCTCCGGCT CCGGCACCGA TTTCACCCTG
 45 301 ACCATCTCCT CCCTCCAGCC CGAGGATTTC GCCACCTACT ACTGCTTCCA
 351 GGGCTCCCAC ATCCCTTACA CCTTTGGCGG CGGAACCAAG GTGGAGATCA
 401 AGCGT (SEQ ID NO:152)

50

nn101 101

[0298] The amino acid sequence of the light chain variable region of hMJ 2-7 V2 light chain variable region (hMJ 2-7 VL V2) (with optional leader peptide underscored and CDRs based on AbM definition shown in subsequent underscored regions) is as follows:

1 MDMRVPAOLL GLLLWLRGA RC -DIQMTQSP SLSASVGDR VTITCRSSOS
51 IVHSNGNTYL EWYQKPGKA PKLLIYKVSN RFSGVPSRFS GSGSGTDFTL
10 101 TISSLQPEDF ATYYCFOGSH IPYTFGGGK VEIKR (SEQ ID NO:153)

[0299] Additional humanized versions of MJ 2-7 V2 heavy chain variable region were made. These versions included backmutations that have murine amino acids at selected framework positions.

[0300] The nucleotide sequence encoding the heavy chain variable region "Version 2.1" or V2.1 with the back mutations V48I,A29G is as follows:

1 GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGCGGCGGA CTGGTGCAGC CTGGCGGCTC
20 51 TCTGCGGCTG TCTTGCGCCG CTTCCGGCTT CAACATCAAG GACACCTACA
101 TCCACTGGGT GCGGCAGGCT CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GATCGGCCGG
151 ATCGATCCTG CCAACGACAA CATCAAGTAC GACCCCAAGT TCCAGGGCCG
25 201 GTTCACCATC TCTCGCGACA ACGCCAAGAA CTCCCTGTAC CTCCAGATGA
251 ACTCTCTGCG CGCCGAGGAT ACCGCCGTGT ACTACTGCGC CCGGAGCGAG
30 301 GAGAACTGGT ACGACTTCTT CGACTACTGG GGCCAGGGCA CCCTGGTGAC
351 CGTGTCTCT (SEQ ID NO:154)

35 [0301] The amino acid sequence of the heavy chain variable region of V2.1 (CDRs based on AbM definition shown in subsequent underscored regions) is as follows:

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWIGR
40 51 IDPANDNIKY DPKFOGRFTI SRD~~NA~~KNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARSE
101 ENWYDFFDYW GQGT~~L~~VTVSS (SEQ ID NO:155)

45

[0302] The nucleotide sequence encoding the heavy chain variable region V2.2 with the back mutations (*R67K;F68A*) is as follows:

5
1 GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGCGGCGGA CTGGTGCAGC CTGGCGGCTC
51 TCTGOGGCTG TCTTGCGCCG CTTCGGGCTT CAACATCAAG GACACCTACA
10 101 TCCACTGGGT GCGGCAGGCT CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GGTGGCCCGG
151 ATCGATCCTG CCAACGACAA CATCAAGTAC GACCCCAAGT TCCAGGGCAA
201 GGCCACCATC TCTCGCGACA ACGCCAAGAA CTCCCTGTAC CTCCAGATGA
15 251 ACTCTCTGCG CGCCGAGGAT ACCGCCGTGT ACTACTGCGC CCGGAGCGAG
301 GAGAACTGGT ACGACTTCTT CGACTACTGG GGCCAGGGCA CCCTGGTGAC
20 351 CGTGTCTCT (SEQ ID NO:156)

[0303] The amino acid sequence of the heavy chain variable region of V2.2 (CDRs based on AbM definition shown in subsequent underscored regions) is as follows:

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR
51 IDPANDNIKY DPKFOGKATI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARSE
30 102 ENWYDFFDYW GQGTLLTVSS (SEQ ID NO:157)

[0304] The nucleotide sequence encoding the heavy chain variable region V2.3 with the back mutations (*R72A*):

1 GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGCGGCGGA CTGGTGCAGC CTGGCGGCTC
51 TCTGCGGCTG TCTTGCGCCG CTTCGGGCTT CAACATCAAG GACACCTACA
40 101 TCCACTGGGT GCGGCAGGCT CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GGTGGCCCGG
151 ATCGATCCTG CCAACGACAA CATCAAGTAC GACCCCAAGT TCCAGGGCCG
45 201 GTTCACCATC TCTGCCGACA ACGCCAAGAA CTCCCTGTAC CTCCAGATGA
251 ACTCTCTGCG CGCCGAGGAT ACCGCCGTGT ACTACTGCGC CCGGAGCGAG
301 GAGAACTGGT ACGACTTCTT CGACTACTGG GGCCAGGGCA CCCTGGTGAC

WO 2006/085938

PCT/US2005/021454

351 CGTGTCTCT (SEQ ID NO:158)

- 5 [0305] The amino acid sequence of the heavy chain variable region of V2.3 (CDRs based on AbM definition shown in subsequent underscored regions) is as follows:

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR
10 51 IDPANDNIKY DPKFOGRFTI SADNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARSE
103 ENWYDFFDYW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO:159)

- 15 [0306] The nucleotide sequence encoding the heavy chain variable region V2.4 with the back mutations (A49G) is as follows:

1 GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGCGGCGGA CTGGTGCAGC CTGGCGGCTC
20 51 TCTGCGGCTG TCTTGCGCCG CTTCGGCTT CAACATCAAG GACACCTACA
101 TCCACTGGGT GCGGCAGGCT CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GGTGGGCGCG
151 ATCGATCCTG CCAACGACAA CATCAAGTAC GACCCCAAGT TCCAGGGCCG
25 201 GTTCACCATC TCTCGGACA ACGCCAAGAA CTCCCTGTAC CTCCAGATGA
251 ACTCTCTGCG CGCCGAGGAT ACCGCCGTGT ACTACTGCGC CCGGAGCGAG
301 GAGAACTGGT ACGACTTCTT CGACTACTGG GGCCAGGGCA CCCTGGTGAC
30 351 CGTGTCTCT (SEQ ID NO:160)

- [0307] The amino acid sequence of the heavy chain variable region of V2.4 (CDRs based on AbM definition shown in subsequent underscored regions) is as follows:

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVGR
40 51 IDPANDNIKY DPKFOGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARSE
104 ENWYDFFDYW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO:161)

- [0308] The nucleotide sequence encoding the heavy chain variable region V2.5 with the back mutations (R67K;F68A;R72A) is as follows:

104

00104

WO 2006/085938

PCT/US2005/021454

1 GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGCGGCGGA CTGGTGCAGC CTGGCGGCTC
51 TCTGCGGCTG TCTTGCGCCG CTTCCGGCTT CAACATCAAG GACACCTACA
5 101 TCCACTGGGT GCGGCAGGCT CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GGTGGCCCGG
151 ATCGATCCTG CCAACGACAA CATCAAGTAC GACCCCAAGT TCCAGGGCAA
201 GGCCACCATC TCTGCCGACA ACGCCAAGAA CTCCTGTAC CTCCAGATGA
10 251 ACTCTCTGCG CGCCGAGGAT ACCGCCGTGT ACTACTGCGC CCGGAGCGAG
301 GAGAACTGGT ACGACTTCTT CGACTACTGG GGCCAGGGCA CCCTGGTGAC
15 352 CGTGTCTCT (SEQ ID NO:162)

[0309] The amino acid sequence of the heavy chain variable region of V2.5
(CDRs based on AbM definition shown in subsequent underscored regions) is as
20 follows:

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR
51 IDFANDNIKY DPKFOGKATI SADNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARSE
25 105 ENWYDFFDYW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO:163)

[0310] The nucleotide sequence encoding the heavy chain variable region V2.6
with the back mutations (V48I;A49G;R72A) is as follows:

30 1 GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGCGGCGGA CTGGTGCAGC CTGGCGGCTC
51 TCTGCGGCTG TCTTGCGCCG CTTCCGGCTT CAACATCAAG GACACCTACA
101 TCCACTGGGT GCGGCAGGCT CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GATCGGCCCG
35 151 ATCGATCCTG CCAACGACAA CATCAAGTAC GACCCCAAGT TCCAGGGCCG
201 GTTCACCATC TCTGCCGACA ACGCCAAGAA CTCCTGTAC CTCCAGATGA
40 251 ACTCTCTGCG CGCCGAGGAT ACCGCCGTGT ACTACTGCGC CCGGAGCGAG
301 GAGAACTGGT ACGACTTCTT CGACTACTGG GGCCAGGGCA CCCTGGTGAC
45 351 CGTGTCTCT (SEQ ID NO:164)

[0311] The amino acid sequence of the heavy chain variable region of V2.6
(CDRs based on AbM definition shown in subsequent underscored regions) is as
follows:

105
nn105

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWIGR
51 IDPANDNIKY DPKFOGRFTI SADNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARSE
5 106 ENWYDFFDYW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO:165)

[0312] The nucleotide sequence encoding the heavy chain variable region V2.7 with the back mutations (A49G;R72A) is as follows:

10 1 GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGCGGCGGA CTGGTGCAGC CTGGCGGCTC
51 TCTGCGGCTG TCTTGCGCCG CTTCCGGCTT CAACATCAAG GACACCTACA
101 TCCACTGGGT GCGGCAGGCT CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GGTGGGCCCG
15 151 ATCGATCCTG CCAACGACAA CATCAAGTAC GACCCCAAGT TCCAGGGCCG
201 GTTCACCATC TCTGCGGACA ACGCCAAGAA CTCCTGTAC CTCCAGATGA
20 251 ACTCTCTGCG CGCCGAGGAT ACCGCCGTGT ACTACTGCGC CCGGAGCGAG
301 GAGAACTGGT ACGACTTCTT CGACTACTGG GGCCAGGGCA CCCTGGTGAC
351 CGTGTCTCT (SEQ ID NO:166)
25

[0313] The amino acid sequence of the heavy chain variable region of V2.7 (CDRs based on AbM definition shown in subsequent underscored regions) is as follows:

30 1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVGR
51 IDPANDNIKY DPKFOGRFTI SADNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARSE
107 ENWYDFFDYW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO:167)
35

[0314] The nucleotide sequence encoding the heavy chain variable region V2.8 with the back mutations (L79A) is as follows:

40 1 GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGCGGCGGA CTGGTGCAGC CTGGCGGCTC
51 TCTGCGGCTG TCTTGCGCCG CTTCCGGCTT CAACATCAAG GACACCTACA
101 TCCACTGGGT GCGGCAGGCT CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GGTGGGCCCG
45 151 ATCGATCCTG CCAACGACAA CATCAAGTAC GACCCCAAGT TCCAGGGCCG
201 GTTCACCATC TCTGCGGACA ACGCCAAGAA CTCGCCTAC CTCCAGATGA
251 ACTCTCTGCG CGCCGAGGAT ACCGCCGTGT ACTACTGCGC CCGGAGCGAG

301 GAGAACTGGT ACGACTTCTT CGACTACTGG GGCCAGGGCA CCCTGGTGAC

351 CGTGTCTCT (SEQ ID NO:168)

5

[0315] The amino acid sequence of the heavy chain variable region of V2.8 (CDRs based on AbM definition shown in subsequent underscored regions) is as follows:

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR
10 51 IDPANDNIKY DPKFOGRFTI SRDNAKNSAY LQMNSLRAED TAVYYCARSE
108 ENWYDFFDYW GQGLVTVSS (SEQ ID NO:169)

15

[0316] The nucleotide sequence encoding the heavy chain variable region V2.10 with the back mutations (A49G;R72A;L79A) is as follows:

1 GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGCGGCGGA CTGGTGCAGC CTGGCGGCTC
20 51 TCTGCGGCTG TCTTGCGCCG CTCCGGCTT CAACATCAAG GACACCTACA
101 TCCACTGGGT GCGGCAGGCT CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GGTGGGCCCG
151 ATCGATCTG CCAACGACAA CATCAAGTAC GACCCCAAGT TCCAGGGCCG
25 201 GTTCAACATC TCTGCCGACA ACGCCAAGAA CTCCGCCTAC CTCCAGATGA
251 ACTCTCTGCG CGCCGAGGAT ACCGCCGTGT ACTACTGCGC CCGGAGCGAG
30 301 GAGAACTGGT ACGACTTCTT CGACTACTGG GGCCAGGGCA CCCTGGTGAC
351 CGTGTCTCT (SEQ ID NO:170)

35 [0317] The amino acid sequence of the heavy chain variable region of V2.10 (CDRs based on AbM definition shown in subsequent underscored regions) is as follows:

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVGR
40 51 IDPANDNIKY DPKFOGRFTI SADNAKNSAY LQMNSLRAED TAVYYCARSE
109 ENWYDFFDYW GQGLVTVSS (SEQ ID NO:171)

45 [0318] The nucleotide sequence encoding the heavy chain variable region V2.11 with the back mutations (V48I;A49G;R72A;L79A) is as follows:

107

nn107

WO 2006/085938

PCT/US2005/021454

1 GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGCGGCGGA CTGGTGCAGC CTGGCGGCTC
 51 TCTGCGGCTG TCTTGCGCCG CTTCGGGCTT CAACATCAAG GACACCTACA
 5 101 TCCACTGGGT GCGGCAGGCT CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GATCGGCCCG
 151 ATCGATCCTG CCAACGACAA CATCAAGTAC GACCCCAAGT TCCAGGGCCG
 201 GTTCACCATC TCTGCCGACA ACGCCAAGAA CTCCGCCTAC CTCCAGATGA
 10 251 ACTCTCTGCG CGCCGAGGAT ACCGCCGTGT ACTACTGCGC CCGGAGCGAG
 301 GAGAACTGGT ACGACTTCTT CGACTACTGG GGCCAGGGCA CCCTGGTGAC
 15 351 CGTGTCTCT (SEQ ID NO:172)

[0319] The amino acid sequence of the heavy chain variable region of V2.11
 (CDRs based on AbM definition shown in subsequent underscored regions) is as
 20 follows:

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWIGR
 51 IDPANDNIKY DPKFOGRFTI SADNAKNSAY LQMNSLRAED TAVYYCARSE
 25 110 ENWYDFFDYW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO:173)

[0320] The nucleotide sequence encoding the heavy chain variable region
 V2.16 with the back mutations (V48I;A49G;R72A) is as follows:

30 1 GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGCGGCGGA CTGGTGCAGC CTGGCGGCTC
 51 TCTGCGGCTG TCTTGACCG GCTTCGGGCTT CAACATCAAG GACACCTACA
 101 TCCACTGGGT GCGGCAGGCT CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GATCGGCCCG
 35 151 ATCGATCCTG CCAACGACAA CATCAAGTAC GACCCCAAGT TCCAGGGCCG
 201 GTTCACCATC TCTGCCGACA ACGCCAAGAA CTCCCTGTAC CTCCAGATGA
 40 251 ACTCTCTGCG CGCCGAGGAT ACCGCCGTGT ACTACTGCGC CCGGAGCGAG
 301 GAGAACTGGT ACGACTTCTT CGACTACTGG GGCCAGGGCA CCCTGGTGAC
 351 CGTGTCTCT (SEQ ID NO:174)
 45

[0321] The amino acid sequence of the heavy chain variable region of V2.16
 (CDRs based on AbM definition shown in subsequent underscored regions) is as
 follows:

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCTGSGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWIGR
51 IDPANDNIKY DPKFOGRFTI SADNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARSE
5 111 ENWYDFFDYW GQGLTVTVSS (SEQ ID NO:175)

[0322] The following is the amino acid sequence of a humanized MH 2-7 V2.11 IgG1 with a mutated CH2 domain:

10 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWIGRIDP
ANDNIKYDPKFQGRFTISADNAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSEENWYD
FFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEALGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
15 DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:176)

20 [0323] The variable domain is at amino acids 1-120; CH1 at 121-218; hinge at 219-233; CH2 at 234-343; and CH3 at 344-450. The light chain includes the following sequence with variable domain at 1-133.

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSIVHSNGNTYLEWYQQKPGKAPKLLIY
KVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCFQGSHIPYTFGGGTKV
25 EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSSTLSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC (SEQ ID NO:177)

[0324] Example 11: Functional Assays of Exemplary Variants of MJ2-7

30 [0325] We evaluated the ability of the MJ2-7 antibody and humanized variants to inhibit human IL-13 in assays for IL-13 activity.

[0326] *STAT6 phosphorylation assay.*

[0327] HT-29 human colonic epithelial cells (ATCC) were grown as an adherent monolayer in McCoy's 5A medium containing 10% FBS, Pen-Strep, glutamine, and sodium bicarbonate. For assay, the cells were dislodged from the flask using trypsin, washed into fresh medium, and distributed into 12x75 mm polystyrene
5 tubes. Recombinant human IL-13 (R&D Systems, Inc.) was added at concentrations ranging from 100 – 0.01 ng/ml. For assays testing the ability of antibody to inhibit the IL-13 response, 1 ng/ml recombinant human IL-13 was added along with dilutions of antibody ranging from 500 – 0.4 ng/ml. Cells were incubated in a 37°C water bath for 30- 60 minutes, then washed into ice-cold PBS containing 1% BSA. Cells were fixed
10 by incubating in 1% paraformaldehyde in PBS for 15 minutes at 37°C, then washed into PBS containing 1% BSA. To permeabilize the nucleus, cells were incubated overnight at -20°C in absolute methanol. They were washed into PBS containing 1% BSA, then stained with ALEXA™ Fluor 488-labeled antibody to STAT6 (BD Biosciences). Fluorescence was analyzed with a FACSCAN™ and CELLQUEST™
15 software (BD Biosciences).

[0328] *CD23 induction on human monocytes*

[0329] Mononuclear cells were isolated from human peripheral blood by layering over HISTOPAQUE® (Sigma). Cells were washed into RPMI containing 10% heat-inactivated FCS, 50 U/ml penicillin, 50 mg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine,
20 and plated in a 48-well tissue culture plate (Costar/Corning). Recombinant human IL-13 (R&D Systems, Inc.) was added at dilutions ranging from 100 – 0.01 ng/ml. For assays testing the ability of antibody to inhibit the IL-13 response, 1 ng/ml recombinant human IL-13 was added along with dilutions of antibody ranging from 500 – 0.4 ng/ml. Cells were incubated overnight at 37°C in a 5% CO₂ incubator. The next day, cells
25 were harvested from wells using non-enzymatic Cell Dissociation Solution (Sigma), then washed into ice-cold PBS containing 1% BSA. Cells were incubated with phycoerythrin (PE)-labeled antibody to human CD23 (BD Biosciences, San Diego, CA), and Cy-Chrome-labeled antibody to human CD11b (BD Biosciences). Monocytes were gated based on high forward and side light scatter, and expression of
30 CD11b. CD23 expression on monocytes was determined by flow cytometry using a FACSCAN™ (BD Biosciences), and the percentage of CD23⁺ cells was analyzed with CELLQUEST™ software (BD Biosciences).

no 110
(10)

[0330] *TF-1 cell proliferation*

[0331] TF-1 cells are a factor-dependent human hemopoietic cell line requiring interleukin 3 (IL-3) or granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) for their long-term growth. TF-1 cells also respond to a variety of other cytokines, including interleukin 13 (IL-13). TF-1 cells (ATCC) were maintained in RPMI medium containing 10% heat-inactivated FCS, 50 U/ml penicillin, 50 mg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine, and 5 ng/ml recombinant human GM-CSF (R&D Systems). Prior to assay, cells were starved of GM-CSF overnight. For assay, TF-1 cells were plated in duplicate at 5000 cells / well in 96-well flat-bottom microtiter plates (Costar/Corning), and challenged with human IL-13 (R&D Systems), ranging from 100 – 0.01 ng/ml. After 72 hours in a 37 °C incubator with 5% CO₂, the cells were pulsed with 1 µCi / well ³H-thymidine (Perkin Elmer / New England Nuclear). They were incubated an additional 4.5 hours, then cells were harvested onto filter mats using a TOMTEK™ harvester. ³H-thymidine incorporation was assessed by liquid scintillation counting.

[0332] *Tenascin production assay*

[0333] BEAS-2B human bronchial epithelial cells (ATCC) were maintained BEGM media with supplements (Clonetics). Cells were plated at 20,000 per well in a 96-well flat-bottom culture plate overnight. Fresh media is added containing IL-13 in the presence or absence of the indicated antibody. After overnight incubation, the supernatants are harvested, and assayed for the presence of the extracellular matrix component, tenascin C, by ELISA. ELISA plates are coated overnight with 1 µg/ml of murine monoclonal antibody to human tenascin (IgG1, k; Chemicon International) in PBS. Plates are washed with PBS containing 0.05% TWEEN®-20 (PBS-Tween), and blocked with PBS containing 1% BSA. Fresh blocking solution was added every 6 minutes for a total of three changes. Plates were washed 3X with PBS-Tween. Cell supernatants or human tenascin standard (Chemicon International) were added and incubated for 60 minutes at 37 °C. Plates were washed 3X with PBS-Tween. Tenascin was detected with murine monoclonal antibody to tenascin (IgG2a, k; Biohit). Binding was detected with HRP-labeled antibody to mouse IgG2a, followed by TMB substrate. The reaction was stopped with 0.01 N sulfuric acid. Absorbance was read at 450 nm.

[0334] The HT 29 human epithelial cell line can be used to assay STAT6 phosphorylation. HT 29 cells are incubated with 1 ng/ml native human IL-13 crude preparation in the presence of increasing concentrations of the test antibody for 30 minutes at 37 °C. Western blot analysis of cell lysates with an antibody to phosphorylated STAT6 can be used to detect dose-dependent IL-13-mediated phosphorylation of STAT6. Similarly, flow cytometric analysis can detect phosphorylated STAT6 in HT 29 cells that were treated with a saturating concentration of IL-13 for 30 minutes at 37 °C, fixed, permeabilized, and stained with an ALEXA™ Fluor 488-labeled mAb to phospho-STAT6. An exemplary set of results is set forth in the Table 1. The inhibitory activity of V2.11 was comparable to that of sIL-13Ra2-Fc.

[0335] Table 1

Construct		Backmutations	Expression	Native hIL-13
VH	VL	VH	µg/ml / COS; 48h	STAT6 assay IC 50, nM
V2.0	V2 CDR graft	None, CDR grafted	8-10	>100
V 2.1	V2	V48I; A49G	9-14	2.8
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

[0336] Example 12: Binding Interaction Site Between IL-13 and IL-13Ra1

[0337] A complex of IL-13, the extracellular domain of IL-13Ra1 (residues 27-342 of SEQ ID NO:125), and an antibody that binds human IL-13 was studied by x-ray crystallography. See, e.g., Ap. 16163-029001. Two points of substantial interaction were found between IL-13 and IL-13Ra1. The interaction between Ig domain 1 of IL-13Ra1 and IL-13 results in the formation of an extended beta sheet spanning the two molecules. Residues Thr88 [Thr107], Lys89 [Lys108], Ile90 [Ile109], and Glu91

[Glu110] of IL-13 (SEQ ID NO:124, mature sequence [full-length sequence (SEQ ID NO:178)]) form a beta strand that interacts with residues Lys76, Lys77, Ile78 and Ala79 of the receptor (SEQ ID NO:125). Additionally, the side chain of Met33 [Met52] of IL-13 (SEQ ID NO:124 [SEQ ID NO:178]) extends into a hydrophobic
5 pocket that is created by the side chains of these adjoining strands.

[0338] The predominant feature of the interaction with Ig domain 3 is the insertion of a hydrophobic residue (Phe107 [Phe126]) of IL-13 (SEQ ID NO:124 [SEQ ID NO:178]) into a hydrophobic pocket in Ig domain 3 of the receptor IL-13R α 1. The hydrophobic pocket of IL-13R α 1 is formed by the side chains of residues Leu319,
10 Cys257, Arg256, and Cys320 (SEQ ID NO:125). The interaction with Phe107 [Phe126] of IL-13 (SEQ ID NO:124 [SEQ ID NO:178]) results in an extensive set of van der Waals interactions between amino acid residues Ile254, Ser255, Arg256, Lys318, Cys320, and Tyr321 of IL-13R α 1 (SEQ ID NO:125) and amino acid residues Arg11 [Arg30], Glu12 [Glu31], Leu13 [Leu32], Ile14 [Ile33], Glu15 [Ile34], Lys104
15 [Lys123], Lys105 [Lys124], Leu106 [Leu125], Phe107 [Phe126], and Arg108 [Arg127] of IL-13 (SEQ ID NO:124 [SEQ ID NO:178]). These results demonstrate that an IL-13 binding agent that binds to the regions of IL-13 involved in interaction with IL-13R α 1 can be used to inhibit IL-13 signaling.

[0339] Example 13: Expression of humanized MJ 2-7 antibody in COS cells

20 [0340] To evaluate the production of chimeric anti-NHP IL13 antibodies in the mammalian recombinant system, the variable regions of mouse MJ 2-7 antibody were subcloned into a pED6 expression vector containing human kappa and IgG1 mut constant regions. Monkey kidney COS-1 cells were grown in DME media (Gibco) containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 1 mM glutamine and 0.1 mg/ml
25 Penicillin/ Streptomycin. Transfection of COS cells was performed using TRANSITITTM-LT1 Transfection reagent (Mirus) according to the protocol suggested by the reagent supplier. Transfected COS cells were incubated for 24 hours at 37 °C in the presence of 10% CO₂, washed with sterile PBS, and then grown in serum-free media R1CD1 (Gibco) for 48 hours to allow antibody secretion and accumulation in the
30 conditioned media. The expression of chMJ 2-7 antibody was quantified by total human IgG ELISA using purified human IgG1/kappa antibody as a standard.

00113 113

[0341] The production of chimeric MJ 2-7 antibody in COS cells was significantly lower than the control chimeric antibody (Table 2). Therefore, optimization of Ab expression was included in the MJ 2-7 humanization process. The humanized MJ 2-7 V1 was constructed by CDR grafting of mouse MJ 2-7 heavy chain CDRs onto the most homologous human germline clone, DP 25, which is well expressed and represented in typical human antibody response. The CDRs of light chain were subcloned onto human germline clone DPK 18 in order to generate huMJ 2-7 V1 VL. The humanized MJ 2-7 V2 was made by CDR grafting of CDRs MJ 2-7 heavy chain variable region onto DP54 human germline gene framework and CDRs of MJ 2-7 light chain variable region onto DPK9 human germline gene framework. The DP 54 clone belongs to human VH III germline subgroup and DPK9 is from the V kappa I subgroup of human germline genes. Antibody molecules that include VH III and V kappa I frameworks have high expression level in *E. coli* system and possess high stability and solubility in aqueous solutions (see, e.g., Stefan Ewert et al., *J. Mol. Biol.* (2003), 325; 531-553, Adrian Auf et al., *Methods* (2004) 34:215-224). We have used the combination of DP54/DPK9 human frameworks in the production of several recombinant antibodies and have achieved a high expression of antibody (> 20 µg/ml) in the transient COS transfection experiments.

[0342] **Table 2**

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

20

[0343] The CDR grafted MJ 2-7 V1 and V2 VH and VL genes were subcloned into two mammalian expression vector systems (pED6kappa/pED6 IgG1mut and pSMEN2kappa/ pSMED2IgG1mut), and the production of humanized MJ 2-7 antibodies was evaluated in transient COS transfection experiments as described above. In the first set of the experiments the effect of various combinations of huMJ 2-7 VL and VH on the antibody expression was evaluated (Table 3). Changing of MJ 2-7 VL

25

framework regions to DKP9 increased the antibody production 8-10 fold, whereas VL V1 (CDR grafted onto DPK 18) showed only a moderate increase in antibody production. This effect was observed when humanized VL was combined with chimeric MJ 2-7 VH and humanized MJ 2-7 V1 and V2. The CDR grafted MJ 2-7 V2 had a 3-fold higher expression level then CDR grafted MJ 2-7 V1 in the same assay conditions.

[0344] Table 3

mAb	Expression, $\mu\text{g/ml}$
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
mVH / hVL-V2	18.41
hVH-V2 / hVL-V1	5.13
hVH-V2 / hVL-V2	10.79

[0345] Similar experiments were performed with huMJ 2-7 V2 containing back mutations in the heavy chain variable regions (Table 4). The highest expression level was detected for huMJ 2-7 V2.11 that retained the antigen binding and neutralization properties of mouse MJ 2-7 antibody. Introduction of back mutations at the positions 48 and 49 (V48I and A49G) increased the production of huMJ 2-7 V2 antibody in COS cells, whereas the back mutations of amino acids at the positions 23, 24, 67 and 68 (A23T; A24G; R67K and F68A) had a negative impact on antibody expression.

[0346] Table 4

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

[0347] Example 14: Evaluation of antigen binding properties of humanized MJ 2-7 antibodies by NHP IL-13 FLAG ELISA

5 [0348] The ability of fully humanized MJ 2-7 mAb (V1, V2 v2) to compete with biotinylated mouse MJ 2-7 Ab for binding to NHP IL-13-FLAG was evaluated by ELISA. The microtiter plates (Costar) were coated with 1µg/ml of anti-FLAG monoclonal antibody M2 (Sigma). The FLAG NHP IL-13 protein at concentration of 10 ng/ml was mixed with 10 ng/ml of biotin labeled mouse MJ 2-7 antibody and
10 various concentrations of unlabeled mouse and humanized MJ 2-7 antibody. The mixture was incubated for 2 hours at room temperature and then added to the anti-FLAG antibody-coated plate. Binding of FLAG NHP-IL-13/ bioMJ2-7 Ab complexes was detected with streptavidin-HRP and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). The humanized MJ 2-7 V2 significantly lost activity whereas huMJ 2-7 V2.11 completely
15 restored the antigen binding activity and was capable of competing with biotinylated MJ 2-7 mAb for binding to FLAG-NHP IL-13. BIACORE™ analysis also confirmed that NHP IL-13 had rapid binding to and slow dissociation to immobilized h1uMJ 2-7 v2.11.

no 116

[0349] Example 15: Molecular modeling of humanized MJ2-7 V2VH

[0350] Structure templates for modeling humanized MJ2-7 heavy chain version 2 (MJ2-7 V2VH) were selected based on BLAST homology searches against Protein Data Bank (PDB). Besides the two structures selected from the BLAST search output,

5 an additional template was selected from an in-house database of protein structures. Model of MJ2-7 V2VH was built using the three template structures 1JPS (co-crystal structure of human tissue factor in complex with humanized Fab D3h44), 1N8Z (co-crystal structure of human Her2 in complex with Herceptin Fab) and F13.2 (IL-13 in complex with mouse antibody Fab fragment) as templates and the Homology module of

10 InsightII (Accelrys, San Diego). The structurally conserved regions (SCRs) of 1JPS, 1N8Z and F13.2 (available from Ap. 16163-029001))were determined based on the C α distance matrix for each molecule and the template structures were superimposed based on minimum RMS deviation of corresponding atoms in SCRs. The sequence of the target protein MJ2-7 V2VH was aligned to the sequences of the superimposed

15 templates proteins and coordinates of the SCRs were assigned to the corresponding residues of the target protein. Based on the degree of sequence similarity between the target and the templates in each of the SCRs, coordinates from different templates were used for different SCRs. Coordinates for loops and variable regions not included in the SCRs were generated by Search Loop or Generate Loop methods as implemented in

20 Homology module. Briefly, Search Loop method scans protein structures that would fit properly between two SCRs by comparing the C α distance matrix of flanking SCR residues with a pre-calculated matrix derived from protein structures that have the same number of flanking residues and an intervening peptide segment of a given length. Generate Loop method that generate atom coordinates de novo was used in those cases

25 where Search Loops did not produce desired results. Conformation of amino acid side chains was kept the same as that in the template if the amino acid residue was identical in the template and the target. However, a conformational search of rotamers was done and the energetically most favorable conformation was retained for those residues that are not identical in the template and target. This was followed by Splice Repair that

30 sets up a molecular mechanics simulation to derive proper bond lengths and bond angles at junctions between two SCRs or between SCR and a variable region. Finally the model was subjected to energy minimization using Steepest Descents algorithm

117

00117

until a maximum derivative of 5 kcal/(mol Å) or 500 cycles and Conjugate Gradients algorithm until a maximum derivative of 5 kcal/(mol Å) or 2000 cycles. Quality of the model was evaluated using ProStat/Struct_Check command.

[0351] Molecular model of mouse MJ2-7 VH was built by following the
5 procedure described for humanized MJ2-7 V2VH except the templates used were 1QBL and 1QBM, crystal structures for horse anti-cytochrome c antibody FabE8.

[0352] Potential differences in CDR-Framework H-bonds predicted by the models

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

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

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

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

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

These differences suggested the following optional back mutations: A23T, A24G and
15 V48I.

[0353] Other optional back mutations suggested based on significant RMS deviation of individual amino acids and differences in amino acid residues adjacent to these are: G9A, L115T and R87T.

20 [0354] Example 16: IL-13 neutralization activity of MJ2-7 and C65

[0355] The IL-13 neutralization capacities of MJ2-7 and C65 were tested in a series of bioassays. First, the ability of these antibodies to neutralize the bioactivity of NHP IL-13 was tested in a monocyte CD23 expression assay. Freshly isolated human PBMC were incubated overnight with 3 ng/ml NHP IL-13 in the presence of increasing
25 concentrations of MJ2-7, C65, or sIL-13Rα2-Fc. Cells were harvested, stained with CYCHROME™-labeled antibody to the monocyte-specific marker, CD11b, and with

PE-labeled antibody to CD23. In response to IL-13 treatment, CD23 expression is up-regulated on the surface of monocytes, which were gated based on expression of CD11b. MJ2-7, C65, and sIL13R α 2-Fc all were able to neutralize the activity of NHP IL-13 in this assay. The potencies of MJ2-7 and sIL-13R α 2-Fc were equivalent. C65 was approximately 20-fold less active (FIG. 2).

[0356] In a second bioassay, the neutralization capacities of MJ2-7 and C65 for native human IL-13 were tested in a STAT6 phosphorylation assay. The HT-29 epithelial cell line was incubated with 0.3 ng/ml native human IL-13 in the presence of increasing concentrations of MJ2-7, C65, or sIL-13R α 2-Fc, for 30 minutes at 37 °C. Cells were fixed, permeabilized, and stained with ALEXA™ Fluor 488-labeled antibody to phosphorylated STAT6. IL-13 treatment stimulated STAT6 phosphorylation. MJ2-7, C65, and sIL13R α 2-Fc all were able to neutralize the activity of native human IL-13 in this assay (FIG. 3). The IC₅₀'s for the murine MJ-27 antibody and the humanized form (V2.11) were 0.48 nM and 0.52 nM respectively. The potencies of MJ2-7 and sIL-13R α 2-Fc were approximately equivalent. The IC₅₀ for sIL-13R α 2-Fc was 0.33 nM (FIG. 4). C65 was approximately 20-fold less active (FIG. 5).

[0357] In a third bioassay, the ability of MJ2-7 to neutralize native human IL-13 was tested in a tenascin production assay. The human BEAS-2B lung epithelial cell line was incubated overnight with 3 ng/ml native human IL-13 in the presence of increasing concentrations of MJ2-7. Supernatants were harvested and tested for production of the extracellular matrix protein, tenascin C, by ELISA (FIG. 6A). MJ2-7 inhibited this response with IC₅₀ of approximately 0.1 nM (FIG. 6B).

[0358] These results demonstrate that MJ2-7 is an effective neutralizer of both NHP IL-13 and native human IL-13. The IL-13 neutralization capacity of MJ2-7 is equivalent to that of sIL-13R α 2-Fc. MJ1-65 also has IL-13 neutralization activity, but is approximately 20-fold less potent than MJ2-7.

[0359] Example 17: Epitope mapping of MJ2-7 antibody by SPR

[0360] sIL-13R α 2-Fc was directly coated onto a CM5 chip by standard amine coupling. NHP-IL-13 at 100 nM concentration was injected, and its binding to the

immobilized IL-13R α 2-Fc was detected by BIACORE™. An additional injection of 100 nM of anti IL-13 antibodies was added, and changes in binding were monitored. MJ2-7 antibody did not bind to NHP-IL-13 when it was in a complex with hu IL-13R α 2, whereas a positive control anti-IL-13 antibody did (FIG. 7). These results
5 indicate that hu IL-13R α 2 and MJ2-7 bind to the same or overlapping epitopes of NHP IL-13.

[0361] Example 18: Measurement of kinetic rate constants for the interaction between NHP-IL-13 and humanized MJ2-7 V2-11 antibody

[0362] To prepare the biosensor surface, goat anti-human IgG Fc specific
10 antibody was immobilized onto a research-grade carboxy methyl dextran chip (CM5) using amine coupling. The surface was activated with a mixture of 0.1 M 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and 0.05 M N-Hydroxysuccinimide (NHS). The capturing antibody was injected at a concentration of 10 μ g/ml in sodium acetate buffer (pH 5.5). Remaining activated groups were blocked with 1.0 M ethanolamine
15 (pH 8.0). As a control, the first flow cell was used as a reference surface to correct for bulk refractive index, matrix effects and non-specific binding, the second, third and fourth flow cells were coated with the capturing molecule.

[0363] For kinetic analysis, the monoclonal antibody hMJ2-7 V2-11 was captured onto the anti IgG antibody surface by injecting 40 μ l of a 1 μ g/ml solution.
20 The net difference between the baseline and the point approximately 30 seconds after completion of injection was taken to represent the amount of target bound. Solutions of NHP-IL-13 at 600, 200, 66.6, 22.2, 7.4, 2.5, 0.8, 0.27, 0.09 and 0 nM concentrations were injected in triplicate at a flow rate of 100 μ l per min for 2 minutes, and the amount of bound material as a function of time was recorded (FIG. 8). The dissociation phase
25 was monitored in HBS/EP buffer (10 mM HEPES, pH 7.4, containing 150 mM NaCl, 3 mM EDTA and 0.005% (v/v) Surfactant P20) for 5 minutes at the same flow rate followed by two 5 μ l injections of glycine, pH 1.5, to regenerate a fully active capturing surface. All kinetic experiments were done at 22.5°C in HBS/EP buffer. Blank and buffer effects were subtracted for each sensorgram using double referencing.

[0364] The kinetic data were analyzed using BIAEVALUATION™ software 3.0.2 applied to a 1:1 model. The apparent dissociation (kd) and association (ka) rate constants were calculated from the appropriate regions of the sensorgrams using a global analysis. The affinity constant of the interaction between antibody and

5 NHP IL-13 was calculated from the kinetic rate constants by the following formula: $K_d = k_d / k_a$. These results indicate that huMJ2-7 V2-11 has on and off-rates of $2.05 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ and $8.89 \times 10^{-4} \text{ 1/s}$, respectively, resulting in an antibody with 43 pM affinity for NHP-IL-13.

[0365] Example 19: Inhibitory activity of MJ2-7 humanization intermediates in
10 bioassays

[0366] The inhibitory activity of various intermediates in the humanization process was tested by STAT6 phosphorylation and tenascin production bioassays. A sub-maximal level of NHP IL-13 or native human IL-13 crude preparation was used to elicit the biological response, and the concentration of the humanized version of MJ2-7
15 required for half-maximal inhibition of the response was determined. Analysis hMJ2-7 V1, hMJ2-7 V2 and hMJ2-7 V3, expressed with the human IgG1, and kappa constant regions, showed that Version 2 retained neutralization activity against native human IL-13. This concentration of the Version 2 humanized antibody required for half-maximal inhibition of native human IL-13 bioactivity was approximately 110-fold
20 greater than that of murine MJ2-7 (FIG. 9). Analysis of a semi-humanized form, in which the V1 or V2 VL was combined with murine MJ2-7 VH, demonstrated that the reduction of native human IL-13 neutralization activity was not due to the humanized VL, but rather to the VH sequence (FIG. 10). Whereas the semi-humanized MJ2-7 antibody with VL V1 only partially retained the neutralization activity the
25 version with humanized VL V2 was as active as parental mouse antibody. Therefore, a series of back-mutations were introduced into the V1 VH sequence to improve the native human IL-13 neutralization activity of murine MJ2-7.

[0367] Example 20: MJ2-7 blocks IL-13 interaction with IL-13Rα1 and
IL-13Rα2

30 [0368] MJ2-7 is specific for the C-terminal 19-mer of NHP IL-13, corresponding to amino acid residues 114 – 132 of the immature protein (SEQ ID

NO:24), and residues 95 – 113 of the mature protein (SEQ ID NO:14). For human IL-13, this region, which forms part of the D alpha-helix of the protein, has been reported to contain residues important for binding to both IL-13R α 1 and IL-13R α 2. Analysis of human IL-13 mutants identified the A, C, and D-helices as containing important contacts site for the IL-13R α 1 / IL-4R α signaling complex (Thompson and Debinski (1999) *J. Biol. Chem.* 274: 29944-50). Alanine scanning mutagenesis of the D-helix identified residues K123, K124, and R127 (SEQ ID NO:24) as responsible for interaction with IL-13R α 2, and residues E110, E128, and L122 as important contacts for IL-13R α 1 (Madhankumar et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 43194-205). High resolution solution structures of human IL-13 determined by NMR have predicted the IL-13 binding interactions based on similarities to related ligand-receptor pairs of known structure. These NMR studies have supported a key role for the IL-13 A and D-helices in making important contacts with IL-13R α 1 (Eisenmesser et al. (2001) *J. Mol. Biol.* 310:231-241; Moy et al. (2001) *J. Mol. Biol.* 310:219-230). Binding of MJ2-7 to this epitope located in the C-terminal, D-helix of IL-13 was predicted to disrupt interaction of IL-13 with IL-13R α 1 and IL-13R α 2.

[0369] The ability of MJ2-7 to inhibit binding of NHP IL-13 to IL-13R α 1 and IL-13R α 2 was tested by ELISA. Recombinant soluble forms of human IL-13R α 1-Fc and IL-13R α 2-Fc were coated onto ELISA plates. FLAG-tagged NHP IL-13 was added in the presence of increasing concentrations of MJ2-7. Results showed that MJ2-7 competed with both soluble receptor forms for binding to NHP IL-13 (FIGs. 11A and 11B). This provides a basis for the neutralization of IL-13 bioactivity by MJ2-7.

[0370] Example 21: The MJ 2-7 light chain CDRs contribute to antigen binding

[0371] To evaluate if all three light chain CDR regions are required for the binding of MJ 2-7 antibody to NHP IL-13, two additional humanized versions of MJ 2-7 VL were constructed by CDR grafting. The VL version 3 was designed based on human germline clone DPK18, contained CDR1 and CDR2 of the human germline clone and CDR3 from mouse MJ2-7 antibody (FIG 12). In the second construct (hMJ 2-7 V4), only CDR1 and CDR2 of MJ 2-7 antibody were grafted onto DPK 18 framework, and CDR3 was derived from irrelevant mouse monoclonal antibody.

[0372] The humanized MJ 2-7 V3 and V4 were produced in COS cells by combining hMJ 2-7 VH V1 with hMJ 2-7 VL V3 and V4. The antigen binding properties of the antibodies were examined by direct NHP IL-13 binding ELISA. The hMJ 2-7 V4 in which MJ 2-7 light chain CDR3 was absent retained the ability to bind NHP IL-13, whereas V3 that contained human germline CDR1 and CDR2 in the light chain did not bind to immobilized NHP IL-13. These results demonstrate that CDR1 and CDR2 of MJ 2-7 antibody light chain are most likely responsible for the antigen binding properties of this antibody.

[0373] Nucleotide sequence of hMJ 2-7 VL V3

10 1 ATGCGGCTGC CCGCTCAGCT GCTGGGCCTG CTGATGCTGT GGGTGCCCGG
51 CTCTTCCGGC GACGTGGTGA TGACCCAGTC CCCTCTGTCT CTGCCCCTGA
101 CCCTGGGCCA GCCCCTTCT ATCTCTTGCC GGTCTCCCA GTCCCTGGTG
15 151 TACTCCGACG GCAACACCTA CCTGAACTGG TTCCAGCAGA GACCCGGCCA
201 GTCTCCTCGG CGGCTGATCT ACAAGGTGTC CAACCGCTTT TCCGGCGTGC
20 251 CCGATCGGTT CTCCGGCTCC GGCAGCGGCA CCGATTTAC CCTGAAGATC
301 AGCCGCGTGG AGGCCGAGGA TGTGGCGTG TACTACTGCT TCCAGGGCTC
351 CCACATCCCT TACACCTTTG GCGGCGGAAC CAAGGTGGAG ATCAAG
25 (SEQ ID NO:189)

[0374] Amino acid sequence of hMJ 2-7 VL V3

MRLPAQLLGLLMLWVPGSSG- DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSOSLVYSDGNTYLNW
30 FQQRPGQSPRRLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHP
YTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:190)

[0375] Nucleotide sequence of hMJ 2-7 VL V4

35 GATGTTGTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTGTCACTCCTGGAGAGCCAGCCTCC
ATCTCTTGAGATCTAGTCAGAGCAATTGTGCATAGTAATGGAAACACCTACCTGGAATGG
TACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTT
TCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATC
AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAAGTTCACATGTTCTC
CTCACCTTCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (SEQ ID NO:191)

40

[0376] Amino acid sequence of hMJ 2-7 VL V4

WO 2006/085938

PCT/US2005/021454

DVVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSOSIV HSNGNTYLEW YLQKPGQSPQ LLIYKVSNRF
SGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCFQSSHVP LTFGQGTKLE IK (SEQ ID NO:192)

[0377] Those skilled in the art will recognize, or be able to ascertain using no
5 more than routine experimentation, many equivalents of the specific embodiments
described herein described herein. Other embodiments are within the following
claims.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An antibody molecule comprising a heavy chain immunoglobulin variable domain sequence and a light chain immunoglobulin variable domain sequence that form an antigen binding site that binds to IL-13 with a K_D of less than 10^{-7} M, wherein
5 the antibody or antigen binding fragment and has one or more of the following properties:

(a) the heavy chain immunoglobulin variable domain sequence comprises a heavy chain CDR3 that differs by fewer than 3 amino acid substitutions from a heavy chain CDR3 of mAb MJ2-7;

10 (b) the light chain immunoglobulin variable domain sequence comprises a light chain CDR that differs by fewer than 3 amino acid substitutions from a corresponding light chain CDR of mAb MJ2-7;

(c) the heavy chain immunoglobulin variable domain sequence comprises a sequence encoded by a nucleic acid that hybridizes under high stringency conditions to
15 the complement of a nucleic acid encoding a heavy chain variable domain of V2.1, V2.3, V2.4, V2.5, V2.6, V2.7, or V2.11;

(d) the light chain immunoglobulin variable domain sequence comprises a sequence encoded by a nucleic acid that hybridizes under high stringency conditions to the complement of a nucleic acid encoding a light chain variable domain of V2.11;

20 (e) the heavy chain immunoglobulin variable domain sequence is at least 90% identical a heavy chain variable domain of V2.1, V2.3, V2.4, V2.5, V2.6, V2.7, or V2.11;

(f) the light chain immunoglobulin variable domain sequence is at least 90% identical a light chain variable domain of V2.11;

25 (g) the antibody molecule competes with mAb MJ2-7 for binding to human IL-13;

(h) the antibody molecule contacts one or more amino acid residues from IL-13 selected from the group consisting of residues 116, 117, 118, 122, 123, 124, 125, 126, 127, and 128 of SEQ ID NO:24 or SEQ ID NO:178;

30 (i) the heavy chain variable domain sequence has the same canonical structure as mAb MJ2-7 in hypervariable loops 1, 2 and/or 3;

(j) the light chain variable domain sequence has the same canonical structure as mAb MJ2-7 in hypervariable loops 1, 2 and/or 3; and

(k) the heavy chain variable domain sequence and/or the light chain variable domain sequence has FR1, FR2, and FR3 framework regions from VH segments
5 encoded by germline genes DP-54 and DPK-9 respectively or a sequence at least 95% identical to VH segments encoded by germline genes DP-54 and DPK-9;

2. The antibody molecule of claim 1 that is purified.

10 3. The antibody molecule of claim 1 that is a recombinant, IgG that includes an Fc domain.

4. The antibody molecule of claim 1 that is a Fab or scFv.

15 5. The antibody molecule of claim 1 that comprises framework regions that are at least 90% identical to human germline framework regions.

6. The antibody molecule of claim 1 that comprises human framework regions, a human Fc region, or both.

20

7. The antibody molecule of claim 1, wherein the hypervariable loops of the heavy chain variable domain sequence have the same canonical structures as the hypervariable loops of mAb MJ2-7, and the heavy chain variable domain comprises at least four IL-13 contacting amino acid residues of mAb MJ2-7.

25

8. The antibody molecule of claim 1, wherein the frameworks of the heavy chain variable domain sequence comprise:

- (i) at a position corresponding to 49, Gly;
- (ii) at a position corresponding to 72, Ala;
- 5 (iii) at positions corresponding to 48, Ile, and to 49, Gly;
- (iv) at positions corresponding to 48, Ile, to 49, Gly, and to 72, Ala;
- (v) at positions corresponding to 67, Lys, to 68, Ala, and to 72, Ala;
- and/or
- (vi) at positions corresponding to 48, Ile, to 49, Gly, to 72, Ala, to 79,
- 10 Ala.

9. The antibody molecule of claim 1 that reduces the ability of IL-13 to bind to IL-13R α 1.

15 10. The antibody molecule of claim 1 that binds to IL-13 irrespective of the polymorphism present at position 130 in SEQ ID NO:24.

11. The antibody molecule of claim 1 that binds to one or both of: a peptide consisting of SEQ ID NO:1 and a peptide consisting of SEQ ID NO:2.

20

12. The antibody molecule of claim 1, wherein the heavy chain variable domain sequence comprises:

- (i) G-(YF)-(NT)-I-K-D-T-Y-(MI)-H (SEQ ID NO:48), in CDR1,
- (ii) (WR)-I-D-P-(GA)-N-D-N-I-K-Y-(SD)-(PQ)-K-F-Q-G (SEQ ID NO:49), in
- 25 CDR2, and
- (iii) SEENWYDFFDY (SEQ ID NO:17), in CDR3.

13. The antibody molecule of claim 12, wherein the heavy chain variable domain sequence comprises:

- 30 GFNIKDTYIH (SEQ ID NO:15), in CDR1,
- RIDPANDNIKYDPKFQG (SEQ ID NO:16), in CDR2, and
- SEENWYDFFDY (SEQ ID NO:17), in CDR3,

14. The antibody molecule of claim 1, wherein the light chain variable domain sequence comprises:

(i) (RK)-S-S-Q-S-(LI)-(KV)-H-S-(ND)-G-N-(TN)-Y-L-(EDNQYAS) (SEQ ID NO:25), in CDR1,

5 (ii) K-(LVI)-S-(NY)-(RW)-(FD)-S (SEQ ID NO:27), in CDR2, and

(iii) Q-(GSA)-(ST)-(HEQ)-I-P (SEQ ID NO:28), in CDR3.

15. The antibody molecule of claim 14, wherein the light chain variable domain sequence comprises:

10 RSSQSIVHSNGNTYLE (SEQ ID NO:18), in CDR1

KVSNRFS (SEQ ID NO:19), in CDR2, and

FQGSHPYT (SEQ ID NO:20), in CDR3.

16. An isolated, recombinant IgG antibody that comprises two polypeptide chains: a light chain that includes the light chain variable domain of V2.11 and a heavy chain that includes the heavy chain variable domain of V2.1, V2.3, V2.4, V2.5, V2.6, V2.7, or V2.11.

17. The isolated, recombinant IgG antibody of claim 16 wherein the heavy chain further includes an Fc domain.

18. A pharmaceutical composition comprising the antibody molecule of claim 1 and a pharmaceutically acceptable carrier.

19. The pharmaceutical composition of claim 18 that is adapted for subcutaneous, inhalatory, or topical administration.

20. A nucleic acid that comprises a sequence that:

(i) encodes a polypeptide that comprises a heavy chain immunoglobulin variable domain sequence that:

- (a) comprises a heavy CDR3 that differs by fewer than 3 amino acid substitutions from a corresponding CDR3 of mAb MJ2-7; or
- (b) is at least 90% identical to a heavy chain variable domain of V2.1, V2.3, V2.4, V2.5, V2.6, V2.7, or V2.11; or
- (ii) hybridizes under high stringency conditions to the complement of a nucleic acid encoding a heavy chain variable domain of V2.1, V2.3, V2.4, V2.5, V2.6, V2.7, or V2.11.

21. A nucleic acid that comprises a sequence that:

- (i) encodes a polypeptide that comprises a light chain immunoglobulin variable domain sequence that:
- (a) comprises a light chain CDR that differs by fewer than 3 amino acid substitutions from a corresponding CDR of mAb MJ2-7; or
- (b) is at least 90% identical to a light chain variable domain of V2.11; or
- (ii) hybridizes under high stringency conditions to the complement of a nucleic acid encoding a light chain variable domain of V2.11.

20

22. A host cell comprising one or more nucleic acid sequences that encode the antibody molecule of claim 1.

23. A method of providing a recombinant antibody, the method comprising:

providing a host cell a nucleic acid sequence that encodes an antibody molecule of claim 1, and

maintaining the cell under conditions in which the antibody molecule is expressed.

24. The method of claim 23, further comprising isolating the protein from the host cell or media in which the host cell is maintained.

25. The method of claim 24, further comprising formulating the isolated protein as a pharmaceutical composition.

26. A method of treating an IL-13-associated disorder, the method comprising:
5 administering, to a subject having or at risk for the disorder, an effective amount of the antibody molecule of claim 1.

27. The method of claim 26, wherein the IL-13 associated disorder is selected from the group consisting of: asthmatic disorders, atopic disorders, chronic obstructive
10 pulmonary disease (COPD), conditions involving airway inflammation, eosinophilia, fibrosis and excess mucus production, inflammatory conditions, autoimmune conditions, tumors or cancers, viral infection, and suppression of expression of protective type 1 immune responses.

15 28. The method of claim 26, wherein the disorder is an asthmatic disorder or allergic rhinitis.

29. The method of claim 26, wherein the disorder is inflammatory bowel
disease.

20 30. The method of claim 26, wherein the disorder is chronic obstructive pulmonary disease (COPD).

31. The method of claim 26, wherein the disorder is an atopic disorder.

25 32. The method of claim 26, wherein the protein is administered subcutaneously, by inhalation, or topically.

33. A method of detecting the presence of IL-13 in a sample, the method
30 comprising:

(i) contacting the sample with an anti-IL-13 antibody molecule according to claim 1; and

(ii) detecting IL-13 in the sample using the anti-IL-13 antibody molecule.

34. The method of claim 33, wherein the sample is from a subject.

5

35. A method of treating a subject exhibiting a symptom of asthma selected from the group consisting of wheezing, shortness of breath, bronchoconstriction, airway hyperreactivity, decreased lung capacity, fibrosis, airway inflammation, and mucus production, said method comprising the step of administering to the patient an antibody according to claim 1, wherein the antibody binds to IL-13 and interferes with the formation of a functional IL-13 signaling complex.

10

FIG. 1A



human MALLLTIVIALTCLGGFASPG**FVPVPSTALRELIEELVNITONOKA** 45 SEQ ID NO:178
cyno MALLLTIVIALTCLGGFASPG**FVPVPSTALRELIEELVNITONOKA** SEQ ID NO:124

human PLCNGSMVWSINLTAG**Y**CAALESILINVGCSAIEKTQ**RM**LSGF 89
cyno PLCNGSMVWSINLTAG**Y**CAALESILINVGCSAIEKTQ**RM**LSGF

human CPEKVSAGQFSSIL**V**RDRTKIEVAQFVKDLL**HL**KKLPREG**Q**FN 132
cyno CPEKVSAGQFSSIL**V**RDRTKIEVAQFVKDLL**HL**KKLPREG**Q**FN

FIG. 1B

peptide 1	MAII ¹ LT ² IVIAL ³ TC	SEQ ID NO:179
peptide 2	LGGFAS ¹ SP ² VP ³ PP	SEQ ID NO:180
peptide 3	SP ¹ SP ² VP ³ PPSTAL ⁴ KELIEE	SEQ ID NO:181
peptide 4	TAL ¹ KELIEE ² LVNITON ³ QKA	SEQ ID NO:182
peptide 5	NQKAPLCNGSMVWSINLTAG ¹ V ²	SEQ ID NO:183
peptide 6	INLTAG ¹ V ² YCAALES ³ LVNSGC	SEQ ID NO:184
peptide 7	SLINVSGCSAIEKTORM ¹ LN ² GF	SEQ ID NO:185
peptide 8	GFCPHKVSAGQFSS ¹ LR ²	SEQ ID NO:186
peptide 9	VRDTKIEVAQ ¹ FKVDL ² IN ³ ELK	SEQ ID NO:187
peptide 10	FKVDL ¹ IN ² ELK ³ KLFR ⁴ EG ⁵ Q ⁶ FN	SEQ ID NO:188

FIG. 2

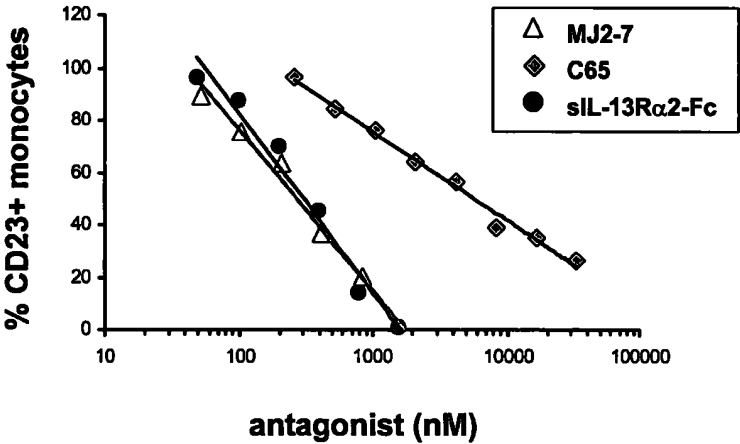


FIG. 3

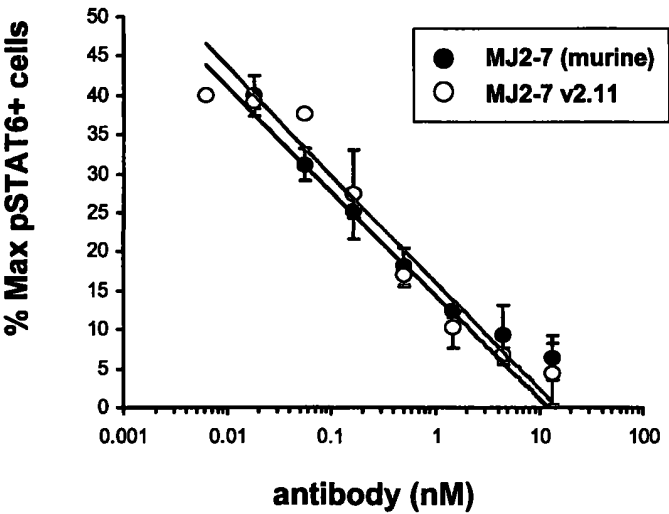


FIG. 4

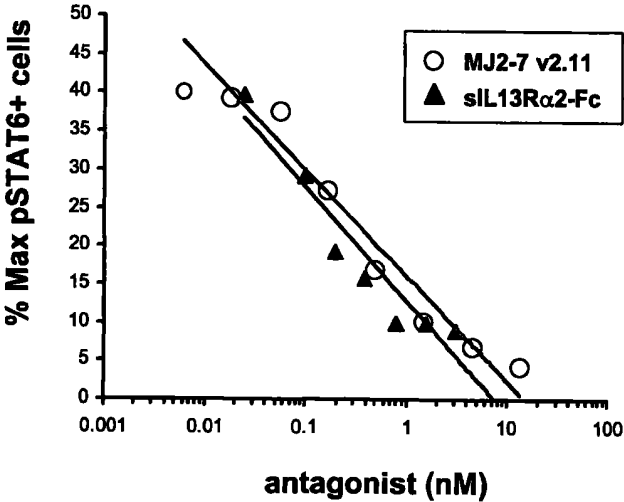


FIG. 5

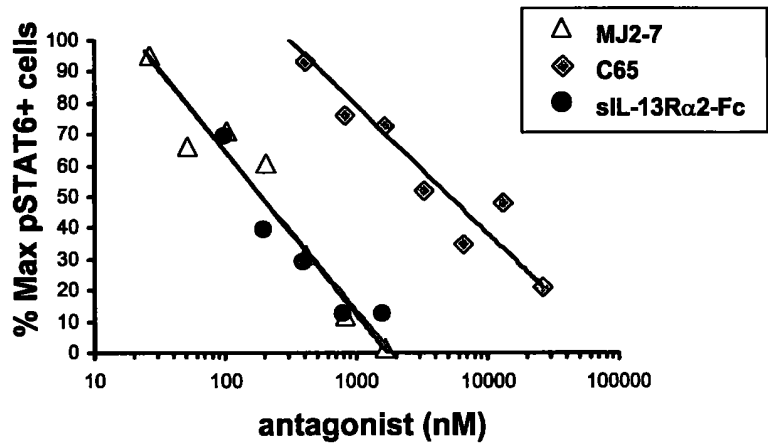


FIG. 6A

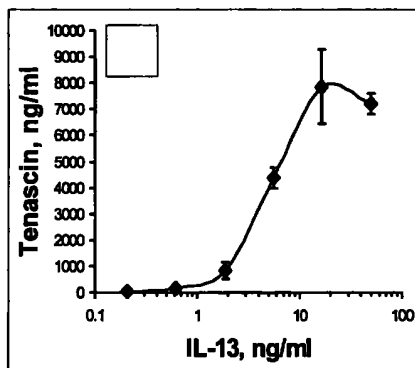


FIG. 6B

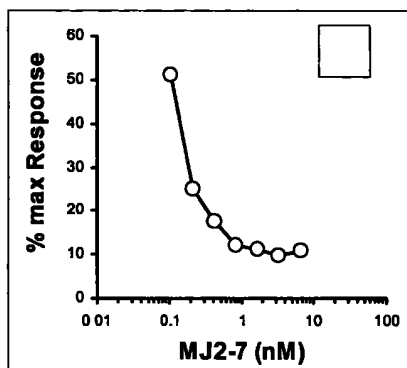


FIG. 7

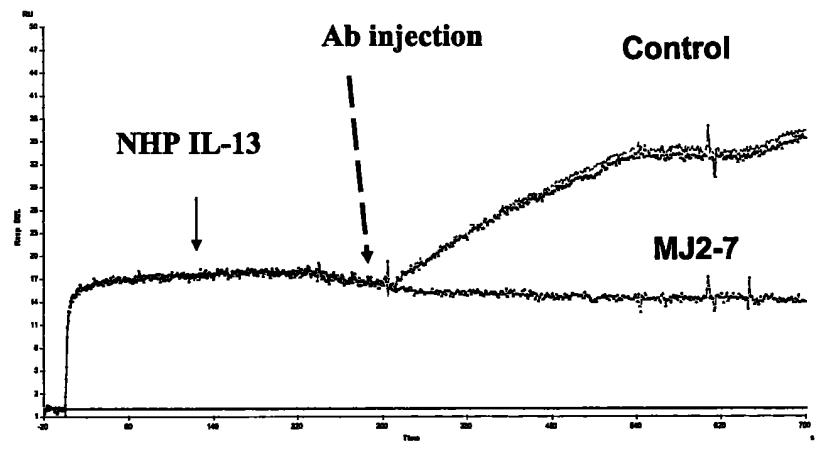


FIG. 8

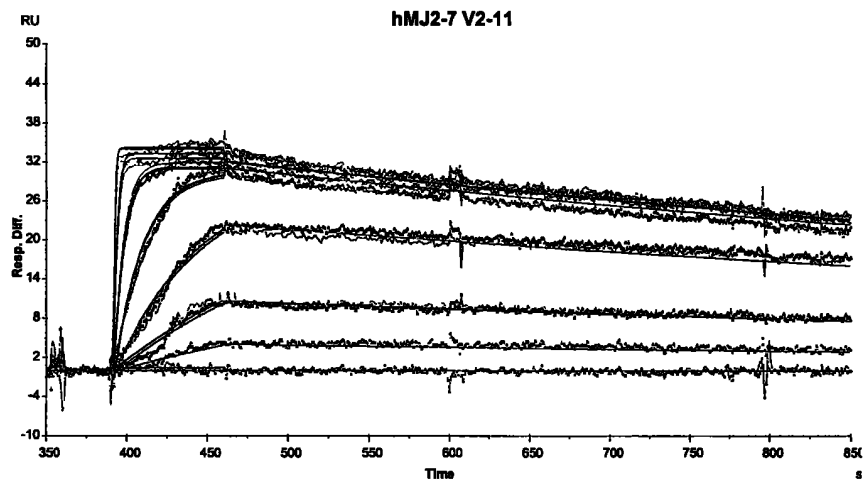


FIG. 9

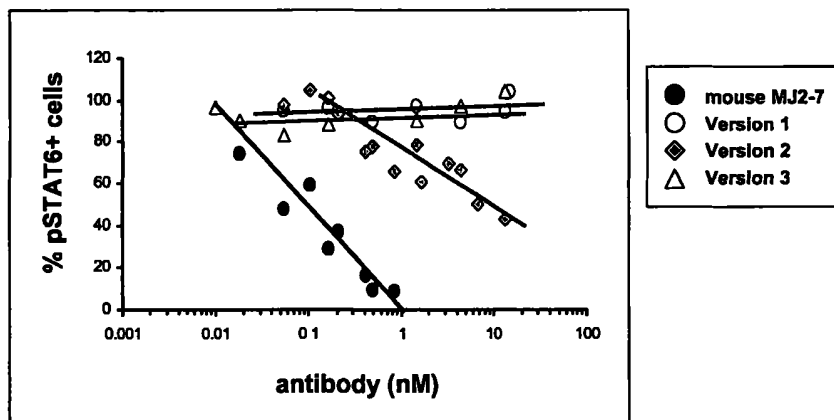


FIG. 10

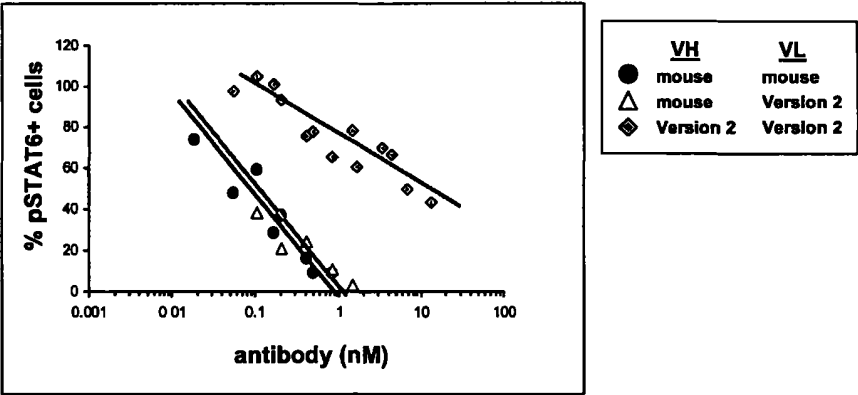


FIG. 11A

FIG. 11B

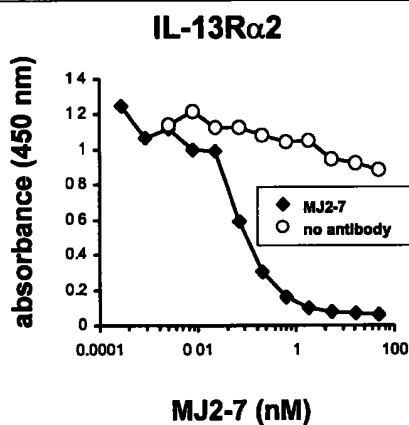
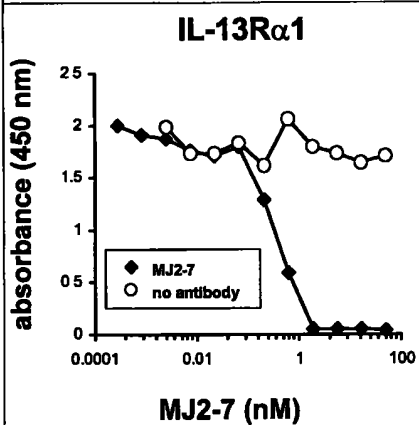


FIG. 12

```
DPK 18      DVVMTQSPLSLPVLTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQSPR 50      (SEQ ID NO:193)
|||||
hmJ2-7VLV3 DVVMTQSPLSLPVLTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQSPR 50      (SEQ ID NO:190)
|||||

DPK 18      RLIIYKVSNRDSGVPPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQMGTHTWP 100
|||||
hmJ2-7VLV3 RLIIYKVSNRDSGVPPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHIP 100 .
|||||

DPK 18      P..... 101

hmJ2-7VLV3 YTFGGGTKVEIK 112
```

FIG. 13A

PGPVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGM
YCAALESLINVSGCSAIEKTQRMMSGFCPHKVSAGQFSSLHVR
DTKIEVAQFVKDLLLLHLKKLFREGFRN (SEQ ID NO:124)

FIG. 13B

MEWPARLCGLWALLLCAGGGGGGGGAAPTETQPPVTNLSVSVENLCTVIWTWNPPE
GASSNCSLWYFSGDKQDKKIAPETRRSIEVPLNERICLQVGSQCSTNESEKPSI
LVEKCISPEGDPESAVTELQCIWHNLSYMKCSWLPGRNTSPDTNYTLYYWHRSL
KIHQCENIFREGQYFGCSFDLTKVKDSSFEQHSVQIMVKDNAGKIKPSFNIVPLTS
RVKPDPPHIKNLSFHNDLYVQWENPQNFISRCLFYEVEVNNSQTETHNVFYVQEA
KCENPEFERNVENTSCFMVPGVLPDTLNTVRIRVKTNKLCEYEDDKLWSNWSQEMSI
GKKRNSTLYITMLLIVPVIVAGAIIVLLLYLKRLKIIIFPPIPDGKIFKEMFGDQ
NDDTLHWKKYDIYEKQTKETDSVVLIENLKKASQ (SEQ ID NO:125)

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

00147

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:

- FVKDLLVHLKKLFREG_{Q130}FN (SEC ID NO: 1),
10 FVKDLLVHLKKLFREG_{R130}FN (SEC ID NO: 2),
FVKDLLLHLKKLFREG_{Q130}FN (SEC ID NO: 3),
FVKDLLLHLKKLFREG_{R130}FN (SEC ID NO: 4),
FVKDLLVHLKKLFREG (SEC ID NO: 5), y
FVKDLLLHLKKLFREG (SEC ID NO: 6), por ejemplo, como péptidos
15 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.

En una modalidad, agente de unión de IL-13 puede inhibir
20 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,
5 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 FQGSHPYT (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
25 anterioridad. La región de CDR3 de cadena pesada puede ser

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
5 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.

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

• DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQS
PQLLIYKVS NRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
FQGSHIPYT SEC ID NO: 30)

• DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYFQQRPGQS
PRRLIYKVS NRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
FQGSHIPYT (SEC ID NO: 31)

• DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQS
PQLLIYKVS NRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
FQGSHIPYT (SEC ID NO. 32)

• DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQP
PQLLIYKVS NRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
FQGSHIPYT (SEC ID NO: 33)

DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQS
PQLLIYKVS NRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC

FQGSHIPYT (SEC ID MO: 34)

• DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWLQQRPGQP

PRLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC

FQGSHIPYT (SE ID NO: 35)

5 • DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRSSQSIVHSNGNTYLEWYQQKPGKA

PKLLIYKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC

FQGSHIPYT (SEC ID NO: 36)

• DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQS

PRRLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC

10 FQGSHIPYT (SEC ID NO: 37)

• DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQS

PKLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYC

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:

- DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISC- (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)
- DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC- (RK) -S-S-Q-S- (LI) - (KV) -H-S-
 10 (ND) -G-N- (TN) -Y-L- (EDNQYAS) WYLQKPGQSPQLLIYK- (LVI) -S- (NY) -
 (RW) - (FD) -SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCF-Q- (GSA) - (SIT) -
 (HEQ) - (IL) -P (SEC ID NO: 41)
- DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC (RK) -S-S-Q-S- (LI) - (KV) -H-S-
 (ND) -G-N- (TN) -Y-L- (EDNQYAS) WYLQKPGQPPQLLIYK- (LVI) -S- (NY) -
 15 (RW) - (FD) -SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCF-Q- (GSA) - (SIT) -
 (HEQ) - (IL) -P (SEC ID NO: 42)
- DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISC (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) -
 20 (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 · DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (RK) -S-S-Q-S- (LI) - (KV) -H-S-

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

· DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISC (RK) -S-S-Q-S- (LI) - (KV) -H-S-
 5 (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,
 10 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
5 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
GRIDPANDNIKYDPKFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 51)

15 • QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIHWVRQATGQGLEWM
GRIDPANDNIKYDPKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 53)

• QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIHWVRQAPGQGLEWM
GRIDPANDNIKYDPKFQGRVTMTEDTSTDYAYMELSSLRSEDVAVYYC
20 ATSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 54)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDTYIHWVRQAPGQALEWM
GRIDPANDNIKYDPKFQGRVTITRDRSMSTAYMELSSLRSEDVAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 55)

• QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGFNKDTYIHWVRQAPGKGLEWM
25 GRIDPANDNIKYDPKFQGRVTMTEDTSTDYAYMELSSLRSEDVAVYYC

ARSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 56)

QMQLVQSGPEVKKPGTTSVKVSCASGFNIKDTYIHWVRQARGORLEWI

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
ARIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
AKSEENWYDFFDY (SEC ID NO. 65)

· QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
5 ARIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 66)

· EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
SRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDN SKNSLYLQMNSLRTEDTALYYC
AKDSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 67)

10 · EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA~GFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
SRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEC ID NO. 68)

· EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFNIKDTYIHWFRQAPGKGLEWV
GRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISR DGSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYC
15 TRSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 69)

· EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
SRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISR DN SKNTLYLQMNSLRAEDMAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 70)

· EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWI
20 GRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISR DN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 71)

· EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
ARIDPANDNIKYDPKFQ GKATISR DN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARSEENWYDFFDY (SEC ID NO: 72)

25 · EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV

ARIDPANDNIKYDPKFQGRFTISADNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC

ARSEENWYDFFDY (SEC ID NO. 73)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV

GRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC

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)

15 · EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV

ARIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDNNAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYC

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 GKATITADTSSNTAYLQLNSLTSEDTAVYYC

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:

· QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASG- (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-
 GRVTMTRDTSISTAYMELSRSLRSDDTAVYYCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO: 83)

· QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASG- (YF) - (NT) - I-K-D-T-Y- (MI) -
 H, WVRQAPGQRLEWMG (WR) - I-D-P- (GA) - N-D-N-I-K-Y- (SD) - (PQ) - K-F-Q-
 GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO: 84)

15 · QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASG- (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)

· QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASG- (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 GRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO: 86)

· QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSG- (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-
 GRVTMTEDTSTDVAVYYCAT SEENWYDFFDY (SEC ID NO: 87)

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

H, WVRQAPGQALEWMG (WR) - I - D - P - (GA) - N - D - N - I - K - Y - (SD) - (PQ) - K - F - Q -
GRVTITRDRSMSTAYMELSSLRSED TAMYYCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO: 88)
· 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 -
5 GRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO: 89)
· QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASG - (YF) - (NT) - I - K - D - T - Y - (MI) -
H, WVRQARGQRLEWIG (WR) - I - D - P - (GA) - N - D - N - I - K - Y - (SD) - (PQ) - K - F - Q -
GRVTITRDMSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAA SEENWYDFFDY (SEC ID NO: 90)
· EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG - (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 AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO: 91)
· EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG - (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 AKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAK DSEENWYDFFDY (SEC ID NO:
15 92)
· QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG - (YF) - (NT) - I - K - D - T - Y - (MI) -
H, WIRQAPGKGLEWVS (WR) - I - D - P - (GA) - N - D - N - I - K - Y - (SD) - (PQ) - K - F - Q -
GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO: 93)
· EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG - (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 -
GRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT SEENWYDFFDY (SEC ID NO: 94)
· EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASG - (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 AKNSLYLQMNSLRAEDTALYH CAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO: 95)
25 · EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG - (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)

• EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG - (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 GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK SEENWYDFFDY (SEC ID NO: 97)

• QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG - (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 -

GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK SEENWYDFFDY (SEC ID NO. 98)

• QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG - (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 -

GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO: 99)

• EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG - (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 -

GRFTISRDNKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK DSEENWYDFFDY (SEC ID NO:

15 100)

• EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG - (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 -

GRFTISRDNKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO:

101)

20 • EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASG - (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 -

GRFTISRDGSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCTR SEENWYDFFDY (SEC ID NO:

102)

• EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG - (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:
10 105)

· 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-
 GRFTISRDNAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR 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)

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

113)

· 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-
 20 GRFTISADNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR SEENWYDFFDY (SEC ID NO:

114)

· 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:

25 115)

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
5 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
10 aminoácido en una posición correspondiente de MJ 2-7 en una región de marco humano. La región FR4 puede incluir, por ejemplo, la secuencia WGQGTTLTVSS (SEC ID NO: 116) ó WGQGTTLVTVSS (SEC ID NO: 117).

En una modalidad, la secuencia de dominio variable de
15 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
20 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
25 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,

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_K 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_H 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, 5 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 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 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".

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 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 si afinidad para la unión a otra interleucina humana además de IL-13. En algunas

nn103 183

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, 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 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 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 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: antagonistas de TNF (por ejemplo, un fragmento soluble de un

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

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.

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). 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.

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 realizarse sobre las células presentes en un sujeto, por

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
5 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,
10 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
15 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.

20 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
25 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
5 que comprende la secuencia o un fragmento funcional de la misma:

SPVPPSTALKEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGVYCAALESLINVSGCSA
IEKTQRMLNGFCPHKVSAGQFSSLVRDTKIEVAQFVKDLLVHLKCLFREGQFN (SEC
ID NO: 14).

10 El polipéptido puede incluir, además:

MALLLTMVIALTCLGGFASP (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
15 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.

20 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
25 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 K_d 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:

MALLTTVIALTCLGGFASPGPVPPSTALRELIEELVNITQNKAPLCNGSMVW
 SINLTAGMYCAALESLINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTK
 IEVAQFVKDLLLHLKCLFREGRFN (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 ($\circ$) 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 (○). 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 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).

20 La Figura 6B es una gráfica que representa la neutralización de la actividad de NHP IL-13 por MJ2-7, 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

MJ2-7 o los anticuerpos de control a NHP-IL-13 unido a sIL-13 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 epítopos 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 epítopos
15 potenciales de las células T (como se define en la WO 98/52976 y WO 00/34317). Para la detección de epítopos 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 epítopos potenciales de las células T. Los
25 epítopos 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 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
5 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
10 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
15 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
20 la formación de una función del complejo de señalización de IL-13.

Ejemplos de los anticuerpos pueden incluir las secuencias del 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
25 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
5 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 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 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 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, 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 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

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

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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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 asmas 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 rebeprazol 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 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 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 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 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 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.

25

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 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 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 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 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) *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,
15 por ejemplo, un dominio plegado. Un dominio de andamiaje que
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

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

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.

.. 00249

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.

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 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.

10 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
15 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
20 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
25 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 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 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 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 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, 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

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:

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

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,

por ejemplo, fosfatidilcolinas, L-alfa-fosfatidilcolina
dipalmitoilo (DPPC) y difosfatidil glicerol (DPPG);
hexadecanol; ácidos grasos; polietilenglicol (PEG);
polioxietilen-9-; autil 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
5 presente puede evaluarse, por ejemplo, mediante la evaluación 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
5 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-
10 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
15 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
20 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™));
25 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
5 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 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 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 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 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 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 epítipo), 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 ^{19}F 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
5 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
15 dosificación o modo de administración (por ejemplo, una 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
20 anticuerpo anti-IL-13, a un paciente apropiado, por ejemplo, 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*.

15

(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

20

25

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
5 (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.
10 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
15 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).

20 (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.

(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 (Pharmingen). 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 (Dyna). 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 CTACTGGGGC CAAGGCACCA
CTCTCACAGT CTCCTCA (SEC ID NO: 129).

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

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIKDTHHWVKQRPEQGLEWIGRIDP
ANDNIKYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLNSLTSEDVAVYYCARSEENWYD
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 DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSI~~VHSNGNTYLE~~WYLQKPGQ
 SPKLLIYK~~VSNRFS~~GVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCF~~QGSHIPY~~
 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 TATGGTGTA ACTGGGTTCG CCAGCCTCCA GGAAAGGGTC TGGAGTGGCT
 5 201 GGAATAATT TGGGGTGATG GAAGCACAGA CTATAATTCA GCTCTCAAAT
 251 CCAGACTGAT CATCAACAAG GACAACTCCA AGAGCCAAGT TTTCTTAAAA
 301 ATGAACAGTC TGCAAAGTGA TGACACAGCC AGGTACTTCT GTGCCAGAGA
 351 TAAGACTTTT TACTACGATG GTTTCTACAG GGGCAGGATG GACTACTGGG
 401 GTCAAGGAAC CTCAGTCACC GTCTCCTCA (SEC ID NO: 135).

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

QVQLKESGPGI VAPSQSLTIT CTVSGFSLTG YGVNWVRQPP GKGLEWLGII
 WGDGSTDYNS ALKSRLIINK DNSKSQVFLK MNSLQTDITA RYFCARDKTF
 YYDGFYRGRM DYWGQTSVT 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 ACAAATTTCA CTCTCACCAT CAGCAGCCTG

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

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

DVQMIQSP SSSLASLGDI VTMTCOASOG TSINLNWFQQ KPGKAPKLLI
FGASNLEDGV PSRFGSRYG 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

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 alérgeno.

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
PENNYKTTTPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK (SAC ID NO: 128).

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

STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
15 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQ
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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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
5 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
10 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
20 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
25 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 GGCCTCAGT CAAGTTGTCC TGCACAGGTT CTGGCTTCAA CATTAAAGAC
151 ACCTATATAC ACTGGGTGAA GCAGAGGCCT GAACAGGGCC TGGAGTGGAT
201 TGAAGGATT 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 PKFQGKATIT 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 CCCAACTCC ACTCTCCCTG CCTGTCAGTC
 101 TTGGAGATCA AGCCTCCATC TCTTGCAGGT CTAGTCAGAG CATTGTACAT
 151 AGTAATGGAA ACACCTATTT AGAATGGTAC CTGCAGAAAC CAGGCCAGTC
 10 201 TCCAAAGCTC CTGATCTACA AAGTTTCCAA CCGATTTTCT GGGGTCCCAG
 251 ACAGGTTTCAG TGGCAGTGGA TCAGGGACAG ATTTACACT CAAGATTAGC
 301 AGAGTGGAGG CTGAGGATCT GGGAGTTTAT TACTGCTTTC AAGGTTTACA
 351 TATTCCGTAC 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 YCFQGSHPY 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

20 sin puntaje) es de la siguiente manera:

```

1  MDWTWRILFL VAAA TGAHS - Q VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGFNIKD
51 TYIHWVRQAP GQRLEWMGRI DPANDNIKYD PKFQGRVTIT RDTASTAYM
101 ELSSLRSED 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 GGTCCTCCCA 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 YTFGGGKVE 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  GCAGTGCAGAG 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 ACTGCGCCCCG
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 WGQGTLVTVSS (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 CCTGTCCGGTC 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 GGGCTCCCAC ATCCCTITACA 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 SSLASVGDR VTITCRSSQS
51 IVHSNGNTYL EWYQQKPGKA PKLLIYKVSN RFSGVPSRFS GSGSGTDFTL
101 TISSLQPEDF ATYYCFQGS 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 GTTCACCATC 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 VQPGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWIGR
51 IDPANDNIKY DPKFOGRFTI SRDNAKNSL Y LQMNSLRAED T A VYYCARSE
20 101 ENWYDFFDYW GQGT LVT VSS (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 GQGT L 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 GTTCACCATC 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 DPKFQGRFTI 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 GGTGGGCCGG
151 ATCGATCCTG CCAACGACAA CATCAAGTAC GACCCCAAGT TCCAGGGCCG
201 GTTCACCATC TCTCGCGACA ACGCCAAGAA CTCCCTGTAC CTCCAGATGA
15 251 ACTCTCTGCG CGCCGAGGAT ACCGCCGTGT ACTACTGCGC CCGGAGCGAG
301 GAGAACTGGT ACGACTTCTT CGACTACTGG GGCCAGGGCA CCCTGGTGAC
351 CGTGTCTCTT (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 SCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWV AR
51   IDPANDNIKY DPKFQGKATI SADNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARSE
105  ENWYDFFDYW GQGT L 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 TCCAGGGCCG
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 GQGT~~L~~VTVSS (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 GGTGGCCCGG
 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 GQGT~~L~~VTVSS (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 CGTGTCTCTT (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 CGTGTCTCTT (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 GQGT~~LV~~TVSS (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:

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 CGTGTCTCTT (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 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFMNIKDTYIHWRQAPGKGLEWIGRIDP
ANDNIKYDPKFQGRFTISADNAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSEENWYD
FFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCTPPCPAPEALGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV
10 DVSHEDPEVKFNNVYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEC ID NO: 176).

El dominio variable está en los aminoácidos 1-120; CH1
15 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.

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSIVHSNGNTYLEWYQQKPGKAPKLLIY
KVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCFQGSHIPYTFGGGTKV
20 EIKRTVAAPSVFHWPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
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

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
10 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
15 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
20 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,
25 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 estreptomicina, 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-

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
5 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
10 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
15 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
20 ejemplo. La actividad inhibidora de V2.11 fue comparable a la de sIL-13R α 2-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, 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 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 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 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.

10 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 15 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 20 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 25

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

20	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

15

20

25

mAb	Expresión, $\mu\text{g/ml}$
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 α 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 CYCHROME™ 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

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 $\mu\text{g/ml}$ 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 μl de una solución de 1 $\mu\text{g/ml}$. 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 μl 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 μl 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.

El análisis de hMJ2-7 V1, hMJ2-7 V2 y hMJ2-7 V3, expresado con IgG1 de humano, y las regiones constantes kappa, mostraron que la versión 2 retuvo la actividad de neutralización contra la IL-13 humana nativa. Esta
5 concentración del anticuerpo humanizado de la versión 2 requerida para la inhibición máxima media de la bioactividad de IL-13 humana nativa fue aproximadamente 110 veces mayor que la de MJ2-7 de murino (Figura 9). El análisis de una forma semi-humanizada, en la que V1 ó V2 VL se combinó con
10 MJ2-7 VH de murino, demostró que la reducción de la actividad de neutralización de IL-13 humana, nativa no fue debida a VL humanizado, sino que a la secuencia VH (Figura 10). Mientras que el anticuerpo MJ2-7 semi-humanizado con VL V1 únicamente retuvo parcialmente la actividad de neutralización, la
15 versión con VL V2 humanizado fue tan activa como el anticuerpo de ratón parental. Por lo tanto, una serie de retromutaciones se introdujeron en la secuencia V1 VH para mejorar la actividad de neutralización de IL-13 humana nativa de MJ2-7 de murino.

20

Ejemplo 20: MJ2-7 bloquea la interacción de IL-13 con IL-13R α 1 e IL-13R α 2

MJ2-7 es específico para 19-mer C terminal de NHP IL-13, lo que corresponde a los residuos de aminoácidos 114-132 de
25 la proteína inmadura (SEC ID NO: 24) y los residuos 95-113 de

la proteína madura (SEC ID NO: 14). Para la IL-13 humana, esta región, que forma parte de la hélice alfa D de la proteína, se ha reportado que contiene residuos importantes para la unión a IL-13R α 1 e IL-13R α 2. El análisis de las

5 mutantes de IL-13 humana identificó las hélices A, C y D que contuvieron sitios de contactos importantes para el complejo de señalización de IL-13R α 1/IL-4R α (Thompson and Debinski (1999) *J. Biol. Chem.* 274: 29944-50). La mutagénesis de exploración de alanina de la hélice D identificó los residuos

10 K123, K124 y R127 (SEC ID NO: 24) como responsables de la interacción con la IL-13R α 2 y los residuos E110, E128 y L122 como contactos importantes para la IL-13R α 1 (Madhanhmuar et al., (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 43194-205). Las estructuras en solución de alta resolución de la IL-13 humana

15 determinadas por RMN han predicho las interacciones de unión de la IL-13 con base en las similitudes con los pares de ligando-receptor relacionados de la estructura conocida. Estos estudios de RMN han soportando un papel clave para las hélices A y D de

20 la IL-13 A y D en la elaboración de contactos importantes con la IL-13R α 1 (Eisenmesser et al. (2001) *J. Mol. Biol.* 310:231-241; Moy et al. (2001) *J. Mol. Biol.* 310:219-230). La unión de MJ2-7 a este epítipo localizad en la hélice D, C terminal de la

25 IL-13 se predijo que interrumpe la interacción de la

IL-13 con la IL-13R α 1 e IL-13R α 2.

La capacidad de MJ2-7 de inhibir la unión de NHP IL-13 a IL-13R α 1 e IL-13R α 2 se probó por ELISA. Las formas solubles recombinantes de la IL-13R α 1-Fc e IL-13R α 2-Fc de humano se recubrieron sobre placas de ELISA. NHP IL-13 marcada con FLAG se adicionó en presencia de concentraciones aumentadas de MJ2-7. Los resultados mostraron que MJ2-7 compitió con las formas de receptor soluble para la unión a NHP IL-13 (Figuras 11A y 11B). Esto proporciona una base para la neutralización de la bioactividad de la IL-13 por MJ2-7.

Ejemplo 21: Los CDRs de cadena ligera de MJ 2-7 contribuyen a la unión del antígeno.

Para evaluar si las tres regiones de CDR de cadena ligera se requieren para la unión del anticuerpo MJ 2-7 a NHP IL-13, se construyeron dos versiones humanizadas adicionales de MJ 2-7 VL por injerto de CDR. La versión 3 de VL se diseñó con base al clon de la línea germinal de humano DPK18, que contuvo CDR1 y CDR2 del clon de la línea germinal humana y CDR3 del anticuerpo MJ2-7 de ratón (Figura 12). En la segunda construcción (hMJ 2-7 V4), se injertaron solamente CDR1 y CDR2 del anticuerpo MJ 2-

7 sobre el marco DPK 18 y se derivó CDR3 del anticuerpo monoclonal de ratón irrelevante.

MJ 2-7 V3 y V4 humanizados se produjeron en células COS combinando hMJ 2-7 VH V1 con hMJ 2-7 VL V3 y V4. Las propiedades de unión del antígeno de los anticuerpos se examinaron por unión de NHP IL-13 directa por ELISA. hMJ 2-7 V4 en la que CDR3 de cadena ligera de MJ 2-7 estuvo ausente, mantuvo la capacidad de unir NHP IL-13, mientras que V3 que contuvo CDR1 y CDR2 de la línea germinal de humano en la cadena ligera no se unió a NHP IL-13 inmovilizada. Estos resultados demuestran que CDR1 y CDR2 de la cadena ligera del anticuerpo MJ 2-7 son más probablemente responsables de las propiedades de unión del antígeno de este anticuerpo.

Secuencia nucleotídica de hMJ 2-7 VL V3

1 ATGCGGCTGC CCGCTCAGCT GCTGGGCCTG CTGATGCTGT GGGTGCCCGG
51 CTCTTCCGGC GACGTGGTGA TGACCCAGTC CCCTCTGTCT CTGCCCCGTGA
101 CCCTGGGCCA GCCCGCTTCT ATCTCTTGCC GGTCCCTCCA GTCCCTGGTG
20 151 TACTCCGACG GCAACACCTA CCTGAACTGG TTCCAGCAGA GACCCGGCCA
201 GTCTCCTCGG CGGCTGATCT ACAAGGTGTC CAACCGCTTT TCCGGCGTGC
251 CCGATCGGTT CTCCGGCTCC GGCAGCGGCA CCGATTTTAC CCTGAAGATC
301 AGCCGCGTGG AGGCCGAGGA TGTGGGCGTG TACTACTGCT TCCAGGGCTC
351 CCACATCCCT TACACCTTTG GCGGCGGAAC CAAGGTGGAG ATCAAG

25 (SEC ID NO: 189)

Secuencia de aminoácido de hMJ 2-7 VL V3

MRLPAQLLGLLMLWVPGSSG-DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSOSLVYSDGNTYLNW
FQQRPGQSPRRLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHIP
YTFGGGKVEIK (SEC ID NO: 190)

5 Secuencia nucleotídica de hMJ 2-7 VL V4

GATGTTGTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTGTCACCTCCTGGAGAGCCAGCCTCC
ATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTGCATAGTAATGGAAACACCTACCTGGAATGG
TACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTT
TCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTCACTCAAGATC
10 AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAAGTTCACATGTTCTC
CTCACCTICGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (SEC ID NO: 191)

Secuencia de aminoácido de hMJ 2-7 VL V4

DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSOSIV HSNNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNR
SGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQSSHVP LTFGQGTKLEIK (SEC ID
15 NO: 192)

Los experimentados en la técnica reconocerán, o serán
capaces de valorar usando no más que la experimentación de
rutina, muchos equivalentes de las modalidades específicas
descritas en la presente. Otras modificaciones están dentro
20 de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de anticuerpo, caracterizada porque comprende una secuencia de dominio variable de
5 inmunoglobulina de cadena pesada y una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera que forman un sitio de unión al antígeno que se une a IL-13 con una K_D menor que 10^{-7} M, donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno tiene una o más de las siguientes propiedades:

10 (a) la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprende una CDR3 de cadena pesada que difiere en menos de 3 sustituciones de aminoácido de una CDR3 de cadena pesada de mAb MJ2-7;

(b) la secuencia de dominio variable de
15 inmunoglobulina de cadena ligera comprende una CDR3 de cadena ligera que difiere en menos de 3 sustituciones de aminoácido de una CDR3 de cadena ligera correspondiente de mAb MJ2-7;

(c) la secuencia de dominio variable de
20 inmunoglobulina de cadena pesada comprende una secuencia codificada por un ácido nucleico que se hibrida en condiciones de alta rigurosidad al complemento de un ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena pesada de V2.1; V2.3,
25 V2.4, V2.5, V2.6,, V2.7 ó V2.11;

(d) la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera comprende una secuencia codificada por un ácido nucleico que se hibrida en condiciones de alta rigurosidad al complemento de un ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena ligera de V2.11;

(e) la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada es por lo menos 90% idéntica al dominio variable de cadena pesada de V2.1, V2.3, V2.4, V2.5, V2.6, V2.7 ó V2.11;

(f) la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera es por lo menos 90% idéntica al dominio variable de cadena ligera de V2.11;

(g) la molécula de anticuerpo compite con mAb MJ2-7 por la unión a la IL-13 humana;

(h) la molécula de anticuerpo se pone en contacto con uno o más residuos de aminoácido de IL-13 seleccionados del grupo integrado por los residuos 116, 117, 118, 122, 123, 124, 125, 126, 127 y 128 de la SEC ID NO: 178;

(i) la secuencia del dominio variable de la cadena pesada tiene la misma estructura canónica que mAb MJ2-7 en las espiras hipervariables 1, 2 y/ó 3;

(j) la secuencia del dominio variable de la cadena ligera tiene la misma estructura canónica que mAb MJ2-7 en las espiras hipervariables 1, 2 y/ó 3; y

(k) la secuencia del dominio variable de la cadena

pesada y/o la secuencia del dominio variable de la cadena ligera tienen regiones de marco FR1, FR2, y FR3 de segmentos VH codificados por los genes de línea germinal DP-54 y DPK-9, respectivamente, o una secuencia por lo menos 95% idéntica a los segmentos VH codificados por los genes de línea germinal DP-54 y DPK-9.

2. La molécula de anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque es purificada.

3. La molécula de anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque es IgG recombinante que incluye un dominio Fc.

4. La molécula de anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque es un Fab o scFv.

5. La molécula de anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque comprende regiones de marco que son por lo menos 90% idénticas a las regiones de marco humanas de línea germinal.

6. La molécula de anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque comprende regiones de marco humanas, una región Fc humana o ambas.

7. La molécula de anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque las espiras hipervariables de la secuencia del dominio variable de la cadena pesada tienen las mismas estructuras canónicas que las espiras hipervariables de mAb MJ2-7, y el dominio variable de

la cadena pesada comprende por lo menos cuatro residuos de aminoácido de mAb MJ2-7 que hacen contacto con IL-13.

8. La molécula de anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque los marcos de la
5 secuencia del dominio variable de la cadena pesada comprenden:

- (i) en una posición correspondiente a 49, Gly;
- (ii) en una posición correspondiente a 72, Ala;
- (iii) en las posiciones correspondientes a 48, Ile, y a
10 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.

9. La molécula de anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque reduce la capacidad de IL-13 de unirse a IL-13R α 1.

20 10. La molécula de anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque se une a IL-13 independientemente del polimorfismo presente en la posición 130 de la SEC ID NO: 24.

25 11. La molécula de anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque se une a uno o ambos

de los siguientes: un péptido que consiste en la SEC ID NO: 1
y un péptido que consiste en la SEC ID NO: 2.

12. La molécula de anticuerpo de conformidad con la
reivindicación 1, caracterizada porque la secuencia del
5 dominio variable de la cadena pesada comprende:

(i) G-(YF)-(NT)-I-K-D-T-Y-(MI)-H (SEC ID NO: 48), en
CDR1,

(ii) (WR)-I-D-P-(GA)-N-D-N-I-K-Y-(SD)-(PQ)-K-F-Q-G (SEC
ID NO: 49), en CDR2, y

10 (iii) SEENWYDFFDY (SEC ID NO: 17), en CDR3.

13. La molécula de anticuerpo de conformidad con la
reivindicación 12, caracterizada porque la secuencia del
dominio variable de la cadena pesada comprende:

GFNIKDTYIH (SEC ID NO: 15), en CDR1,

15 RIDPANDNIKYDPKFQG (SEC ID NO: 16), en CDR2, y

SEENWYDFFDY (SEC ID NO: 17), en CDR3.

14. La molécula de anticuerpo de conformidad con la
reivindicación 1, caracterizada porque la secuencia del
dominio variable de la cadena ligera comprende:

20 (i) (RK)-S-S-Q-S-(LI)-(KV)-H-S-(ND)-G-N-(TN)-Y-L-
(EDNQYAS) (SEC ID NO: 25), en CDR1,

(ii) K-(L VI)-S-(NY)-(RW)-(FD)-S (SEC ID NO: 27), en
CDR2, y

(iii) Q-(GSA)-(ST)-(HEQ)-I-P (SEC ID NO: 28), en CDR3.

25 15. La molécula de anticuerpo de conformidad con la

reivindicación 14, caracterizada porque la secuencia del dominio variable de la cadena ligera comprende:

RSSQSIVHSNGNTYLE (SEC ID NO: 18), en CDR1

5 KVSNRFS (SEC ID NO: 19), en CDR2, y

FQGSHPYT (SEC ID NO: 20), en CDR3.

16. Un anticuerpo recombinante aislado de IgG, caracterizado porque comprende dos cadenas polipeptídicas: una cadena ligera que incluye el dominio variable de la
10 cadena ligera de V2.11 y una cadena pesada que incluye el dominio variable de la cadena pesada de V2.1, V2.3, V2.4, V2.5, V2.6, V2.7 ó V2.11.

17. El anticuerpo recombinante aislado de IgG de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque la
15 cadena pesada incluye además un dominio Fc.

18. Una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende la molécula de anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

19. La composición farmacéutica de conformidad con la
20 reivindicación 18, caracterizada porque está adaptada para la administración subcutánea, por inhalación o tópica.

20. Un ácido nucleico, caracterizado porque comprende una secuencia que:

(i) codifica un polipéptido que comprende una secuencia
25 de dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada que:

(a) comprende una CDR3 pesada que difiere en menos de 3 sustituciones de aminoácido de una CDR3 correspondiente de mAb MJ2-7; o

(b) es por lo menos 90% idéntica a un dominio variable de cadena pesada de V2.1, V2.3, V2.4, V2.5, V2.6, V2.7 ó V2.11; o

(ii) se hibrida en condiciones de alta rigurosidad al complemento de un ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena pesada de V2.1, V2.3, V2.4, V2.5, V2.6, V2.7 ó V2.11.

21. Un ácido nucleico, caracterizado porque comprende una secuencia que:

(i) codifica un polipéptido que comprende una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera que:

(a) comprende una CDR de cadena ligera que difiere en menos de 3 sustituciones de aminoácido de una CDR correspondiente de mAb MJ2-7; o

(b) es por lo menos 90% idéntica a un dominio variable de cadena ligera de V2.11; o

(ii) se hibrida en condiciones de alta rigurosidad al complemento de un ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena ligera de V2.11.

22. Una célula huésped, caracterizada porque comprende una o más secuencias de ácido nucleico que codifican la molécula de anticuerpo de conformidad con la reivindicación

1.

23. Un método para proveer un anticuerpo recombinante, caracterizado porque comprende:

5 suministrar una célula huésped una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula de anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, y

mantener la célula en condiciones en las cuales la molécula de anticuerpo se expresa.

24. El método de conformidad con la reivindicación 23,
10 ' caracterizado porque comprende además aislar la proteína de la célula huésped o del medio en el cual se mantiene la célula huésped.

25. El método de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado porque comprende además formular la proteína
15 aislada como una composición farmacéutica.

26. Un método para tratar un trastorno asociado con la IL-13, caracterizado porque comprende:

administrar a un paciente que padece o en riesgo de padecer el trastorno, una cantidad efectiva de la molécula de
20 anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1.

27. El método de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado porque el trastorno asociado con la IL-13 se selecciona del grupo que consiste de: trastornos asmáticos, trastornos atópicos, enfermedad pulmonar obstructiva crónica
25 (COPD), afecciones que involucran inflamación de las vías

respiratorias, eosinofilia, fibrosis y producción excesiva de moco, afecciones inflamatorias, afecciones autoinmunes, tumores o cánceres, infección viral y supresión de expresión de respuestas inmunes protectoras de tipo 1.

5 28. El método de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado porque el trastorno es un trastorno asmático o rinitis alérgica.

29. El método de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado porque el trastorno es enfermedad intestinal
10 inflamatoria.

30. El método de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado porque el trastorno es enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD).

31. El método de conformidad con la reivindicación 26,
15 caracterizado porque el trastorno es un trastorno atópico.

32. El método de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado porque la proteína se administra en forma subcutánea, por inhalación o en forma tópica.

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

(i) poner en contacto la muestra con una molécula de anticuerpo anti-IL-13 de conformidad con la reivindicación 1;
y

(ii) detectar la IL-13 en la muestra usando la molécula
25 de anticuerpo anti-IL-13.

34. El método de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque la muestra es de un paciente.

35. Un método para el tratamiento de un paciente que exhibe un síntoma de asma, caracterizado porque se selecciona
5 del grupo que consiste de: respiración jadeante, dificultad respiratoria, broncoconstricción, hiperreactividad de las vías respiratorias, capacidad pulmonar disminuida, fibrosis, inflamación de las vías respiratorias y producción de moco, el método comprende la etapa de administrar al paciente un
10 anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, donde el anticuerpo se une a IL-13 e interfiere con la formación de un complejo funcional de señalización de IL-13.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención describe agentes (por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de los mismos) que se unen
5 específicamente a IL-13 y modulan la capacidad de la IL-13 para interactuar con los receptores de IL-13 y los mediadores de señalización.

349

nn349

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud		(51) Int Cl: A61K 39/395, C07H 21/04, C07K 16/24, C12N 5/06 y C12P 21/06	
22) Fecha de solicitud		(71) Solicitante(s) WYETH	
(30) Prioridad	(31) No. 60/581,078 11/149,025	(32) Fecha 17/06/04 09/06/05	(33) País US US
		(72) Inventor(es) TCHISTIAKOVA, Lloudmila Otros	
		(74) Apoderado. ALVARO CORREA ORDOÑEZ	
(85) Fecha limite inicio fase nacional. 17/01/07		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha 17/08/06	
Fecha de presentación de la solicitud 17/06/05		N° publicación: WO 2006/085938	
No de solicitud PCT/US2005/021454			
(54) Título AGENTES QUE SE UNEN A IL-13			

Reivindicación(es)

1. Una molécula de anticuerpo que comprende una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada y una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de cadena liviana que forman un sitio de unión al antígeno que se une a IL-13 con una K_D menor que 10^{-7} M, donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno tiene una o más de las siguientes propiedades:
- (a) la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprende una CDR3 de cadena pesada que difiere en menos de 3 sustituciones de aminoácido de una CDR3 de cadena pesada de mAb MJ2-7,
 - (b) la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de cadena liviana comprende una CDR3 de cadena liviana que difiere en menos de 3 sustituciones de aminoácido de una CDR3 de cadena liviana correspondiente de mAb MJ2-7,
 - (c) la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprende una secuencia codificada por un ácido nucleico que se hibridiza en condiciones de alta rigurosidad al complemento de un ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena pesada de V2.11;
 - (d) la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de cadena liviana comprende una secuencia codificada por un ácido nucleico que se hibridiza en condiciones de alta rigurosidad al complemento de un ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena liviana de V2 1, V2 3, V2 4, V2.5, V2 6, V2 7 o V2 11,
 - (e) la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada es al menos 90% idéntica al dominio variable de cadena pesada de V2.1, V2 3, V2 4, V2.5, V2 6, V2 7 o V2 11;
 - (f) la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de cadena liviana es al menos 90% idéntica al dominio variable de cadena liviana de V2 11;
 - (g) la molécula de anticuerpo compete con mAb MJ2-7 por la unión a la IL-13 humana;
 - (h) la molécula de anticuerpo se pone en contacto con uno o más residuos de aminoácido de IL-13 seleccionados del grupo integrado por los residuos 116, 117, 118, 122, 123, 124, 125, 126, 127 y 128 de SEC ID NO 24 o SEQ ID NO. 178,
 - (i) la secuencia del dominio variable de la cadena pesada tiene la misma estructura canónica que mAb MJ27 en los bucles hipervariables 1, 2 y/o 3,
 - (j) la secuencia del dominio variable de la cadena liviana tiene la misma estructura canónica que mAb MJ27 en los bucles hipervariables 1, 2 y/o 3, y
 - (k) la secuencia del dominio variable de la cadena pesada y/o la secuencia del dominio variable de la cadena liviana tienen regiones de armazón FR1, FR2, y FR3 de segmentos VH codificados por los genes de línea germinal DP-54 y DPK-9, respectivamente, o una secuencia al menos 95% idéntica a los segmentos VH codificados por los genes de línea germinal DP-54 y DPK-9

350



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

nn350

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

(21) N° de solicitud	(22) Fecha de solicitud.		
(51) Clasificación Internacional A61K 39/395, C07H 21/04, C07K 16/24, C12N 5/06 y C12P 21/06			
(71) Solicitante(s) WYETH			
(72) Inventor(es) TCHISTIAKOVA, Loudmila, KASAIAN, Marion T, DONALDSON, Debra D, TAN, Xiang-Yang, GILL, Davinder, JACOBSON, Bruce, JIN, Macy X, GOLDMAN, Samuel J, KNOFF, John y WIDOM, Angela M			
(74) Apoderado ALVARO CORREA ORDÓÑEZ			
(30) Pnondad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	60/581,078	17/06/04	US
	11/149,025	09/06/05	US
(85) Fecha inicio fase nacional 17/01/07		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha 17/08/06	
Fecha de presentación de la solicitud 17/06/05		N° publicación WO 2006/085938	
No de solicitud PCT/US2005/021454			
(54) Título AGENTES QUE SE UNEN A IL-13			



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

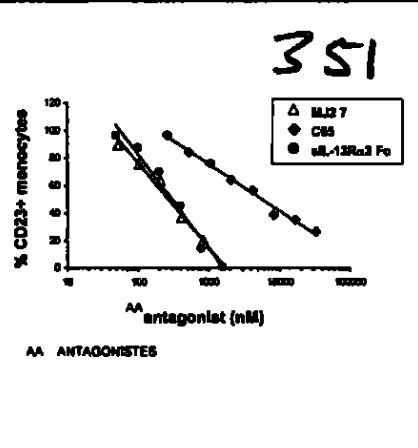
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMATICO

00351

SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION PCT X MODELO DE UTILIDAD DISEÑO INDUSTRIAL

(21) N° de solicitud	(22) Fecha de solicitud
(51) Clasificación Internacional . A61K 39/395, C07H 21/04, C07K 16/24, C12N 5/06 y C12P 21/06	
(71)Solicitante(s)	
WYETH	
(72) Inventor(es): TCHISTIAKOVA, Loudmila, KASAIAN, Manon T , DONALDSON, Debra D , TAN, Xiang-Yang, GILL, Davinder, JACOBSON, Bruce; JIN, Macy X , GOLDMAN, Samuel J., KNOPF, John y WIDOM, Angela M	
(74) Apoderado ALVARO CORREA ORDÓÑEZ	
(30) Prondad	(31) No. Prioridad 32) Fecha (33) Pais
	60/581,078 17/06/04 US
	11/149,025 09/06/05 US
(85) Fecha límite inicio fase nacional 17/01/07	(87) Publicación internacional
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc PCT	Fecha 17/08/06
Fecha de presentación de la solicitud 17/06/05	No. Publicación WO 2006/085938
No de solicitud PCT/US2005/021454	
(54) Titulo AGENTES QUE SE UNEN A IL-13	



(57) Resumen: Se describen agentes (por ej anticuerpos y fragmentos de los mismos) que se unen específicamente a IL 13 y modulan la capacidad de IL-13 para interactuar con los receptores y mediadores de señalización de IL-13

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION

[☒]

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [☒]
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [☒]
- ◆ Descripción de la invención [☒]
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [☒]
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [☒]

COMPLETA [☒]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

353

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CORREA ORDOÑEZ ALVARO
Apoderado(a) y/o Representante de
WYETH

REFERENCIA	Radicación No.	06 125972
	Solicitud internacional	PCT/US2005/021454
	Fecha inicio fase nacional	17/01/2007
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	859

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

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

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

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

ALIX CARMENZA GONZALEZ DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 26 ENE. 2007
adpa10