PETITORIO

7

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Espacio res Rad: 06-123074- -00000-0000
Fec: 2006-12-06 16:14:22 Dep: 2020 NUEVAS CREACIONES
Tra: 11 PATENTES II
Act: 379 FASE NACIONAL II
Act: 411 PRESENTACION Folios: 379

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE :

(1)

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

[X] Capítulo I. [ ] Capítulo II.

(2) SOLICITANTE (71)

Nombre: Wyeth

Dirección: Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940, Estados Unidos

Nacionalidad o Domicilio: Nueva Jersey, Estados Unidos

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@bakernet.com

IDENTIFICACION

C.C. [X] NIT [ ]

C.E. [ ] Otro [ ]

Cual

Número 79.143.366 de Usaquén TP 20.281

(4) INVENTOR (ES) (72)

Nombre: KASAIAN, Marion T.; TCHISTIAKOVA, Lioudmila; VELDMAN, Geertruida, M.; MARQUETTE, Kimberly Ann; TAN, Xiang-Yang; DONALDSON, Debra, D.; LIN, Laura, Long; SHANE, Tania; TAM, Amy, Szepui; FEYFANT, Eric; WOOD, Nancy, L.; FITZ, Lori, J.; WIDOM, Angela, M.; PARRIS, Kevin, D. y GOLDMAN, Samuel, J.

Dirección: 18 Concord Street, #1, Charlestown, MA 02129, Estados Unidos; 19 Abbot Bridge Drivcest, #305, Andover, MA 01810, Estados Unidos; 60 Woodmere Drive, Sudbury, MA 01776, Estados Unidos;66 Springfield Street, Apt. 1, Somerville, MA 02143, Estados Unidos; 811 Gazebo Circle, Reading, MA 01867, Estados Unidos; 108 Blakely Road, Medford, MA 02155, Estados Unidos; 50 Golden Ball Road, Weston, MA 02493, Estados Unidos; 332 Winchester Str., Newton, MA 02461, Estados Unidos; 29 Sturges Street, Medford, MA 02155, Estados Unidos; 41 Kendall Road, Lexington, MA 02421, Estados Unidos; 187 Atherton Street, Somerville, MA 02143, Estados Unidos; 54 Conwell Avenue, #2, Somerville, MA 02144, Estados Unidos; 19 Cherokee Road, Acton, MA 01720, Estados Unidos; 112 woodbine Street, Auburndale, MA 02466, Estados Unidos y 9 Mohawk Drive, Acton, MA 01720, Estados Unidos, respectivamente

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense, Canadiense, Holandesa, Estadounidense, Estadounidense, Estadounidense, Estadounidense, Estadounidense, Estadounidense, Francesa, Estadounidense, Estadounidense, Estadounidense, Estadounidense y Estadounidense, respectivamente.

(5) PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US2005/020160 Fecha 09-JUN-05

Publicación Internacional No. WO 2005/123126 Fecha 29-DIC-05

(6) Título (54) ANTICUERPOS CONTRA LA INTERLEUQUINA-13 HUMANA Y USOS DE LOS MISMOS

(7) Clasificación Internacional (51) A61K 39/395

(8) Prioridad SI [X] NO [ ]

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	09-JUN-04	60/578.473
US	09-JUN-04	60/578.736
US	22-JUN-04	60/581.375

(9) Comprobante de pago No. 06-78540 **Fecha 11-OCT-06**

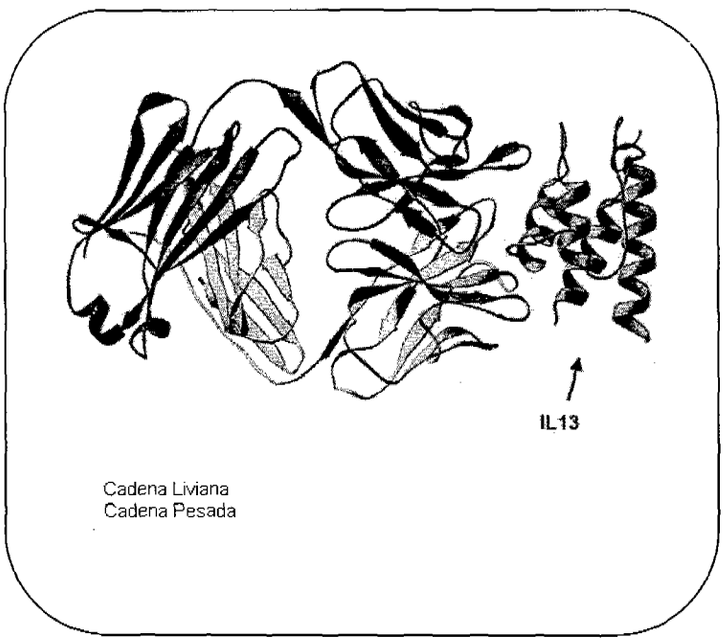
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

(10) **ANEXOS**

00002

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

(11) **FIGURA CARATERISTICA**



(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

FIRMA:

C.C. 79.143.366 de Usaquén T.P. 20.281

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

~~0123~~
3

~~0003~~

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176087-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-123074- -00000-0000
Fec: 2006-12-06 16:14:22 Dep: 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTE(II
Ne: 379 FASENACIONAL(II
ADI411 PRESENTACION Folios 379

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 78,540
FECHA : OCTUBRE 11 DE 2006

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

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ORLANDO LINARES	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	55795232	11/10/2006	48,609,000.00

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

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

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 468/06 de un documento escrito en inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor. Esta es una Traducción Oficial efectuada el día 17 de noviembre de 2006 por la Sra. María Teresa Lara, c.c. 41.568.055 de Bogotá, Traductora Oficial según Resolución No. 01016 del 2 de octubre de 1998, expedida por el Ministerio de Justicia.

= =

Poder otorgado por WYETH respecto de la solicitud de patente titulada "ANTICUERPOS CONTRA LA INTERLEUQUINA-13 HUMANA Y USOS PARA LOS MISMOS". Certificación notarial suscrita por Michelle McGowan, Notario Público del estado de Nueva Jersey, y legalizaciones subsiguientes.

EL PODER Y LA CERTIFICACIÓN NOTARIAL NO SE TRADUCEN POR ENCONTRARSE EN INGLÉS Y ESPAÑOL EN EL DOCUMENTO ORIGINAL.

(Fdo.) Michelle L. McGowan
Notario Público

[Sello] MICHELLE L. McGOWAN
Notario Público, Estado de Nueva Jersey
No. 2108903
Habilitada en el Condado de Morris
La comisión expira el 9 de febrero de 2011

(Sello notarial
en relieve)

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Estados Unidos de América
2. Este documento público ha sido firmado por: Michelle L. McGowan
3. actuando en calidad de: Notario Público de Nueva Jersey
4. lleva el sello/timbre de: Michelle L. McGowan, Notario

CERTIFICADO

5. en Trenton, Nueva Jersey

6. el día 4 de octubre de 2006

7. por Bradley Abelow, TESORERO DE NUEVA JERSEY

8. No. A272523

9. Sello/Timbre: 10. Firma

(Sello del Estado de Nueva Jersey) (Fdo.) Bradley Abelow

= =

La anterior es traducción fiel y completa del documento en referencia, de la cual se deja copia en este archivo para su confrontación.

Teresa Lara R.

María Teresa Lara R.
c.c. 41.568.055 de Bogotá
Traductora Oficial según
Resolución No. 01016 del
2 de octubre de 1998, del
Ministerio de Justicia

APOSTILLE

(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

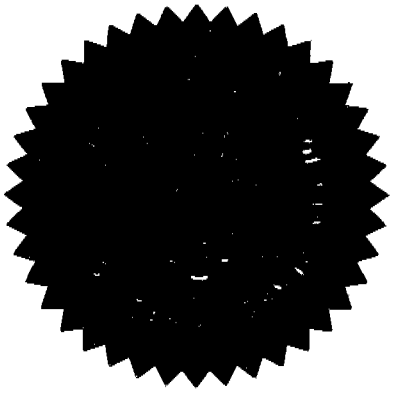
6. THE 4TH DAY OF OCTOBER 2006

7. BY: Bradley Abelow, NEW JERSEY TREASURER

8. NO. A272523

9. SEAL/STAMP:

10. SIGNATURE



Bradley Abelow

Teresa Lovat.

TRADUCTORA OFICIAL

468/06

BAKER & McKENZIE

AM101493 Colombia

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

NIT: 860.068.840-3
Tel: +57 1 634 1500
Fax: +57 1 376 2211
www.bakernet.com

7

00007

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, Rodriguez & 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/US2005/020160 and entitled "ANTIBODIES AGAINST HUMAN INTERLEUKIN-13 AND USES THEREFOR" 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 Rasibeck, 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 dijo el bufete de abogados, poder especial amplio y suficiente con respecto a la solicitud(es) de patente en Colombia basada(s) en PCT/US2005/020160 y titulada "ANTIBODIES AGAINST HUMAN INTERLEUKIN-13 AND USES THEREFOR", 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
suscribió 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 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
29 December 2005 (29.12.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/123126 A2

(51) International Patent Classification[7]: A61K 39/395

(21) International Application Number:
PCT/US2005/020160

(22) International Filing Date: 9 June 2005 (09.06.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/578,473	9 June 2004 (09.06.2004)	US
60/578,736	9 June 2004 (09.06.2004)	US
60/581,375	22 June 2004 (22.06.2004)	US

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

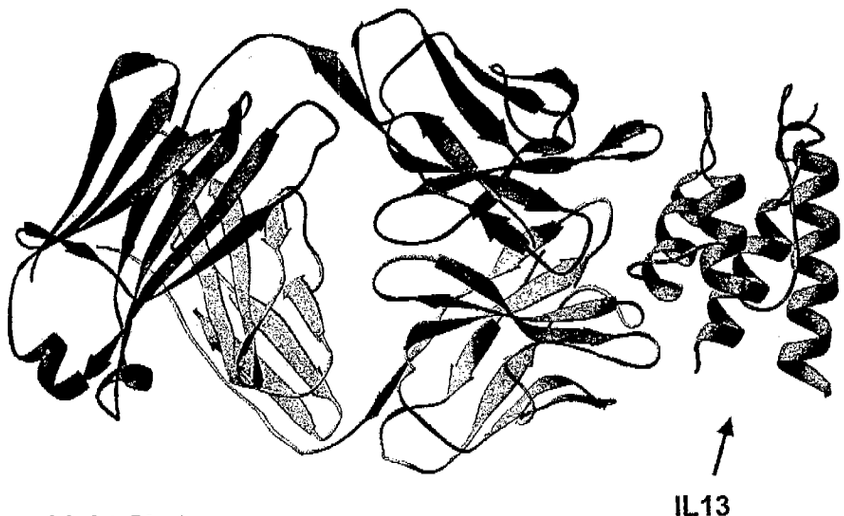
(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **KASAIAN, Marion, T.** [US/US]; 18 Concord Street, #1, Charlestown, MA 02129 (US). **TCHISTIAKOVA, Lioudmila** [CA/US]; 19 Abbot Bridge Driveest, #305, Andover, MA 01810 (US). **VELDMAN, Geertruida, M.** [NL/US]; 60 Woodmere Drive, Sudbury, MA 01776 (US). **MARQUETTE, Kimberly, Ann** [US/US]; 66 Springfield Street, Apt. 1, Somerville, MA 02143 (US). **TAN, Xiang-Yang** [US/US]; 811 Gazebo Circle, Reading, MA 01867 (US). **DONALDSON, Debra, D.** [US/US]; 108 Blakely Road, Medford, MA 02155 (US). **LIN, Laura, Long** [US/US]; 50 Golden Ball Road, Weston, MA 02493 (US). **SHANE, Tania** [US/US]; 332 Winchester Str., Newton, MA 02461 (US). **TAM, Amy, Szepui** [US/US]; 29 Sturges Street, Medford, MA 02155 (US). **FEYFANT, Eric** [FR/US]; 41 Kendall Road, Lexington, MA 02421 (US). **WOOD, Nancy, L.** [US/US]; 187 Atherton Street, Somerville, MA 02143 (US). **FITZ, Lori, J.** [US/US]; 54 Conwell Avenue, #2, Somerville, MA 02144 (US). **WIDOM, Angela, M.** [US/US]; 19 Cherokee Road, Acton, MA 01720 (US). **PARRIS, Kevin, D.** [US/US]; 112 woodbine Street, Auburndale, MA 02466 (US). **GOLDMAN, Samuel, J.** [US/US]; 9 Mohawk Drive, Acton, MA 01720 (US).

(74) Agent: **MYERS, Louis**; Fish & Richardson P.C., 225 Franklin Street, Boston, MA 02110-2804 (US).

[Continued on next page]

(54) Title: ANTIBODIES AGAINST HUMAN INTERLEUKIN-13 AND USES THEREFOR



(57) Abstract: This application relates to antibodies, *e.g.*, humanized antibodies, and antigen-binding fragments thereof, that bind to interleukin-13 (IL-13), in particular, human IL-13, and their uses in regulating immune responses mediated by IL-13. The antibodies disclosed herein are useful in diagnosing, preventing, and/or treating a subject, *e.g.*, a human patient, one or more IL-13-associated disorders, *e.g.*, respiratory disorders (*e.g.*, asthma); atopic disorders (*e.g.*, allergic rhinitis); inflammatory and/or autoimmune conditions of the skin (*e.g.*, atopic dermatitis), and gastrointestinal organs (*e.g.*, inflammatory bowel diseases (IBD)), as well as fibrotic and cancerous disorders.

WO 2005/123126 A2

WO 2005/123126 A2

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

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

Published:

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

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

ANTIBODIES AGAINST HUMAN INTERLEUKIN-13 AND USES THEREFOR

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

[0001] This application claims priority to U.S. Patent Application Serial No. 60/578,473, filed on June 9, 2004, Serial No. 60/581,375, filed on June 22, 2004, and Serial No. 60/578,736, filed on June 9, 2004. The entire contents of all of which are hereby incorporated by reference. A U.S. utility patent application, entitled "Anti-IL13 Antibodies and Complexes," filed on June 9, 2005, naming Parris, K.D. et al., and designated by attorney docket no. 16163-029001/ AM101750 (referred to as "Application 16163-029001" herein) is also incorporated by reference.

FIELD OF THE INVENTION

[0002] This application relates to antibodies, e.g., humanized antibodies, and antigen-binding fragments thereof, that bind to interleukin-13 (IL-13), in particular, human IL-13, and their uses in regulating immune responses mediated by IL-13. The antibodies disclosed herein are useful in diagnosing, preventing, and/or treating a subject, e.g., a human patient, one or more IL-13-associated disorders, e.g., respiratory disorders (e.g., asthma); atopic disorders (e.g., allergic rhinitis); inflammatory and/or autoimmune conditions of the skin (e.g., atopic dermatitis), and gastrointestinal organs (e.g., inflammatory bowel diseases (IBD)), as well as fibrotic and cancerous disorders.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[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 OF THE INVENTION

[0004] The present application provides, *inter alia*, IL-13 binding agents that are IL-13 antagonists, including antibodies and antigen-binding fragments thereof that bind to IL-13, in particular, human IL-13, with high affinity and specificity. The antibodies and antigen-binding fragments thereof of the present disclosure are also referred to herein as "anti-IL-13 antibodies" and "fragments thereof," respectively. In one embodiment, the anti-IL-13 antibody or fragment thereof reduces, neutralizes, and/or antagonizes at least one IL-13-associated activity. For example, the anti-IL-13 antibody or fragment thereof can bind to IL-13, e.g., an epitope of IL-13, and interfere with an interaction, e.g., binding, between IL-13 and an IL-13 receptor complex ("IL-13R"), e.g., a complex comprising IL-13 receptor α1 ("IL-13Rα1") and the interleukin-4 receptor alpha chain ("IL-4Rα"), or a subunit thereof (e.g., IL-13Rα1 or IL-4Rα, individually). Thus, the antibodies and fragments thereof described herein can be used to interfere with (e.g., inhibit, block or otherwise reduce) an interaction, e.g., binding, between IL-13 and an IL-13 receptor complex, or a subunit thereof, thereby interfering with the formation of a functional signaling complex.

[0005] In addition, we have shown that administration of a neutralizing anti-IL-13 antibody ameliorates, *inter alia*, antigen-induced lung inflammation, e.g., eosinophilia and bronchoconstriction, in nonhuman primates and sheep, respectively. Thus, IL-13 antagonists, e.g., neutralizing anti-IL-13 antibodies and fragments thereof, can be used to ameliorate at least one IL-13-associated activity *in vivo*, e.g., an inflammatory condition (e.g., lung inflammation). Additionally, neutralizing anti-IL-13 antibodies and fragments thereof, may be used to ameliorate the enhanced sensitivity of cells from atopic patients to IL-13. Accordingly, the antibodies or fragments thereof can be used, e.g., for the treatment of seasonal allergies, e.g., allergic rhinitis. The anti-IL-13 antibodies or fragments thereof (including those described herein) are useful in diagnosing, treating and/or preventing, in a subject, e.g., a human patient, one or more IL-13-associated disorders, e.g., respiratory disorders (e.g., asthma, including allergic and non-allergic asthma, chronic obstructive pulmonary disease (COPD)), as well as conditions involving airway inflammation, eosinophilia, fibrosis and excess mucus production (e.g., cystic fibrosis and pulmonary fibrosis); atopic disorders (e.g., allergic rhinitis); inflammatory and/or autoimmune conditions of, the skin (e.g., atopic dermatitis), gastrointestinal organs (e.g., inflammatory bowel diseases (IBD)), liver (e.g., cirrhosis); viral infections; scleroderma and fibrosis of other organs, such as liver fibrosis.

[0006] Accordingly, in one aspect, this application features an IL-13 binding agent such as an IL-13 antagonist. An IL-13 binding agent can be a protein, e.g., an antibody or an antigen-binding fragment thereof, a peptide, or a scaffold domain, that interacts with, e.g., binds to and/or neutralizes, IL-13, in particular, mammalian IL-13, e.g., human, sheep, or nonhuman primate IL-13. The antibody can be an isolated antibody. In one embodiment, the antibody or fragment thereof is a neutralizing antibody, e.g., it 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 vivo*, among others.

[0007] The IL-13 antagonists described herein, e.g., anti-IL-13 antibodies or fragments thereof, can bind to IL-13 with high affinity, e.g., with a Kd less than 10^{-7} M, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}, 10^{-11} M or better. For example, the anti-IL-13 antibodies or fragments thereof can bind to IL-13 with an affinity between 50 and 500 pM, e.g., between 90 and 120 pM, e.g., between 95 and 105 pM. In other embodiments, the anti-IL-13 antibodies or fragments thereof can neutralize one or more IL-13-associated activities with an IC_{50} of at least about 50 nM to 5 pM, typically about 100 to 250 pM or stronger. In other embodiments, the anti-IL-13 antibodies or fragments thereof associate with IL-13 with kinetics in the range of 10^3 to 10^7 $M^{-1}s^{-1}$, typically 10^4 to 10^6 $M^{-1}s^{-1}$. For example, the anti-IL-13 antibodies or fragments thereof may associate with IL-13 with kinetics in the range of 5×10^4 to 8×10^6 $M^{-1}s^{-1}$. In yet another embodiment, the anti-IL-13 antibodies or fragments thereof have dissociation kinetics in the range of 10^{-2} to 10^{-6} s^{-1}, typically 10^{-3} to 10^{-6} s^{-1}, e.g., slower than 5×10^{-4} s^{-1}, e.g., 9, 8, 6 $\times10^{-5}$ s^{-1}. In one embodiment, the anti-IL-13 antibodies or fragments thereof bind to IL-13, e.g., human IL-13, with an affinity and/or kinetics similar to monoclonal antibody 13.2 ("mAb13.2"), or modified forms thereof, e.g., chimeric forms (e.g., "ch13.2"), or humanized forms thereof (e.g., "h13.2v1," "h13.2v2" or "h13.2v3"). The affinity and binding kinetics of the anti-IL-13 antibody or fragment thereof can be tested using, e.g., biosensor technology (BIACORE™ (see Example 1.2, below).

[0008] In one embodiment, the anti-IL-13 antibody or fragment thereof (e.g., a Fab, $F(ab')_2$, Fv, or a single chain Fv fragment) is a monoclonal antibody or an antibody with single specificity. The antibody or fragment thereof can also be a human, humanized, chimeric, or *in vitro*-generated antibody. In one embodiment, the anti-IL-13 antibody or fragment thereof is a humanized antibody. In one embodiment, the antibody is effectively human.

[0009] The heavy and light chains of the anti-IL-13 antibody can be full-length (e.g., an antibody can include at least one, and preferably two, complete heavy chains, and at least one, and preferably two, complete light chains) or can 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 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 chain constant region of IgG1 (e.g., human IgG1). In another embodiment, the antibody 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 altered, e.g., mutated, to modify the properties of the antibody (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 of SEQ ID NO:17 (e.g., residues 234 and 237 when the Serine at position no. 1 is shifted to residue no. 119 (following, e.g., 118 amino acids of VH chain); as shown in SEQ ID NO:17, with Serine at position no. 1, these same residues are nos. 116 and 119). In one embodiment, the anti-IL-13 antibody comprises the human IgG1 constant region shown as SEQ ID NO:17. In another embodiment, the anti-IL-13 antibody comprises the human kappa sequence shown as SEQ ID NO:18.

[0010] In another embodiment, the IL-13 antagonist, e.g., the anti-IL-13 antibody or fragment thereof, specifically binds to IL-13, in particular, mammalian, e.g., nonhuman primate, sheep, or human IL-13 (e.g., human IL-13 having an amino acid sequence of SEQ ID NO:31 (FIG. 11)), or mature human IL-13 sequence from about amino acids 20-132 of SEQ ID NO:31 (FIG. 11) (see also SEQ ID NO:32 for mature human IL-13 sequence numbering), or a sequence that is at least 85%, 90%, 95%, 99% or more identical thereto). In one embodiment, the anti-IL-13 antibody or fragment thereof binds to a variant of human IL-13, e.g., a variant of human IL-13 having a Glutamine (Q) instead of an Arginine (R) at position 130 of SEQ ID NO:31 (FIG. 11). In other embodiments, the antibody or fragment thereof specifically binds to a fragment of IL-13, e.g., a fragment of at least 10, 20, 50, 75, 100, 120, or 130 contiguous amino acids of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:31, or a sequence that is at least 85%, 90%, 95%, 99% or more identical thereto. In one embodiment, the anti-IL-13 antibody or fragment thereof specifically binds to human IL-13 and does not cross-react with IL-13 from nonhuman species. In other embodiments, the anti-IL-13 antibody or fragment thereof binds to two or more forms of mammalian IL-13, e.g., human, sheep and/or nonhuman primate IL-13.

[0011] In one embodiment, the IL-13 antagonist, e.g., the anti-IL-13 antibody or fragment thereof, specifically binds to an epitope, e.g., a linear or a conformational epitope, of IL-13, e.g., in particular, mammalian, e.g., human IL-13. In one embodiment, the anti-IL-13 antibody or fragment thereof binds to an epitope comprising residues 81-93 and/or 114-132 of human IL-13 (SEQ ID NO:31), or a modified form thereof (e.g., a fragment or substituted (e.g., conservatively substituted) form thereof). In another embodiment, the anti-IL-13 antibody or fragment thereof specifically binds to an epitope of human IL-13 comprising one or more of the following amino acid residues: Glutamate at position 68 [49], Asparagine at position 72 [53], Glycine at position 88 [69], Proline at position 91 [72], Histidine at position 92 [73], Lysine at position 93 [74], and Arginine at position 105 [86] of SEQ ID NO:31 [position in mature sequence; SEQ ID NO:32], or a conserved amino acid substitution thereof.

[0012] In another embodiment, the IL-13 antagonist, e.g., the anti-IL-13 antibody or fragment thereof, binds to a complex chosen from, e.g., IL-13 and IL-13Rα1 ("IL-13 / IL-13Rα1"); IL-13 and IL-4Rα ("IL-13 / IL-4Rα"); and IL-13, IL-13Rα1, and IL-4Rα ("IL-13 / IL-13Rα1 / IL-4Rα"). In other embodiments, the IL-13 antagonist, e.g., the antibody or fragment thereof, binds to IL-13 and interferes with (e.g., inhibits, blocks or otherwise reduces) an interaction, e.g., binding, between IL-13 and an IL-13 receptor complex, e.g., a complex comprising IL-13Rα1 and IL-4Rα. In other embodiments, the IL-13 antagonist, e.g., the anti-IL-13 antibody or fragment thereof, 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-13Rα1 or IL-4Rα, individually. In yet another embodiment, the IL-13 antagonist, e.g., the anti-IL-13 antibody or fragment thereof, binds to IL-13, and interferes with (e.g., inhibits, blocks or otherwise reduces) an interaction, e.g., binding, between IL-13/IL-13Rα1 and IL-4Rα. In another embodiment, the IL-13 antagonist, e.g., the anti-IL-13 antibody or fragment thereof, binds to IL-13 and interferes with (e.g., inhibits, blocks or otherwise reduces) an interaction, e.g., binding, between IL-13/IL-4Rα and IL-13Rα1. Typically, the anti-IL-13 antibody or fragment thereof interferes with (e.g., inhibits, blocks or otherwise reduces) an interaction, e.g., binding,

of IL-13/IL-13Rα1 with IL-4Rα. Exemplary antibodies inhibit or prevent formation of the ternary complex, IL-13/IL-13Rα1/IL-4Rα.

[0013] Examples of IL-13 antibodies, that interfere with IL-13 binding to IL-13R (e.g., an IL-13 receptor complex), or a subunit thereof, include "mAb13.2" and modified, e.g., chimeric or humanized forms thereof. The amino acid and nucleotide sequences for the heavy chain variable region of mAb13.2 are set forth herein as SEQ ID NO:13 and SEQ ID NO:5, respectively. The amino acid and nucleotide sequences for the light chain variable region of mAb13.2 are set forth herein as SEQ ID NO:9 and SEQ ID NO:1, respectively. An exemplary chimeric form (e.g., a form comprising the heavy and light chain variable region of mAb13.2) is referred to herein as "ch13.2." The amino acid and nucleotide sequences for the heavy chain variable region of ch13.2 are set forth herein as SEQ ID NO:14 (e.g., FIG. 15) and SEQ ID NO:6, respectively. The amino acid and nucleotide sequences for the light chain variable region of ch13.2 are set forth herein as SEQ ID NO:10 (e.g., FIG. 16) and SEQ ID NO:2, respectively. A humanized form of mAb13.2, which is referred to herein as "h13.2v1," has amino acid and nucleotide sequences for the heavy chain variable region set forth herein as SEQ ID NO:15 (FIG. 15) and SEQ ID NO:7, respectively. The amino acid and nucleotide sequences for the light chain variable region of h13.2v1 are set forth herein as SEQ ID NO:11 (FIG. 16) and SEQ ID NO:3, respectively. Another humanized form of mAb13.2, which is referred to herein as "h13.2v2," has amino acid and nucleotide sequences for the heavy chain variable region set forth herein as SEQ ID NO:16 (FIG. 17) and SEQ ID NO:8, respectively. The amino acid and nucleotide sequences for the light chain variable region of h13.2v2 are set forth herein as SEQ ID NO:12 (FIG. 18) and SEQ ID NO:4, respectively. Another humanized form of mAb13.2, which is referred to herein as "h13.2v3," has amino acid and nucleotide sequences for the heavy chain variable region set forth herein as SEQ ID NO:36 (FIG. 27) and SEQ ID NO:34, respectively. The amino acid and nucleotide sequences for the light chain variable region of h13.2v3 are set forth herein as SEQ ID NO:35 (FIG. 28) and SEQ ID NO:33, respectively.

[0014] In one embodiment, the IL-13 antagonist, e.g., the antibody or fragment thereof, binds specifically to IL-13, e.g., human, nonhuman primate, or sheep IL-13, and competitively inhibits the binding of a second antibody to IL-13, e.g., to a target

epitope on IL-13 (e.g., human, nonhuman primate, sheep IL-13). The second antibody can be an antibody chosen from, e.g., mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, and/or h13.2v3, as described herein.

[0015] In one embodiment, the IL-13 antibody or fragment thereof can confer a post-injection protective effect against exposure to *Ascaris* antigen in a sheep model at least six weeks after injection.

[0016] In another embodiment, the antibody or fragment thereof comprises at least one antigen-binding region, e.g., a variable region, from an antibody chosen from, e.g., mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, and/or h13.2v3. In yet another embodiment, the antibody or fragment thereof includes at least one, two, three or four variable regions from an antibody chosen from, e.g., mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, and/or h13.2v3, as described herein. In another embodiment, the antibody or fragment thereof includes at least one or two heavy chain variable regions from an antibody chosen from, e.g., mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2 and/or h13.2v3, as described herein. In another embodiment, the antibody or fragment thereof includes at least one or two light chain variable regions from an antibody chosen from, e.g., mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, and/or h13.2v3, as described herein. In yet another embodiment, the antibody or fragment thereof includes at least one, two, or three complementarity determining regions (CDRs) from a heavy chain variable region of an antibody chosen from, e.g., mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, and/or h13.2v3, as described herein, or at least particularly the amino acids from those CDRs that contact IL-13. In yet another embodiment, the antibody or fragment thereof includes at least one, two, or three CDRs from a light chain variable region of an antibody chosen from, e.g., mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, and/or h13.2v3, as described herein, or at least includes the amino acids from those CDRs that contact IL-13. In yet another embodiment, the antibody or fragment thereof includes at least one, two, three, four, five, or six CDRs from the heavy and light chain variable regions of an antibody chosen from, e.g., mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, and/or h13.2v3, as described herein.

[0017] In one preferred embodiment, the protein includes all six CDR's from mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, and/or h13.2v3 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, e.g., conservative substitutions). Optionally, the protein may include any CDR described herein.

[0018] In yet another embodiment, the antibody or fragment thereof includes at least one, two, or three Chothia hypervariable loops from a heavy chain variable region of an antibody chosen from, e.g., mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, and/or h13.2v3, as described herein, or at least particularly the amino acids from those hypervariable loops that contact IL-13. In yet another embodiment, the antibody or fragment thereof includes at least one, two, or three hypervariable loops from a light chain variable region of an antibody chosen from, e.g., mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, and/or h13.2v3, as described herein, or at least includes the amino acids from those hypervariable loops that contact IL-13. In yet another embodiment, the antibody or fragment thereof includes at least one, two, three, four, five, or six hypervariable loops from the heavy and light chain variable regions of an antibody chosen from, e.g., mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, and/or h13.2v3, as described herein.

[0019] In one preferred embodiment, the protein includes all six hypervariable loop's from mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, and/or h13.2v3 or closely related hypervariable loops, e.g., hypervariable loops 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, e.g., conservative substitutions). Optionally, the protein may include any hypervariable loop described herein.

[0020] In still another example, the protein includes at least one, two, or three hypervariable loops that have the same canonical structures as the corresponding hypervariable loop of mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, and/or h13.2v3, e.g., the same canonical structures as at least loop 1 and/or loop2 of the heavy and/or light chain variable domains of mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, and/or h13.2v3. See, e.g., Chothia et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227:799-817; Tomlinson et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227:776-798 for descriptions of hypervariable loop canonical structures. These structures can be determined by inspection of the tables described in these references.

[0021] 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 chosen

from: (a) a light or heavy chain variable framework including at least 80%, 85%, 87% 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 98%, or preferably 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 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 remove antigenic or cytotoxic determinants, e.g., deimmunized, or partially humanized. In one embodiment, the light or heavy chain variable framework region (particularly FR1, FR2 and/or FR3) includes a light or heavy chain variable framework sequence at least 70, 75, 80, 85, 87, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99% identical or identical to the frameworks of a VH segment of a human germline gene, e.g., DP-54 or DPK9. In one embodiment, the heavy chain variable region 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, 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).

[0022] In one embodiment, the protein includes at least one non-human CDR, e.g., a murine CDR, e.g., a CDR from mAb13.2, or a mutant thereof, and at least one framework which differs from a framework of mAb13.2 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 CDR's 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.

[0023] In one embodiment, the heavy or light chain variable domain of the antibody includes an amino acid sequence, which is at least 80%, 85%, 90%, 92%,

95%, 97%, 98%, 99% or higher identical to a variable region of an antibody described herein, e.g., mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, and/or h13.2v3; or which differs at at least 1 or 5 residues, but less than 40, 30, 20, or 10 residues, from a variable region of an antibody described herein, e.g., mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, and/or h13.2v3.

[0024] In one embodiment, one or both of the variable domains 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, the variable domain will include a 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 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 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.

[0025] In one embodiment, the heavy or light chain variable region 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 (e.g., a specific nucleic acid sequence or a nucleic acid sequence that encodes an amino acid sequence described herein) or its complement, e.g., under low stringency, medium stringency, high stringency, or very high stringency conditions, or other hybridization condition described herein.

[0026] In another embodiment, the antibody or fragment thereof comprises at least one, two, three, or four antigen-binding regions, e.g., variable regions, having an amino acid sequence as set forth in Table 3 (SEQ ID NOs:13, 14, 15, 16, or 36 for VH,

and/or SEQ ID NOs:9, 10, 11, 12, or 35 for VL), or a sequence substantially identical thereto (e.g., a sequence at least about 85%, 90%, 95%, 99% or more identical thereto, or which differs by no more than 1, 2, 5, 10, or 15 amino acid residues from SEQ ID NOs:9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 35, or 36). In another embodiment, the antibody includes a VH and/or VL domain encoded by a nucleic acid having a nucleotide sequence as set forth in Table 2 (SEQ ID NOs:5, 6, 7, 8, or 34 for VH, and/or SEQ ID NOs:1, 2, 3, 4, or 33 for VL), or a sequence substantially identical thereto (e.g., a sequence at least about 85%, 90%, 95%, 99% or more identical thereto, or which differs by no more than 3, 6, 15, 30, or 45 nucleotides from SEQ ID NOs:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 33, or 34). In yet another embodiment, the antibody or fragment thereof comprises at least one, two, or three CDRs from a heavy chain variable region having an amino acid sequence as set forth in Table 1 (SEQ ID NOs:22, 23, or 24 for VH CDRs 1-3, respectively), or a sequence substantially homologous thereto (e.g., a sequence at least about 85%, 90%, 95%, 99% or more identical thereto, and/or having one or more substitutions, e.g., conserved substitutions). In yet another embodiment, the antibody or fragment thereof comprises at least one, two, or three CDRs from a light chain variable region having an amino acid sequence as set forth in Table 1 (SEQ ID NOs:19, 20, or 21 for VL CDRs 1-3, respectively), or a sequence substantially homologous thereto (e.g., a sequence at least about 85%, 90%, 95%, 99% or more identical thereto, and/or having one or more substitutions, e.g., conserved substitutions). In yet another embodiment, the antibody or fragment thereof comprises at least one, two, three, four, five or six CDRs from heavy and light chain variable regions having an amino acid sequence as set forth in Table 1 (SEQ ID NOs:22, 23, 24 for VH CDRs 1-3, respectively; and SEQ ID NO:19, 20, or 21 for VL CDRs 1-3, respectively), or a sequence substantially homologous thereto (e.g., a sequence at least about 85%, 90%, 95%, 99% or more identical thereto, and/or having one or more substitutions, e.g., conserved substitutions).

[0027] In yet another embodiment, the antibody or fragment thereof comprises at least one, two, or three Chothia hypervariable loops from a heavy chain variable region having an amino acid sequence of VH Chothia hypervariable loops 1-3, respectively, or a sequence substantially homologous thereto (e.g., a sequence at least about 85%, 90%, 95%, 99% or more identical thereto, and/or having one or more

substitutions, e.g., conserved substitutions). In yet another embodiment, the antibody or fragment thereof comprises at least one, two, or three Chothia hypervariable loops from a light chain variable region having an amino acid sequence of Chothia hypervariable loops 1-3, respectively, or a sequence substantially homologous thereto (e.g., a sequence at least about 85%, 90%, 95%, 99% or more identical thereto, and/or having one or more substitutions, e.g., conserved substitutions).

[0028] In another embodiment, the anti-IL-13 antibody or fragment thereof comprises a human IgG1 constant region having an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:17 or a sequence substantially homologous thereto (e.g., a sequence at least about 85%, 90%, 95%, 99% or more identical thereto, or which differs by no more than 1, 2, 5, 10, 50, or 100 amino acid residues from SEQ ID NO:17), or at corresponding positions. In another embodiment, the anti-IL-13 antibody comprises a human kappa constant chain having an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:18 or a sequence substantially homologous thereto (e.g., a sequence at least about 85%, 90%, 95%, 99% or more identical thereto, or which differs by no more than 1, 2, 5, 10, 20, or 50 amino acid residues from SEQ ID NO:18). In yet another embodiment, the antibody or fragment thereof comprises a human IgG1 constant region and a human kappa constant chain, e.g., as described herein.

[0029] In yet another embodiment, the anti-IL-13 antibody or fragment thereof comprises a heavy chain variable domain that contacts IL-13, typically human IL-13, via hydrogen bonds at at least one, two, three or four residues chosen from, e.g., Serine 50 (CDR2), Serine 53 (CDR2), Tyrosine 101 (CDR3), Tyrosine 102 (CDR3), or a conservative substitution thereof, of the heavy chain variable region shown in FIG. 29 according to the linear sequence numbering scheme (see also, e.g., FIG. 17), or at positions that correspond to such amino acid residues in the heavy chain variable domain. In one embodiment, the antibody or fragment thereof comprises a heavy chain variable region that contacts IL-13, typically human IL-13, via van der Waals forces at at least one, two, three, four, five, six, seven, eight, nine, ten, eleven, twelve, thirteen, or fourteen residues chosen from, e.g., Isoleucine 30 (CDR1), Serine 31 (CDR1), Alanine 33 (CDR1), Tryptophan 47, Serine 50 (CDR2), Serine 52 (CDR2), Serine 53 (CDR2), Tyrosine 58 (CDR2), Leucine 98 (CDR3), Aspartate 99 (CDR3), Glycine 100 (CDR3), Tyrosine 101 (CDR3), Tyrosine 102 (CDR3), Phenylalanine 103 (CDR3), or a

conservative substitution thereof, of the heavy chain variable region shown in FIG. 29 according to the linear sequence numbering scheme (see also, e.g., FIG. 17), or at positions that correspond to such amino acid residues in the heavy chain variable domain. In another embodiment, the antibody or fragment thereof comprises a heavy chain variable region that contacts IL-13, typically human IL-13, via hydrogen bonds at at least one, two, three or four residues chosen from, e.g., Serine 50 (CDR2), Serine 53 (CDR2), Tyrosine 101 (CDR3), Tyrosine 102 (CDR3), or a conservative substitution thereof, and via van der Waals forces at at least one, two, three, four, five, six, seven, eight, nine, ten, eleven, twelve, thirteen, or fourteen residues chosen from, e.g., Isoleucine 30 (CDR1), Serine 31 (CDR1), Alanine 33 (CDR1), Tryptophan 47, Serine 50 (CDR2), Serine 52 (CDR2), Serine 53 (CDR2), Tyrosine 58 (CDR2), Leucine 98 (CDR3), Aspartate 99 (CDR3), Glycine 100 (CDR3), Tyrosine 101 (CDR3), Tyrosine 102 (CDR3), Phenylalanine 103 (CDR3), or a conservative substitution thereof, of the heavy chain variable region shown in FIG. 29 according to the linear sequence numbering scheme (see also, e.g., FIG. 17), or at positions that correspond to such amino acid residues in the heavy chain variable domain.

[0030] In another embodiment, the anti-IL-13 antibody or fragment thereof comprises a light chain variable region that contacts IL-13, typically human IL-13, via hydrogen bonds at at least one, two, three, four or five residues chosen from, e.g., Asparagine 31 (CDR1), Tyrosine 32 (CDR1), Lysine 34 (CDR1), Asparagine 96 (CDR3), Aspartate 98 (CDR3), or a conservative substitution thereof, of the light chain variable region shown in FIG. 30 according to the linear sequence numbering scheme (see also, e.g., FIG. 18). In yet another embodiment, the anti-IL-13 antibody or fragment thereof comprises a light chain variable region that contacts IL-13, typically human IL-13, via van der Waals forces at at least one, two, three, four, five, six, or seven residues chosen from, e.g., Asparagine 31 (CDR1), Tyrosine 32 (CDR1), Lysine 34 (CDR1), Arginine 54 (CDR2), Asparagine 96 (CDR3), Aspartate 98 (CDR3), Tryptophan 100 (CDR3), or a conservative substitution thereof, of the light chain variable region shown in FIG. 30 according to the linear sequence numbering scheme (see also, e.g., FIG. 18). In another embodiment, the antibody or fragment thereof comprises a light chain variable region that contacts IL-13, typically human IL-13, via hydrogen bonds at at least one, two, three, four or five residues chosen from, e.g.,

Asparagine 31 (CDR1), Tyrosine 32 (CDR1), Lysine 34 (CDR1), Asparagine 96 (CDR3), Aspartate 98 (CDR3), or a conservative substitution thereof, of the light chain variable region, and via van der Waals forces at at least one, two, three, four, five, six, or seven residues chosen from, e.g., Asparagine 31 (CDR1), Tyrosine 32 (CDR1), Lysine 34 (CDR1), Arginine 54 (CDR2), Asparagine 96 (CDR3), Aspartate 98 (CDR3), Tryptophan 100 (CDR3), or a conservative substitution thereof, of the light chain variable region shown in FIG. 30 according to the linear sequence numbering scheme (see also, e.g., FIG. 18).

[0031] In another embodiment, the anti-IL-13 antibody or fragment thereof comprises heavy and light chain variable regions that contact IL-13, e.g., human IL-13, via hydrogen bonds as described herein. In yet another embodiment, the anti-IL-13 antibody or fragment thereof comprises heavy and light chain variable regions that contact IL-13, e.g., human IL-13, via van der Waals forces as described herein. In one embodiment, the anti-IL-13 antibody or fragment thereof comprises heavy and light chain variable regions that contact IL-13, e.g., human IL-13, via hydrogen bonds and van der Waals forces as described herein.

[0032] In yet another embodiment, the IL-13 antagonist, e.g., anti-IL-13 antibody or fragment thereof, comprises a heavy chain variable region having one or more mutations at positions 13, 19, 40, 42, 44, 75, 77, 83, 87, 92, or 113 of SEQ ID NO:14. In another embodiment, the heavy chain variable region of the anti-IL-13 antibody or fragment thereof further comprises a mutation at position 3 of SEQ ID NO:14. In one embodiment, the heavy chain variable region of the anti-IL-13 antibody or fragment thereof comprises one or more of the following substitutions: Lysine replaced by Glutamine at position 3, Lysine replaced by Glutamine at position 13, Lysine replaced by Arginine at position 19, Threonine replaced by Alanine at position 40, Glutamate replaced by Glycine at position 42, Arginine replaced by Glycine at position 44, Arginine replaced by Lysine at position 75, Isoleucine replaced by Serine at position 77, Serine replaced by Asparagine at position 83, Serine replaced by Alanine at position 87, Methionine replaced by Valine at position 92, or Threonine replaced by Leucine at position 113 of SEQ ID NO:14.

[0033] In another embodiment, the IL-13 antagonist, e.g., anti-IL-13 antibody or fragment thereof, comprises a light chain variable region having one or more mutations at positions 3, 9, 12, 13, 15, 17, 19, 22, 46, 47, 62, 64, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 87, or 108 of SEQ ID NO:10. In another embodiment, the light chain variable region of the anti-IL-13 antibody, or fragment thereof, further comprises one or more mutations at positions 4 or 72 of SEQ ID NO:10. In one embodiment, the light chain variable region of the anti-IL-13 antibody or fragment thereof comprises one or more of the following substitutions: Valine replaced by Glutamine at position 3, Leucine replaced by Methionine at position 4, Alanine replaced by Serine at position 9, Alanine replaced by Serine at position12, Valine replaced by Alanine at position 13, Leucine replaced by Valine at position 15, Glutamine replaced by Aspartate at position 17, Alanine replaced by Valine at position 19, Serine replaced by Threonine at position 22, Glutamine replaced by Lysine at position 46, Serine replaced by Alanine at position 47, Isoleucine replaced by Valine at position 62, Alanine replaced by Serine at position 64, Arginine replaced by Glycine at position 72, Asparagine replaced by Serine at position 80, Proline replaced by Serine at position 81, Valine replaced by Leucine at position 82, Glutamate replaced by Glutamine at position 83, Alanine replaced by Proline at position 84, Aspartate replaced by Glutamate at position 85, Valine replaced by Phenylalanine at position 87, or Leucine replaced by Valine at position 108 of SEQ ID NO:10.

[0034] In another embodiment, the antibody or antigen binding fragment thereof includes one or more CDRs that has a backbone conformation of a CDR described in Table 10 (of Application 16163-029001) ± a root mean square deviation (RMSD) of not more than 1.5, 1.2, 1.1, or 1.0 Angstroms, Table 11 (of Application 16163-029001) ± an RMSD of not more than 1.5, 1.2, 1.1, or 1.0 Angstroms, or Table 12 (of Application 16163-029001) ± an RMSD of not more than 1.5, 1.2, 1.1, or 1.0 Angstroms. For example, one, two, or three of the CDRs of the heavy chain variable domain (e.g., particularly in CDR3, or in at least two CDRs, e.g., CDR1 and CDR3, CDR2 and CDR3, or in all three CDRs) have an RMSD of not more than 1.5, 1.2, 1.1, or 1.0 Angstroms relative to those structures. For example, one, two, or three of the CDRs of the light chain variable domain (e.g., particularly in CDR1, or in at least two CDRs, e.g., CDR1 and CDR3, CDR1 and CDR2, or in all three CDRs) have an RMSD

of not more than 1.5, 1.2, 1.1, or 1.0 Angstroms relative to those structures. In embodiment, the antibody or antigen binding fragment thereof includes a variable domain that, as a whole, has a backbone conformation of a CDR described in Table 10 (of Application 16163-029001) ± a root mean square deviation (RMSD) of not more than 1.5, 1.2, 1.1, or 1.0 Angstroms, Table 11 (of Application 16163-029001) ± an RMSD of not more than 1.5, 1.2, 1.1, or 1.0 Angstroms, or Table 12 (of Application 16163-029001) ± an RMSD of not more than 1.5, 1.2, 1.1, or 1.0 Angstroms. The variable domain can also be at least at least 70%, 80%, 85%, 87%, 90%, 92%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% identical to an antibody described herein, e.g., in the CDR region and/or framework regions.

[0035] In yet another embodiment, the IL-13 antagonist, e.g., anti-IL-13 antibody or fragment thereof, comprises a heavy chain variable region having one or more mutations at positions 3, 13, 19, 40, 42, 44, 75, 77, 83, 87, 92, or 113 of SEQ ID NO:14 (e.g., the mutations as described herein), and a light chain variable region having one or more mutations at positions 3, 4, 9, 12, 13, 15, 17, 19, 22, 46, 47, 62, 64, 72, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 87, or 108 of SEQ ID NO:10 (e.g., the mutations as described herein).

[0036] The IL-13 antagonist, e.g., anti-IL-13 antibody or fragment thereof described herein, can be derivatized or linked to another functional molecule, e.g., another peptide or protein (e.g., an Fab fragment). For example, the fusion protein or an antibody, or antigen-binding portion, can be functionally linked (e.g., by chemical coupling, genetic fusion, noncovalent association or otherwise) to one or more other molecular entities, such as an antibody (e.g., a bispecific or a multispecific antibody), toxins, radioisotopes, cytotoxic or cytostatic agents, among others.

[0037] In yet another embodiment, the IL-13 antagonist, e.g., the anti-IL-13 antibody or fragment thereof described herein, or a pharmaceutical composition thereof, is administered alone or in combination therapy, i.e., combined with other agents, e.g., therapeutic agents, which are useful for treating IL-13-associated disorders. 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 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, urticaria, eczema, allergic rhinitis, and allergic enterogastritis); inflammatory and/or autoimmune conditions of, the skin (e.g., atopic dermatitis), gastrointestinal organs (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 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), as described herein.

[0038] The combination therapy can include one or more IL-13 antagonists, e.g., anti-IL-13 antibodies or fragments thereof, 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, and/or cytotoxic or cytostatic agents, as described in more herein.

[0039] Examples of preferred additional therapeutic agents that can be coadministered and/or coformulated with one or more IL-13 antagonists, e.g., anti-IL-13 antibodies or fragments thereof, include, but are not limited to, one or more of: inhaled steroids; beta-agonists, e.g., short-acting or long-acting beta-agonists; antagonists of 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 disorders. 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., TNFα 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 NFκB inhibitors, among others.

[0040] In another aspect, this application provides compositions, e.g., pharmaceutical compositions that include a pharmaceutically acceptable carrier and at least one IL-13 antagonist, e.g., anti-IL-13 antibody or fragment thereof described herein. In one embodiment, the compositions, e.g., pharmaceutical compositions, comprise a combination of two or more one of the aforesaid IL-13 antagonists, e.g., anti-IL-13 antibodies or fragments thereof. Combinations of the IL-13 antagonist, e.g., the anti-IL-13 antibody or fragment thereof, 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) are also within the scope of the invention.

[0041] This application also features nucleic acids comprising nucleotide sequences that encode heavy and light chain variable regions of the anti-IL-13 antibodies, and fragments thereof, as described herein. For example, the application features a first and second nucleic acid encoding heavy and light chain variable regions, respectively, of an anti-IL-13 antibody chosen from one or more of, e.g., mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, and/or h13.2v3, as described herein.

[0042] In another aspect, the application features host cells and vectors containing the nucleic acids described herein.

[0043] The epitope of IL-13, e.g., human IL-13, recognized by one or more of, e.g., mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, and/or h13.2v3, is featured. In one embodiment, the anti-IL-13 antibody or fragment thereof binds to an epitope comprising residues 81-93 and/or 114-132 of human IL-13 (SEQ ID NO:31), or a modified form thereof (e.g., a fragment or substituted (e.g., conservatively substituted)

form thereof). In one embodiment, the epitope of human IL-13 comprises one or more of: Glutamate at position 49, Asparagine at position 53, Glycine at position 69, Proline at position 72, Histidine at position 73, Lysine at position 74, and Arginine at position 86 of SEQ ID NO:32, or a conserved amino acid substitution thereof.

[0044] 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-13Rα1 and IL-4Rα, or a subunit thereof. The modulating can be effected in vivo or in vitro. In other embodiments, the IL-13 antagonist, e.g., the anti-IL-13 antibody or fragment thereof, 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-13Rα1 or IL-4Rα, individually. In yet another embodiment, the IL-13 antagonist, e.g., the anti-IL-13 antibody or fragment thereof, binds to IL-13, and interferes with (e.g., inhibits, blocks or otherwise reduces) an interaction, e.g., binding, between IL-13/IL-13Rα1 and IL-4Rα. In another embodiment, the IL-13 antagonist, e.g., the anti-IL-13 antibody or fragment thereof, binds to IL-13, and interferes with (e.g., inhibits, blocks or otherwise reduces) an interaction, e.g., binding, between IL-13/IL-4Rα and IL-13Rα1. Typically, the anti-IL-13 antibody or fragment thereof interferes with (e.g., inhibits, blocks or otherwise reduces) an interaction, e.g., binding, of IL-13/IL-13Rα1 with IL-4Rα.

[0045] The subject method 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 cells can be cultured *in vitro* in culture medium and the contacting step can be effected by adding one or more anti-IL-13 antibodies or fragments thereof, e.g., anti-IL-13 antibodies or fragments thereof as described herein, to the culture medium. Alternatively, the method can be performed on cells present in a subject, e.g., as part of an *in vivo* (e.g., therapeutic or prophylactic) protocol.

[0046] In another aspect, this application features a method of treating (e.g., curing, suppressing, ameliorating, delaying or preventing the onset of, or preventing recurrence or relapse of) or preventing an IL-13-associated disorder, in a subject. The method includes: administering to the subject an IL-13 binding agent (particularly an

antagonist), e.g., an anti-IL-13 antibody or fragment thereof as described herein, in an amount sufficient to treat or prevent the IL-13-associated disorder. The IL-13 antagonist, e.g., the anti-IL-13 antibody or fragment thereof, can be administered to the subject, alone or in combination with other therapeutic modalities as described herein. In one embodiment, the subject is a mammal, e.g., a human suffering from one or more IL-13-associated disorders, including, e.g., respiratory disorders (e.g., asthma (e.g., allergic and nonallergic asthma), chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and other conditions involving airway inflammation, eosinophilia, fibrosis and excess mucus production; atopic disorders (e.g., atopic dermatitis and allergic rhinitis); inflammatory and/or autoimmune conditions of, the skin, gastrointestinal organs (e.g., inflammatory bowel diseases (IBD), such as ulcerative colitis and/or Crohn's disease), and liver (e.g., cirrhosis, fibrosis); scleroderma; tumors or cancers, e.g., Hodgkin's lymphoma as described herein. Accordingly, the disclosure includes the use of an IL-13 binding agent (such as an anti-IL-13 antibody or fragment thereof described herein) for a treatment described herein and the use of an IL-13 binding agent (such as an anti-IL-13 antibody or fragment thereof described herein) for preparing a medicament for a treatment described herein.

[0047] Examples of IL-13-associated disorders include, but are not limited to, a disorder chosen from one or more of: respiratory disorders, e.g., asthma (e.g., allergic 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, urticaria, eczema, allergic rhinitis, and allergic enterogastritis); inflammatory and/or autoimmune conditions of, the skin (e.g., atopic dermatitis), gastrointestinal organs (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 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), as described herein.

[0048] In other embodiments, this application provides a method of treating (e.g., reducing, ameliorating) or preventing one or more symptoms associated with a respiratory disorder, e.g., asthma (e.g., allergic and nonallergic asthma); allergies; chronic obstructive pulmonary disease (COPD); a condition involving airway inflammation, eosinophilia, fibrosis and excess mucus production, e.g., cystic fibrosis and pulmonary fibrosis. For example, symptoms of asthma include, but are not limited to, wheezing, shortness of breath, bronchoconstriction, airway hyperreactivity, decreased lung capacity, fibrosis, airway inflammation, and mucus production. The method comprises administering to the subject an IL-13 antagonist, e.g., an IL-13 antibody or a fragment thereof, in an amount sufficient to treat (e.g., reduce, ameliorate) or prevent one or more symptoms. The IL-13 antibody can be administered therapeutically or prophylactically, or both. The IL-13 antagonist, e.g., the anti-IL-13 antibody, or fragment thereof, can be administered to the subject, alone or in combination with other therapeutic modalities as described herein. Preferably, the subject is a mammal, e.g., a human suffering from an IL-13-associated disorder as described herein.

[0049] 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 the anti-IL-13 antibody or fragment thereof as described herein; and (ii) detecting formation of a complex between the anti-IL-13 antibody or fragment thereof, 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.

[0050] 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 the anti-IL-13 antibody or fragment thereof as described

herein to a subject or a control subject under conditions that allow binding of the antibody or fragment to IL-13; and (ii) detecting formation of a complex between the antibody or fragment 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.

[0051] Preferably, the antibody or fragment thereof 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.

[0052] 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.

[0053] Kits comprising the IL-13 antagonists described herein, e.g., the anti-IL-13 antibodies or fragment thereof, for therapeutic and diagnostic uses are also within the scope of the application.

[0054] In another aspect, this application provides methods for providing an antibody that includes a heavy chain variable domain and a light chain variable domain. The methods include preparing an antibody (or a nucleic acid encoding such an antibody) by using one or more framework regions from DP-54 and DPK-9 or framework regions at least 75, 80, 82, 85, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, or 98% identical to one or more framework regions of DP-54 and DPK-9. In one embodiment, the method includes engineering CDRs or portions of CDRs from a non-human antibody into the context of a variable domain that includes DP-54 and DPK-9 frameworks in the heavy chain variable domain and the light chain variable domain, respectively, or a variable domain that includes framework regions at least 75, 80, 82, 85, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, or 98% identical to one or more framework regions of DP-54 and DPK-9. Nucleic acids that include sequences encoding protein chains that include such variable domains can be expressed in mammalian cells, e.g., tissue culture cells.

[0055] In a related aspect, the application features an antibody, e.g., an artificial antibody, that includes a heavy chain variable domain and a light chain variable domain, wherein the heavy chain variable domain includes using one or more

framework regions from DP-54 or framework regions at least 75, 80, 82, 85, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, or 98% identical to one or more framework regions of DP-54, and the light chain variable domain includes using one or more framework regions from DPK-9 or framework regions at least 75, 80, 82, 85, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, or 98% identical to one or more framework regions of DPK-9. The one or more of the CDRs and/or hypervariable loops are generally non-human, e.g., from a non-human antibody such as a murine antibody. In one embodiment, the antibody binds to a human antigen, e.g., IL-13 or an antigen other than IL-13.

[0056] Other features and advantages will be apparent from the following detailed description and claims.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0057] FIG. 1: Kinetic parameters of mAb13.2 binding to human IL 13. The binding interactions between biotinylated IL-13 immobilized to a 69 RU streptavidin chip and monoclonal antibody mAb13.2, monoclonal antibody mAb13.4, or monoclonal antibody mAb13.9 are depicted as resonance units (RU; y-axis) over time (x-axis). Kinetic constants for mAb13.2 also are shown.

[0058] FIG. 2: Kinetic parameters of mAb13.2 binding to IL-13. The binding interaction between various doses of human IL-13 and monoclonal antibody mAb13.2 immobilized to a BIACORE™ chip is depicted as resonance difference (RU; y-axis) over time (x-axis). Kinetic constants for mAb13.2 also are shown.

[0059] FIG. 3: Monoclonal antibody mAb13.2 binds to native human IL-13. The figure shows the average absorbance value (A_{450}; y-axis) of biotinylated mAb13.2 bound to FLAG-human IL-13 in the presence of increasing concentrations (x-axis) of recombinant human IL-13 (♦), recombinant murine IL-13 (○), or native human IL-13 (Δ) isolated from mitogen-activated, Th2-skewed, cord blood mononuclear cells.

[0060] FIG. 4: Monoclonal antibody mAb13.2 binds to and neutralizes the ARG-variant form of human IL-13. (**A**) The response (y-axis) of human IL-13 or a

recombinantly expressed ARG-variant of IL-13 passed over biotinylated mAb13.2 immobilized to a BIACORE™ chip is shown as a function of time (x-axis). **(B)** The proliferation of TF1 cells (y-axis) incubated with increasing concentrations of mAb13.2 (x-axis) and either recombinant human IL-13 or a recombinantly expressed ARG-variant of IL-13 is shown.

[0061] FIG. 5: Monoclonal antibody mAb13.2 inhibits the bioactivity of human IL-13 with an IC50 comparable to that of a soluble IL-13 receptor. The proliferation of the IL-13-dependent TF1 cell line, as determined by ^{3}H-thymidine incorporation, is measured as cpm (y-axis) after 3 days of incubation with IL-13 and increasing concentrations (x-axis) of either mAb13.2 or soluble IL-13 receptor (rhuIL-13Ra2).

[0062] FIG. 6: Monoclonal antibody mAb13.2 inhibits IL 13-mediated CD23 expression, but not IL 4-mediated CD23 expression, on normal human monocytes. **(A)** The percentage of monocytes that expressed cell surface CD23 (y-axis) after peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isolated from a healthy donor were treated overnight with the indicated concentration (x-axis) of recombinant human IL-13 (•) or IL-4 (o) is shown. **(B)** The percentage of monocytes that expressed cell surface CD23 (y-axis) after PBMCs isolated from a healthy donor were treated with IL-13 and indicated concentrations of purified mouse mAb13.2 (x-axis) is shown. **(C)** The percentage of monocytes that expressed cell surface CD23 (y-axis) after PBMCs isolated from a healthy donor were treated overnight with IL-4 and the indicated concentrations of purified mouse mAb13.2 (x-axis) is shown.

[0063] FIG. 7: Monoclonal antibody mAb13.2 inhibits IL 13-dependent IgE production by human B cells. The concentration of IgE in supernatant isolated from PBMCs cultured in media alone or various combinations of PHA, IL-13, control antibody (ms IgG), mAb13.2, and mAb13.8 (x-axis) is shown as the absorbance at 450 nm (IgE (O.D.450); y-axis).

[0064] FIG. 8: Monoclonal antibody mAb13.2 inhibits IL 13-mediated STAT6 phosphorylation by human epithelial cells. **(A)** Western blot analysis for phosphorylated STAT6 in cell lysates isolated from HT-29 cells treated with the

indicated concentration of IL-13 is shown. **(B)** The graph demonstrates the number of HT-29 cells as determined by flow cytometric analysis (counts; y-axis), that demonstrated fluorescence (phospho-STAT6; x-axis) after the cells were untreated (filled histogram) or treated (unfilled histogram) with IL-13 and stained with ALEXA™ Fluor 488-labeled monoclonal antibody to phosphorylated STAT6. **(C)** The graphs demonstrate the number of HT-29 cells as determined by flow cytometric analysis (counts; y-axis), that demonstrated fluorescence (phospho-STAT6) after the cells remained untreated (filled histograms); or were treated (unfilled histograms) with IL-13 (upper left graph), IL-13 and mAb13.8 (lower left graph), IL-13 and mAb13.2 (upper right graph), or IL-13 and control antibody (msG1) (lower right graph) and stained with ALEXA™ Fluor 488.

[0065] FIG. 9: Monoclonal antibody mAb13.2 prevents *Ascaris*-induced lung eosinophilia *in vivo*. The figure demonstrates the percentage of eosinophils found in bronchoalveolar lavage (BAL) samples (y-axis) taken from untreated cynomolgus monkeys (ascaris/PBS) (●,◉), cynomolgus monkeys pretreated with mAb13.2 (ascaris/mAb13.2) (◆,◈) or cynomolgus monkeys previously treated with mAb13.2 and challenged with *Ascaris suum* antigen (ascaris/rechallenge ~3 months post-Ab) (▲,▲), prior to challenge (dark symbols) or 24 hours post-challenge or rechallenge (light symbols) with *Ascaris suum* antigen.

[0066] FIG. 10: Cocrystal structure of mAb13.2 Fab fragment with human IL-13. X-ray crystallography of the mAb13.2 Fab fragment reveals the light chain with dark shading, and the heavy chain in lighter shading. Also shown is the IL-13 structure (at right). The figure also depicts interaction of the C-alpha helix of IL-13 with the CDR loops of the antibody.

[0067] FIG. 11: Human IL-13 sequence analysis showing mAb13.2 contact sites. The panel shows the amino acid sequence of human IL-13, wherein the arrow indicates the signal peptide cleavage site, the four alpha helices are underlined, the antibody contact sites from the mAb13.2 Fab – IL-13 cocrystal structure are highlighted in light boxes, and the ARG-variant residue is highlighted in a dark box.

[0068] FIG. 12: Fab fragments of mAb13.2 bind to human IL-13. The figure shows the average absorbance value (450 nm; y-axis) of biotinylated mAb13.2 bound to FLAG-human IL-13 in the presence of competing unlabeled mAb13.2 (♦), mAb13.2 Fab fragments (●), or irrelevant antibody (*) at increasing concentrations (x-axis) expressed as **(A)** pM antibody or **(B)** pM binding sites.

[0069] FIG. 13: Fab fragments of mAb13.2 neutralize IL-13-mediated TF1 proliferation and IL-13-mediated CD23 expression by human monocytes. **(A)** The graph shows the percentage of the maximum proliferation by IL-13-dependent TF1 cell line achieved (y-axis) after 3 days of incubation with IL-13 and increasing concentrations of competitor binding sites (x-axis) provided by either mAb13.2 (♦) or mAb13.2 Fab fragments (●). **(B)** The figure shows the percentage of the maximum number of monocytes that expressed cell surface CD23 (y-axis) as determined by flow cytometric analysis after peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isolated from a healthy donor were treated overnight with 1 ng/ml IL-13 and indicated concentrations of competitor binding sites (x-axis) provided by either mAb13.2 (♦) or mAb13.2 Fab fragments (●).

[0070] FIG. 14: Chimeric version (ch13.2) of the mouse monoclonal antibody mAb13.2 binds to and neutralizes IL-13. **(A)** Shown is the absorbance at 450 nm (A_{450}; y-axis) of samples containing IL-13-FLAG and biotinylated mAb13.2 only (- -) and samples containing IL-13-FLAG, biotinylated mAB13.2 and increasing concentrations (x-axis) of mAb13.8 (•), mAb13.2 (o), or chimeric mAb13.2 (ch13.2; ▲) as determined by ELISA. **(B)** Shown is the percentage of monocytes that expressed cell surface CD23 (y-axis) after PBMCs isolated from a healthy donor were treated overnight with 1 ng/ml IL-13 and indicated concentrations (x-axis) of purified mouse mAb13.2 (●) or chimeric mAb13.2 (ch13.2; ♦).

[0071] FIG. 15: Comparison of the human DP-54 germline gene with the variable heavy (VH) chain amino acid sequences of a chimeric version of mAb13.2 and a partially humanized version of mAb13.2 (h13.2v1). The figure shows the complementarity determining regions (CDR) (boxed regions) and amino acid sequences of DP-54, the variable heavy region of a chimeric version of mAb13.2 (chimeric 13.2), and the variable heavy region of a partially humanized version of

mAb13.2 (h13.2v1) as aligned and compared with SEQWEB™, wherein the amino acid substitutions made for the partially humanized version of mAb13.2 (h13.2v1) are indicated with shaded boxes and the residues left unchanged are underlined.

[0072] FIG. 16: Comparison of the human DPK9 germline gene with the variable light (VL) chain amino acid sequences of a chimeric version of mAb13.2 and a partially humanized version of mAb13.2 (h13.2v1). The figure shows the complementarity determining regions (CDR) (boxed regions) and amino acid sequences of DPK-9, the variable light region of a chimeric version of mAb13.2 (chimeric 13.2), and the variable light region of a partially humanized version of mAb13.2 (h13.2v1) as aligned and compared with SEQWEB™, wherein the amino acid substitutions made for the partially humanized version of mAb13.2 (h13.2v1) are indicated with shaded boxes and the residues left unchanged are underlined.

[0073] FIG. 17: Comparison of the human DP-54 germline gene with the variable heavy (VH) chain amino acid sequences of a chimeric version of mAb13.2 and a fully humanized version of mAb13.2 (h13.2v2). The figure shows the complementarity determining regions (CDR) (boxed regions) and amino acid sequences of DP-54, the variable heavy region of a chimeric version of mAb13.2 (chimeric 13.2), and the variable heavy region of a fully humanized version of mAb13.2 (h13.2v2) as aligned and compared with SEQWEB™, wherein the amino acid substitutions made for the fully humanized version of mAb13.2 (h13.2v2) are indicated with shaded boxes and the residues left unchanged are underlined.

[0074] FIG. 18: Comparison of the human DPK9 germline gene with the variable light (VL) chain amino acid sequences of a chimeric version of mAb13.2 and a fully humanized version of mAb13.2 (h13.2v2). The figure shows the complementarity determining regions (CDR) (boxed regions) and amino acid sequences of DPK-9, the variable light region of a chimeric version of mAb13.2 (chimeric 13.2), and the variable light region of a fully humanized version of mAb13.2 (h13.2v2) as aligned and compared with SEQWEB™, wherein the amino acid substitutions made for the fully humanized version of mAb13.2 (h13.2v2) are indicated with shaded boxes and the residues left unchanged are underlined.

[0075] FIG. 19: Fully humanized mAb13.2 (h13.2v2) retains full binding activity to IL-13. **(A)** Shown is the absorbance at 450 nm (A_{450}; y-axis), as determined by ELISA, of samples containing IL-13-FLAG and biotinylated mAb13.2 only (- -) and samples containing IL-13-FLAG, biotinylated mAB13.2 and increasing concentrations (x-axis) of mAb13.2 (•), chimeric mAb13.2 (ch13.2; ∘), partially humanized mAb13.2 (h13.2v1; ▲) or fully humanized mAB13.2 (h13.2v2; △). **(B)** The binding interaction between human IL-13 at different dose ranges and fully humanized mAb13.2 (h13.2v2) immobilized to a Biacore™ chip is depicted as resonance difference (RU; y-axis) over time (x-axis). Kinetic constants for h13.2v2 also are shown.

[0076] FIG. 20: Chimeric mAb13.2 (ch13.2), partially humanized mAB13.2 (h13.2v1), and fully humanized mAb13.2 (h13.2v2) can neutralize IL-13-mediated CD23 expression and IL-13-mediated phosphorylation of STAT6. **(A)** Shown is the percentage of monocytes that expressed cell surface CD23 (y-axis) after PBMCs isolated from a healthy donor were treated overnight with 1 ng/ml IL-13 and indicated concentrations (x-axis) of chimeric mAb13.2 (ch13.2; ♦), partially humanized mAb13.2 (h13.2v1; □), or fully humanized mAb13.2 (h13.2v2; ∘). **(B)** The percent of HT-29 cells that expressed phosphorylated STAT6 (y-axis) after incubation with IL-13 and indicated concentration (x-axis) of chimeric mAb13.2 (ch13.2; ♦), partially humanized mAb13.2 (h13.2v1; □), or fully humanized mAb13.2 (h13.2v2; ∘) as determined by flow cytometric analysis is depicted.

[0077] FIG. 21: The ability of fully humanized mAb13.2 (h13.2v2) to neutralize human IL-13 mediated CD23 expression is comparable to the ability of mAb13.2 to do the same. The number of gated monocytes that express cell surface CD23 after incubation with **(A)** recombinant human IL-13 or **(B)** native human IL-13 and increasing concentrations (x-axis) of mAb13.2 (•) or fully humanized mAb13.2 (h13.2v2; ◊) is presented as a percentage of the maximum number of monocytes that express cell surface CD23 after incubation with IL-13 alone (% Max. Response; y-axis).

[0078] FIG. 22: The ability of fully humanized mAb13.2 (h13.2v2) to neutralize nonhuman primate or sheep IL-13-mediated CD23 expression is comparable to the ability of mAb13.2 to do the same. The number of gated monocytes that express

cell surface CD23 after incubation with **(A)** recombinant nonhuman primate IL-13 (rec NHP IL-13) or **(B)** recombinant sheep IL-13 (rec Sheep IL-13) and increasing concentrations (x-axis) of mAb13.2 (•) or fully humanized mAb13.2 (h13.2v2; ♦) is presented as a percentage of the maximum number of monocytes that express cell surface CD23 after incubation with IL-13 alone (% Max. Response; y-axis).

[0079] FIG. 23: Fully humanized mAb13.2 (h13.2v2) reduces late-phase bronchoconstriction in sheep. The percent airway resistance (y-axis) as measured 24 hours prior to *Ascaris suum* challenge (baseline), during challenge (ascaris), and for several hours after challenge (x-axis) is shown for sheep that were untreated (control; ♦) or prophylactically treated with fully humanized mAb13.2 (h13.2v2;■) at a **(A)** 20 mg/kg or **(B)** 5 mg/kg dose. Data shown are mean ± s.d. for a sample size of three sheep per group.

[0080] FIG. 24: Fully humanized mAb13.2 (h13.2v2) prevents airway hyperreactivity in sheep. The percent dose of carbachol required to elicit a given magnitude of response (PC400; y-axis) is shown for sheep prophylactically treated with **(A)** 20 mg/kg or **(B)** 5 mg/kg fully humanized mAb13.2 (h13.2v2; ■) or sheep that remained untreated (control; ■) pre- and post-*Ascaris suum* challenge (x-axis). Data shown are mean ± s.d. for a sample size of three sheep per group.

[0081] FIG. 25: Fully humanized mAb13.2 (h13.2v2) prevents antigen-induced lung inflammation in nonhuman primates. The figure shows the total number of cells found in bronchoalveolar lavage (BAL) samples (y-axis) taken prior to challenge (0) or 24 hours post-challenge (24) with *Ascaris suum* antigen from control cynomolgus monkeys treated intravenously with saline (●), positive control cynomolgus monkeys treated intramuscularly with 2 mg/kg dexamethasone (∗), negative control cynomolgus monkeys pretreated with 8 mg/kg irrelevant human IgG (IVIG) (▲), or cynomolgus monkeys pretreated intravenously with fully humanized mAb13.2 (h13.2v2) (▼). A bar also depicts the mean number of cells found in BAL samples of each group. The p-values obtained using unpaired T-tests are also shown.

[0082] FIG. 26: Humanization of mAb13.2 may be based on sequence homology to other human germline genes in VH Group 3 of V-BASE. Shown is the

alignment of the amino acid sequence of mAb13.2 to human germline amino acid sequences within VH group 3 of the database, V-base. Bolded sequences are proposed as those to which humanization of mAb13.2 may be based.

[0083] FIG. 27: Comparison of the human DP-77 germline gene with the variable heavy (VH) chain amino acid sequences of a chimeric version of mAb13.2 and a fully humanized version of mAb13.2 (h13.2v3). The figure shows the complementarity determining regions (CDR) (boxed regions) and amino acid sequences of DP-77, the variable heavy region of a chimeric version of mAb13.2 (chimeric 13.2), and the variable heavy region of a fully humanized version of mAb13.2 (h13.2v3) as aligned and compared with SEQWEB™, wherein the amino acid substitutions made for the fully humanized version of mAb13.2 (h13.2v3) are indicated with shaded boxes and the residues left unchanged are underlined.

[0084] FIG. 28: Comparison of the human B1 germline gene with the variable light (VL) chain amino acid sequences of a chimeric version of mAb13.2 and a fully humanized version of mAb13.2 (h13.2v3). The figure shows the complementarity determining regions (CDR) (boxed regions) and amino acid sequences of B1, the variable light region of a chimeric version of mAb13.2 (chimeric 13.2), and the variable light region of a fully humanized version of mAb13.2 (h13.2v3) as aligned and compared with SEQWEB™, wherein the amino acid substitutions made for the fully humanized version of mAb13.2 (h13.2v3) are indicated with shaded boxes and the residues left unchanged are underlined.

[0085] FIG. 29: The number designation for each residue in the variable heavy chain amino acid sequence of monoclonal antibody mAb13.2 according to various schemes. Shown is the number designation for each residue in the amino acid sequence of the variable heavy region of mAb13.2 according to a linear sequence numbering scheme, the Chothia structure numbering scheme, and the Kabat sequence numbering scheme.

[0086] FIG. 30: The number designation for each residue in the variable light chain amino acid sequence of monoclonal antibody mAb13.2 according to various schemes. Shown is the number designation for each residue in the amino acid sequence of the variable light region of mAb13.2 according to a linear sequence numbering

scheme, the Chothia structure numbering scheme, and the Kabat sequence numbering scheme.

[0087] FIG. 31: Titers of Ascaris-specific IgE at 8 weeks post-Ascaris challenge decreased in cynomolgus monkeys treated with anti-human IL-13 antibody (h13.2v2). The graphs depict the relative titers of *Ascaris*-specific IgE in cynomolgus monkeys (y-axis) before and 8 weeks following challenge with *Ascaris suum* antigen. Pre-challenge values were normalized to "100." **(A)** Animals were treated intravenously with humanized anti-IL-13 antibody (h13.2v2). **(B)** Control animals were administered saline or irrelevant human IgG (IVIG) intravenously.

[0088] FIG. 32: Anti-IL-13 antibody (h13.2v2) prevented the increase in basophil sensitivity that follows *in vivo* allergen challenge. **(A)** Dose-dependent histamine release as a percentage of the maximum (y-axis) from blood of representative control and antibody-treated animals is depicted for animals before treatment and 24 hours and 8 weeks after Ascaris antigen challenge. **(B)** The total histamine release over the dose range shown in (a) was determined for each animal at each time point. The figure shows mean and standard error of normalized histamine release at each time point for the Control and anti-IL-13 - treated groups. Pre = pre-antibody treatment. Time 0 = 24 hr post-antibody, pre-*Ascaris* lung challenge. The 24 hour, 8 week and 4 month time points refer to time post-*Ascaris* challenge.

[0089] FIG. 33: Binding of biotinylated h13.2v2 to IL-13-loaded A375 cells. The histograms depict the number of A375 human melanoma cells (counts; y-axis) that demonstrated binding (fluorescence; x-axis) of biotinylated h13.2v2 (0.1 μg/ml, 1 μg/ml, or 10 μg/ml) following pre-incubation with 3 ng/ml human IL-13, as determined by flow cytometric analysis.

[0090] FIG. 34: The wild-type Fc revertant of h13.2v2 mediates ADCC in the presence of IL-13. **(A)** The percentage of Chromium-51 release (y-axis) of A375 human melanoma cells treated with the indicated concentration (x-axis) of h13.2v2 (L234A / G237A; •) or its wild-type Fc revertant (o) is shown. **(B)** The percentage of Chromimum-51 released (y-axis) is shown for IL-13 loaded A375 cells treated with the wild-type Fc revertant of h13.2v2 in the presence or absence of IL-13.

[0091] FIG. 35: The wild-type Fc revertant of h13.2v2 mediates ADCC of IL-13Rα2-expressing A375 cells, but not of IL-13Rα1-expressing HT-29 cells. **(A)** The percentage of Chromium-51 release (y-axis) of IL-13-loaded A375 human melanoma cells treated with the indicated concentration (x-axis) of h13.2v2 (L234A / G237A; ♦) or its wild-type Fc revertant (◊) is shown. **(B)** The percentage of Chromium-51 release (y-axis) of IL-13-loaded HT-29 human epithelial cells treated with the indicated concentration (x-axis) of h13.2v2 (L234A / G237A; ♦) or its wild-type Fc revertant (◊) is shown.

DETAILED DESCRIPTION

[0092] IL-13 binding agents, e.g., anti-IL13 antibodies and antigen-binding fragments thereof, pharmaceutical compositions thereof, nucleic acids encoding the aforesaid antibodies, as well as vectors and host cells containing the aforesaid nucleic acid sequences, are disclosed. Methods of producing the aforesaid antibodies, as well as methods for modulating one or more IL-13-associated activities using antibodies that bind to IL-13, e.g., human IL-13, and reduce or prevent it from binding to its receptor are also disclosed. Anti-IL-13 antibodies can be used to mitigate IL-13-mediated disorders, e.g., for treating respiratory disorders (e.g., asthma); atopic disorders (e.g., allergic rhinitis); inflammatory and/or autoimmune conditions of, the skin (e.g., atopic dermatitis), gastrointestinal organs (e.g., inflammatory bowel diseases (IBD)), as well as fibrotic and cancerous disorders. Anti-IL-13 antibodies can be used alone or in combination with other therapies used to treat the same or another disease, e.g., an allergic response.

[0093] It has been found, inter alia, that a reduction of IL-13 activity by using the antibodies described herein, which interfere with the formation of a functional IL-13 signaling complex, reduces airway inflammation in cynomolgus monkeys naturally allergic to Ascaris suum (Examples 1.4 and 3.5, below). In addition, the anti-human IL-13 antibodies described herein prevent late-phase bronchoconstriction in sheep naturally allergic to Ascaris suum, and prevent carbachol-induced airway hyperresponsiveness in sheep (Example 3.5, below). Accordingly, anti-IL-13

antibodies that neutralize one or more IL-13-associated activities may be used to reduce one or more IL-13-associated activities in vivo, e.g., to treat or prevent IL-13-mediated disorders (e.g., asthma, airway inflammation, eosinophilia, fibrosis, and excess mucus production).

[0094] Anti-Human IL-13 Antibodies

[0095] Antibodies that are capable of binding to, neutralizing and/or inhibiting one or more IL-13-associated activities, particularly the signaling activity of IL-13, are useful for treating IL-13-mediated diseases, such as allergic asthma, nonallergic asthma, and asthma-related pathologies, such as fibrosis, eosinophilia, and mucus production.

[0096] In one embodiment, the anti-IL13 antibodies disclosed herein are isolated or purified. An "isolated" or "purified" polypeptide or protein, e.g., an "isolated antibody," is purified to a state beyond that in which it exists in nature. For example, the "isolated" or "purified" polypeptide or protein, e.g., an "isolated antibody," refers to a protein that is separated from at least one component of cellular material or other contaminating proteins from the cell or tissue source from which the protein is derived, or separated from at least one component of the chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized. For example, an isolated protein can be substantially free of other proteins, other cellular material, or chemical precursors. In some embodiments, the preparation of antibody protein having less than about 50% of non-antibody protein (also referred to herein as a "contaminating protein"), or of chemical precursors, is considered to be "substantially free." In other embodiments, 40%, 30%, 20%, 10% and more preferably 5% (by dry weight), of non-antibody protein, or of chemical precursors is considered to be substantially free. When the antibody protein or biologically active portion thereof is recombinantly produced, it is also preferably substantially free of culture medium, e.g., the culture medium represents less than about 30%, 20%, more preferably less than about 10%, and most preferably less than about 5% of the volume or mass of the protein preparation. Proteins or polypeptides referred to herein as "recombinant" are proteins or polypeptides produced by the expression of recombinant nucleic acids. Proteins can be purified by standard methods (including, e.g., ion exchange and affinity

chromatography) to provide preparations in which a particular protein is at least 5, 10, 20, 25, 50, 75, 80, 90, 95, 98, 99% pure relative to other proteins or relative to other biologically active components.

[0097] The term "antibody" as used herein includes intact antibodies, 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 region (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). Exemplary antibodies bind specifically to IL-13, and may, for example, interfere with the formation of a functional IL-13 signaling complex, and/or neutralize or inhibit one or more IL-13-associated activities.

[0098] The antibodies described herein can be effectively human. An "effectively human" antibody is an antibody that includes a sufficient number of human amino acid positions such that the antibody does not elicit an immunogenic response in a normal human. Preferably, the protein 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 antibodies are desired to be 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)).

[0100] Conservative substitutions typically include the substitution of one amino acid for another with similar characteristics, e.g., substitutions within the following groups: valine, glycine; glycine, alanine; valine, isoleucine, leucine; aspartic acid, glutamic acid; asparagine, glutamine; serine, threonine; lysine, arginine; and phenylalanine, tyrosine

[0101] Antibodies, also known as immunoglobulins, are typically tetrameric glycosylated proteins composed of two light (L) chains of approximately 25 kDa each and two heavy (H) chains of approximately 50 kDa each. Two types of light chain, termed lambda and kappa, may be found in antibodies. Depending on the amino acid

sequence of the constant domain of heavy chains, immunoglobulins can be assigned to five major classes: A, D, E, G, and M, and several of these may be further divided into subclasses (isotypes), e.g., IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1, and IgA_2. Each light chain includes an N-terminal variable (V) domain (VL) and a constant (C) domain (CL). Each heavy chain includes an N-terminal V domain (VH), three or four C domains (CHs), and a hinge region. The CH domain most proximal to VH is designated as CH1. The VH and VL domains consist of four regions of relatively conserved sequences called framework regions (FR1, FR2, FR3, and FR4), which form a scaffold for three regions of hypervariable sequences (complementarity determining regions, CDRs). The CDRs contain most of the residues responsible for specific interactions of the antibody with the antigen. CDRs are referred to as CDR1, CDR2, and CDR3. Accordingly, CDR constituents on the heavy chain are referred to as H1, H2, and H3, while CDR constituents on the light chain are referred to as L1, L2, and L3. CDR3 is typically the greatest source of molecular diversity within the antibody-binding site. H3, for example, can be as short as two amino acid residues or greater than 26 amino acids. The subunit structures and three-dimensional configurations of different classes of immunoglobulins are well known in the art. For a review of the antibody structure, see Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow et al., 1988. One of skill in the art will recognize that each subunit structure, e.g., a CH, VH, CL, VL, CDR, FR structure, comprises active fragments, e.g., the portion of the VH, VL, or CDR subunit the binds to the antigen, i.e., the antigen-binding fragment, or, e.g., the portion of the CH subunit that binds to and/or activates, e.g., an Fc receptor and/or complement. The CDRs typically refer to the Kabat CDRs, as described in Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services (1991), eds. Kabat et al. Another standard for characterizing the antigen binding site is to refer to the hypervariable loops as described by Chothia. See, e.g., Chothia, D. et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227:799-817; and Tomlinson et al. (1995) *EMBO J.* 14:4628-4638. Still another standard is 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). Embodiments described with respect to Kabat CDRs can alternatively be implemented

using similar described relationships with respect to Chothia hypervariable loops or to the AbM-defined loops.

[0102] Examples of binding fragments encompassed within the term "antigen-binding fragment" of an antibody 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 (Ward et al. (1989) *Nature* 341:544-46), which consists of a VH domain; and (vi) an isolated complementarity determining region (CDR). Camelid antibodies, and camelized antibodies can also be used. Such antibodies, e.g., can include CDRs from just one of the variable domains described herein. Furthermore, although the two domains of the Fv fragment, VL and VH, are coded for by separate genes, they can be joined, using recombinant methods, by a synthetic linker that enables them to be made as a single protein chain in which the VL and VH regions pair to form monovalent molecules (known as single chain Fv (scFv); see, e.g., Bird et al. (1988) *Science* 242:423-26; Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:5879-83). Such single chain antibodies are also intended to be encompassed within the term "antigen-binding fragment" of an antibody. These antibody fragments are obtained using conventional techniques known to those skilled in the art, and the fragments are evaluated for function in the same manner as are intact antibodies.

[0103] Antibody diversity, in a natural system, is created by the use of multiple germline genes encoding variable regions and a variety of somatic events. The somatic events include recombination of variable gene segments with diversity (D) and joining (J) gene segments to make a complete VH region, and the recombination of variable and joining gene segments to make a complete VL region. The recombination process itself can be imprecise, resulting in the loss or addition of amino acids at the V(D)J junctions. These mechanisms of diversity occur in the developing B cell prior to antigen exposure. After antigenic stimulation, the expressed antibody genes in B cells undergo somatic mutation. Based on the estimated number of germline gene segments, the random recombination of these segments, and random VH-VL pairing, up to 1.6×10^7 different antibodies could be produced (Fundamental Immunology, 3rd ed.

(1993), ed. Paul, Raven Press, New York, NY). When other processes that contribute to antibody diversity (such as somatic mutation) are taken into account, it is thought that upwards of 10^{10} different antibodies could be generated (Immunoglobulin Genes, 2nd ed. (1995), eds. Jonio et al., Academic Press, San Diego, CA). Because of the many processes involved in generating antibody diversity, it is unlikely that independently derived monoclonal antibodies with the same antigen specificity will have identical amino acid sequences.

[0104] Thus, this disclosure provides, inter alia, antibodies, and antigen-binding fragments thereof, that bind to IL-13 and, e.g., interfere with the formation of a functional IL-13 signaling complex. The antigen-binding fragments described herein, e.g., structures containing a CDR, will generally be an antibody heavy or light chain sequence, or an active fragment thereof, in which the CDR is placed at a location corresponding to the CDR of naturally occurring VH and VL. The structures and locations of immunoglobulin variable domains may be determined as described in Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services (1991), eds. Kabat et al.

[0105] Antibody molecules (including antigen-binding fragments) disclosed herein, i.e., antibody molecules that bind to IL-13 and interfere with the formation of a functional IL-13 signaling complex, include, but are not limited to, murine monoclonal antibody, mAb13.2, and its variants, specifically the chimeric variant ch13.2, the partially humanized variant h13.2v1, and the fully humanized variants h13.2v2 and h13.2v3. These antibody molecules may be useful in preventing or treating asthma (both allergic and nonallergic), as well as asthma-related pathologies. The amino acid sequences of the light chain variable regions of mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, and h13.2v3 are set forth in SEQ ID NOs:9, 10, 11, 12, and 35, respectively. The amino acid sequences of the heavy chain variable regions of mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, and h13.2v3 are set forth in SEQ ID NOs:13, 14, 15, 16, and 36, respectively. The amino acid sequences of the three complementarity determining regions (CDRs) in the variable light chains of mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, and h13.2v3 are set forth in SEQ ID NOs:19, 20, and 21. The amino acid sequences of the three CDRs in the variable heavy chains of mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, and h13.2v3 are set forth in SEQ ID NOs:22, 23, and 24.

[0106] As described above, the CDRs contain most of the residues responsible for specific interactions with the antigen, and are contained within the VH and VL domains, i.e., the heavy chain variable region and the light chain variable region, respectively. Exemplary antibodies include at least one CDR comprising an amino acid sequence selected from the amino acid sequences set forth in SEQ ID NOs:19-24, or selected residues, particularly IL-13 contact residues from such CDRs. Such antibodies may also bind to IL-13 and, e.g., interfere with the formation of a functional IL-13 signaling complex. The amino acid sequences of the active fragments of the CDRs, i.e., the minimum core CDR sequences, described herein are set forth in SEQ ID NOs:25-30, and are disclosed in Table 1. An antibody may include one or more CDRs of the VL chain as set forth in SEQ ID NOs:19-21 or SEQ ID NOs: 25-27. An antibody may include one or more CDRs of the VH chain as set forth in SEQ ID NOs:22-24 or SEQ ID NOs: 28-30. Additionally, an antibody may include one or more of the CDRs of the VL and VH chain has an amino acid sequence selected from the amino acid sequences set forth in SEQ ID NOs:19-30. As shown, X can be any amino acid, e.g., a non-cysteine amino acid, or an amino acid that is has a similar charge, hydrophobicity, and/or side chain length, as the amino acid at the corresponding position in the left hand column of Table 1.

Table 1. Exemplary CDRs

CDR sequence	Minimum core CDR sequence
Light chain CDR1 (L1) SEQ ID NO:19 24-KASESVDNYGKSLMH-38[1]	SEQ ID NO:25 24-xxxxxxx**NY**x**K**xxxx-38
Light chain CDR2 (L2) SEQ ID NO:20 54-RASNLES-60	SEQ ID NO:26 54-**R**xxxxxx-60
Light chain CDR3 (L3) SEQ ID NO:21 93-QQSNEDPWT-101	SEQ ID NO:27 93-xxx**N**x**D**x**W**x-101
Heavy chain CDR1 (H1) SEQ ID NO:22 30-ISYAMS-35[2]	SEQ ID NO:28 30-**IS**x**A**xx-35
Heavy chain CDR2 (H2) SEQ ID NO:23 50-SISSGGNTYYPDSVKG-65	SEQ ID NO:29 50-**S**x**S**S**Y**xxxxxx-65
Heavy chain CDR3 (H3) SEQ ID NO:24 98-LDGYYFGFAY-107	SEQ ID NO:30 98-**LDGYYF**xxxx-107

[1] Numbering for VL CDRs is according to a linear sequence numbering scheme as in FIG. 30.

[2] Numbering for VH CDRs is according to a linear sequence numbering scheme as in FIG. 29.

[0107] Also described above, an antigen-binding fragment may be an Fv fragment, which includes VH and VL domains. Thus, an Fv fragment of mAb13.3, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2 or h13.2v3 may constitute an antibody described herein. It may bind to IL-13 and interfere with the formation of a functional IL-13 signaling complex. Other fragments include the Fv fragment, e.g., scFv fragments, Fab fragments, and F(ab')2 fragments of the mAb13.3, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, or h13.2v3 antibodies or of an antibody that includes one or more CDRs having an amino acid sequence selected from the amino acid sequences set forth in SEQ ID NOs: 19-30.

[0108] Such antibody molecules may be produced by methods known to those skilled in the art. For example, monoclonal antibodies may be produced by generation of hybridomas in accordance with known methods. Hybridomas formed in this manner are then screened using standard methods, such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and surface plasmon resonance (Biacore™) analysis, to identify one or more hybridomas that produce an antibody that specifically binds with IL-13, interferes with the formation of a functional IL-13 signaling complex, and neutralizes one or more IL-13-associated activities. Recombinant IL-13, naturally occurring IL-13 (i.e., the processed mature form of IL-13), any variants thereof, and antigenic peptide fragments of IL-13 may be used as the immunogen.

[0109] An antigenic peptide fragment of IL-13 can comprise at least 7 continuous amino acid residues and encompasses an epitope such that an antibody raised against the peptide forms a specific immune complex with IL-13. Preferably, the antigenic peptide comprises at least 10 amino acid residues, more preferably at least 15 amino acid residues, even more preferably at least 20 amino acid residues, and most preferably at least 30 amino acid residues. Additionally, it is preferable that the antigenic peptide fragment of IL-13 comprises the IL-13 receptor-binding site or IL-4 receptor binding site.

[0110] As an alternative to preparing monoclonal antibody-secreting hybridomas, a monoclonal antibody may be identified and isolated by screening a recombinant combinatorial immunoglobulin library (e.g., an antibody phage display

library) with IL-13, including variants and/or portions thereof, to thereby isolate immunoglobulin library members that bind to IL-13. Techniques and commercially available kits for generating and screening phage display libraries are known to those skilled in the art. Additionally, examples of methods and reagents particularly amenable for use in generating and screening antibody display include those described in US 5,658,727, US 5,667,988, and US 5,885,793.

[0111] Polyclonal sera and antibodies described herein may be produced by immunizing a suitable subject with IL-13, its variants and/or portions thereof. The antibody titer in the immunized subject may be monitored over time by standard techniques, such as an Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), using immobilized IL-13 or other marker proteins (e.g., FLAG). Antibodies may be isolated from an animal or culture media. A variety of methods can be used to purify antibodies including well-known techniques, such as use of protein A chromatography to obtain an IgG fraction.

[0112] Certain embodiments comprise the VH and/or VL domain of the Fv fragment of mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2 or h13.2v3. Fragments of antibodies e.g., Fab, F(ab')2, Fd, and dAb fragments, may be produced by cleavage of the antibodies or by recombinant engineering. For example, immunologically active Fab and F(ab')2 fragments may be generated by treating the antibodies with an enzyme such as pepsin.

[0113] Further embodiments comprise one or more complementarity determining regions (CDRs) of any of these VH and VL domains, as set forth in SEQ ID NOs:19-30. One embodiment comprises an H3 fragment of the VH domain of mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, or h13.2v3.

[0114] The VH and VL domains described herein, in certain embodiments, can be germlined, i.e., the framework regions (FRs) of these domains may be changed using conventional molecular biology techniques to match human germline genes or the consensus amino acid sequences of human germline gene products, at one or more positions (e.g., at at least 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, or 99% of framework positions). In other embodiments, the framework sequences remain diverged from the germline.

[0115] Human germline sequences, for example, are disclosed in Tomlinson, I.A. 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.

[0116] Additionally, chimeric, humanized, and single-chain antibodies described herein, comprising both human and nonhuman portions, may be produced using standard recombinant DNA techniques, as described in more detail in the Examples. Humanized antibodies may also be produced 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.

[0117] Additionally, the antibodies 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 and light chains. 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:17. 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 antibody antigen-binding domain specific for domain of IL-13 that aids formation of a functional IL-13 signaling complex.

[0118] Exemplary antibodies can include sequences of VL chains as set forth in SEQ ID NOs:9, 10, 11, 12, or 35, and/or of VH chains as set forth in and SEQ ID NOs: 13, 14, 15, 16, or 36, but also can include variants of these sequences that retain antigen-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. While changes in the framework regions are usually designed to improve stability and reduce immunogenicity of the antibody, changes in the CDRs are usually designed to increase affinity of the antibody for its target. Such affinity-increasing changes are typically determined empirically by altering the CDR region and testing the antibody. Such alterations can be made according to the methods described in Antibody Engineering, 2nd. ed. (1995), ed. Borrebaeck, Oxford University Press.

[0119] An exemplary method for making a VH domain, which is an amino acid sequence variant of a VH domain set out herein, comprises a step of adding, deleting, substituting or inserting one or more amino acids in the amino acid sequence of the presently disclosed VH domain, optionally combining the VH domain thus provided with one or more VL domains, and testing the VH domain or VH/VL combination or combinations 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. The VL domain may have an amino acid sequence that is substantially as set out herein. An analogous method may be employed in which one or more sequence variants of a VL domain disclosed herein are combined with one or more VH domains.

[0120] A further aspect of the invention provides a method of preparing an antigen-binding fragment that specifically binds to IL-13. The method comprises: (a) providing a starting repertoire of nucleic acids encoding a VH domain that either includes a CDR3 to be replaced or lacks a CDR3 encoding region; (b) combining the repertoire with a donor nucleic acid encoding a donor CDR comprising an active fragment of SEQ ID NO:24, e.g., a donor nucleic acid encoding the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:30, such that the donor nucleic acid is inserted into the CDR3 region in the repertoire so as to provide a product repertoire of nucleic acids encoding a VH domain; (c) expressing the nucleic acids of the product repertoire; (d) selecting a specific antibody or antigen-binding fragment specific for IL-13; and (e) recovering the specific antibody or antigen-binding fragment or nucleic acid encoding it.

[0121] In another embodiment, an analogous method may be employed in which a VL CDR3 (i.e., L3) described herein is combined with a repertoire of nucleic acids encoding a VL domain, which either includes a CDR3 to be replaced or lacks a CDR3-encoding region. A coding sequence of a CDR described herein (e.g., CDR3) may be introduced into a repertoire of variable domains lacking a CDR (e.g., CDR3), using recombinant DNA technology. For example, Marks et al. (*Bio/Technology* (1992) 10:779-83) describes 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. Using analogous techniques, 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. U.S.A.* (1992) 89:3576-80.

[0122] 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. U.S.A.* (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.

[0123] In one embodiment, a binding protein that binds to a target is modified, e.g., by mutagenesis, to provide a pool of modified binding proteins. The modified binding proteins are then evaluated to identify one or more altered binding proteins 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 proteins. Higher affinity binding proteins 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.

[0124] In some embodiments, the mutagenesis is targeted to regions known or likely to be at the binding interface. If, for example, the identified binding proteins are antibodies, 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.

[0125] 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.

[0126] 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 region 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.

[0127] 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. In other implementations more than one or two germline sequences are used, e.g., to form a consensus sequence.

[0128] In one embodiment, an antibody or fragment thereof has CDR sequences that differ only insubstantially from those of the antibodies described herein. 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 would be 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).

[0129] The IL-13 binding proteins can be in the form of intact antibodies, 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 region (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).

[0130] In some embodiments, a substantial portion of an immunoglobulin variable domain can comprise at least one of the CDR regions and, optionally, their intervening framework regions from the variable regions as set out herein. The portion will also include at least about 50, 60, 70, 80, 85, 87, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98% of either or both of FR1 and FR4. For example, the portion which may be contiguous or non-contiguous may include the C-terminal 50% of FR1 and the N-terminal 50% of FR4. Additional residues at the N-terminal or C-terminal end of the substantial part of the variable domain may be those not normally associated with naturally occurring variable domain regions. For example, construction of specific antigen-binding fragments made by recombinant DNA techniques may result in the introduction of N- or C-terminal residues encoded by linkers introduced to facilitate cloning or other manipulation steps. Other manipulation steps include the introduction of linkers to join variable domains described herein to further protein sequences, including immunoglobulin heavy chains, other variable domains (e.g., in the production of diabodies) or protein labels as discussed in more detail below.

[0131] Although the embodiments illustrated in the Examples comprise a "matching" pair of VH and VL domains, the invention also encompasses binding fragments containing a single variable domain derived from either VH or VL domain sequences, especially VH domains. In the case of either of the single-chain specific binding domains, these domains may be used to screen for complementary domains capable of forming a two-domain specific antigen-binding domain capable of binding IL-13. This may be achieved by phage display screening methods using the so-called hierarchical dual combinatorial approach (as disclosed in, e.g., WO 92/01047) in which an individual colony containing either an H or L chain clone is used to infect a complete library of clones encoding the other chain (L or H) and the resulting two-chain specific antigen-binding domain is selected in accordance with phage display

techniques such as those described in that reference. This technique is also disclosed in Marks et al., *supra*. Antibodies can be conjugated by chemical methods with radionuclides, drugs, macromolecules, or other agents, or can be made as fusion proteins comprising one or more CDRs described herein.

[0132] An antibody fusion protein contains a VH-VL pair where one of these chains (usually VH) and another protein are synthesized as a single polypeptide chain. These types of products differ from antibodies in that they generally have an additional functional element: e.g., the active moiety of a small molecule or the principal molecular structural feature of the conjugated or fused macromolecule.

[0133] In addition to the changes to the amino acid sequence outlined above, the antibodies can be glycosylated, pegylated, or linked to albumin or a nonproteinaceous polymer. For instance, the presently disclosed antibodies may be linked to one of a variety of nonproteinaceous polymers, e.g., polyethylene glycol, polypropylene glycol, or polyoxyalkylenes, in the manner set forth in U.S. Patent Nos. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192; or 4,179,337. The antibodies are chemically modified by covalent conjugation to a polymer to increase their circulating half-life, for example. Exemplary polymers, and methods to attach them to peptides, are also shown in U.S. Patent Nos. 4,766,106; 4,179,337; 4,495,285; and 4,609,546.

[0134] In other embodiments, the antibody may be modified to have an altered glycosylation pattern (e.g., 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.

[0135] Antibodies described herein may also be tagged with a detectable or functional label. Detectable labels include radiolabels such as ^{131}I or ^{99}Tc, which may be attached to antibodies described herein using conventional chemistry known in the art. Labels also include enzyme labels such as horseradish peroxidase or alkaline phosphatase. Labels further include chemical moieties such as biotin, which may be detected via binding to a specific cognate detectable moiety, e.g., labeled avidin.

[0136] The binding characteristics of an antibody disclosed herein may be measured by any suitable methods, including the following methods: Biacore analysis, Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), x-ray crystallography, sequence analysis and scanning mutagenesis as described in the Examples below, and other methods that are well known in the art. The ability of an antibody described herein 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 measuring the activity of downstream signaling molecules, e.g., STAT6; assays testing the efficiency of an antibody described herein to prevent asthma in a relevant animal model, e.g., the cynomolgus monkey; as described in the Examples below, and other assays that are well known in the art.

[0137] The binding interaction of a protein of interest and a target (e.g., IL-13) can be analyzed using 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 optical phenomenon of surface plasmon resonance (SPR)). The changes in the refractivity generate a detectable signal, which are measured as an indication of real-time reactions between biological molecules. 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).

[0138] Information from SPR can be used to provide an accurate and quantitative measure of the equilibrium dissociation constant (Kd), and kinetic parameters, including Kon and Koff, for the binding of a biomolecule to a target. Such data can be used to compare different biomolecules. For example, proteins encoded by nucleic acid selected from a library of diversity strands can be compared to identify individuals that have high affinity for the target or that have a slow Koff. This information can also be used to develop structure-activity relationships (SAR). For example, the kinetic and equilibrium binding parameters of matured versions of a parent protein can be compared to the parameters of the parent protein. Variant amino acids at given positions can be identified that correlate with particular binding parameters, e.g., high affinity and slow Koff. 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 formulated and used to guide other design processes.

[0139] In a further aspect, this disclosure provides a method of selecting antibodies capable of binding IL-13 and neutralizing and/or inhibiting one or more IL-13-associated activities. The method comprises: a) contracting a plurality of antibodies or antigen binding fragments with IL-13; b) choosing antibodies or antigen binding fragments that bind to IL-13; c) testing the ability of chosen antibodies or antigen binding fragments to prevent IL-13 from binding to the IL-13 receptor; and d) selecting one or more antibodies or antigen binding fragments capable of preventing IL-13 from binding to its receptor. One or more antibodies can be further modified if desired. One or more such antibodies can be formulated, e.g., as a pharmaceutical composition.

[0140] The anti-IL-13 antibodies disclosed herein are also useful for isolating, purifying, and/or detecting IL-13 in supernatant, cellular lysate, or on the cell surface.

Antibodies disclosed herein can be used diagnostically to monitor IL-13 protein levels as part of a clinical testing procedure. Additionally, antibodies disclosed herein can be used in treatments requiring the neutralization and/or inhibition of one or more IL-13-associated activities, e.g. allergic or nonallergic asthma, and related pathologies. The present disclosure also provides novel isolated and purified polynucleotides and polypeptides related to novel antibodies directed against human IL-13. The genes, polynucleotides, proteins, and polypeptides disclosed herein include, but are not limited to, a murine antibody to IL-13 (mAb13.2) and variants thereof.

[0141] Anti-IL-13 Antibody Polynucleotides and Polypeptides

[0142] For example, the disclosure provides purified and isolated polynucleotides encoding the variable region of a murine antibody to IL-13 that modulates one or more IL-13-associated activities (e.g., neutralizes IL-13 bioactivity) (mAb13.2), a chimeric version of mAb13.2 (ch13.2), a partially humanized version of mAb13.2 (h13.2v1) and two fully humanized versions of mAb13.2 (h13.2v2 and h13.2v3).

[0143] The nucleotide sequences can include those that encode the light chain variable regions of mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, and h13.2v3 and are set forth in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, and SEQ ID NO:33, respectively. The nucleotide sequences can also include those that encode the heavy chain variable regions of mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, and h13.3v3 and are set forth in SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, and SEQ ID NO:34, respectively. The polynucleotides can also include polynucleotides that hybridize under stringent conditions to any of the sequences set forth in SEQ ID NOs:1-8, 33, and 34, or complements thereof, and/or that encode polypeptides that retain substantial biological activity (i.e., active fragments) of the variable regions encoded by these sequences. The polynucleotides can also include continuous portions of the any of the sequences set forth in SEQ ID NOs:1-8, 33, and 34, comprising at least 21 consecutive nucleotides. Table 2 summarizes the SEQ ID NOs for the nucleotide sequences of several exemplary polynucleotides.

Table 2: Sequence Identification Numbers (SEQ ID NOs) of Polynucleotides of the Invention

	mAB13.2	ch13.2	h13.2v1	h13.2v2	h13.2v3
VL region	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:33
VH region	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:34

[0144] The amino acid sequences of the light chain variable regions of mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, and h13.2v3 are set forth in SEQ ID NOs:9, 10, 11, 12, and 35, respectively. The amino acid sequences of the heavy chain variable regions of mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, and h13.2v3 are set forth in SEQ ID NOs:13, 14, 15, 16, and 36, respectively. Polypeptides disclosed herein also include continuous portions of any of the sequences set forth in SEQ ID NOs:9-16, 35, and 36 comprising at least 4 consecutive amino acids and that retain substantial biological activity (i.e., active fragments) of these variable regions. Preferably, polypeptides of the present application include continuous portions of any of the sequences set forth in SEQ ID NOs:9-16, 35, and 36 comprising 5-7 amino acids. More preferred polypeptides of the present application include any continuous portion of the any of sequences set forth in SEQ ID NOs:9 and 13, SEQ ID NOs:10 and 14, SEQ ID NOs:11 and 15, SEQ ID NOs:12 and 16, and SEQ ID NOs:35 and 36 that retains substantial biological activity of mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, and h13.2v3, respectively. Polynucleotides disclosed herein also include, in addition to those polynucleotides described above, polynucleotides that encode any of the amino acid sequences set forth in SEQ ID NOs:9-16, 35 and 36, or a continuous portion thereof, and that differ from the polynucleotides described above only due to the well-known degeneracy of the genetic code. Table 3 summarizes the SEQ ID NOs for the amino acid sequences of several of the polypeptides disclosed herein. For example, Table 3 summarizes the SEQ ID NOs for the amino acid sequences for variable light chains (VL), variable heavy chains (VH), constant heavy chains (CH), constant light chains (CL), CDR1s of the variable light chains (L1), CDR2s of the variable light chains (L2), CDR3s of the variable light chains (L3), CDR1s of the variable heavy chains (H1), CDR2s of the variable heavy chains (H2), and CDR3s of the variable heavy chains (H3) of the antibodies mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2 and h13.2v3.

Table 3: Sequence ID Numbers (SEQ ID NOs) of exemplary polypeptides

	mAb13.2	ch13.2	h13.2v1	h13.2v2	h13.2v3
VL	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:35
VH	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:36
CH		SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:17
CL		SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:18
L1	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:19
L2	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:20
L3	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:21
H1	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:22
H2	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:23
H3	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:24

[0145] The isolated polynucleotides disclosed herein may be used as hybridization probes and primers to identify and isolate nucleic acids having sequences identical to or similar to those encoding the disclosed polynucleotides. Hybridization methods for identifying and isolating nucleic acids include polymerase chain reaction (PCR), Southern hybridization, *in situ* hybridization and Northern hybridization, and are well known to those skilled in the art.

[0146] Hybridization reactions can be performed under conditions of different stringency. The stringency of a hybridization reaction includes the difficulty with which any two nucleic acid molecules will hybridize to one another. Preferably, each hybridizing polynucleotide hybridizes to its corresponding polynucleotide under reduced stringency conditions, more preferably stringent conditions, and most preferably highly stringent conditions. Examples of stringency conditions are shown in Table 4 below: highly stringent conditions are those that are at least as stringent as, for example, conditions A-F; stringent conditions are at least as stringent as, for example, conditions G-L; and reduced stringency conditions are at least as stringent as, for example, conditions M-R.

TABLE 4

Stringency Condition	Poly-nucleotide Hybrid	Hybrid Length (bp)[1]	Hybridization Temperature and Buffer[2]	Wash Temperature and Buffer[2]

A	DNA:DNA	> 50	65°C; 1X SSC -or- 42°C; 1X SSC, 50% formamide	65°C; 0.3X SSC
B	DNA:DNA	<50	T_B*; 1X SSC	T_B*; 1X SSC
C	DNA:RNA	> 50	67°C; 1X SSC -or- 45°C; 1X SSC, 50% formamide	67°C; 0.3X SSC
D	DNA:RNA	<50	T_D*; 1X SSC	T_D*; 1X SSC
E	RNA:RNA	>50	70°C; 1X SSC -or- 50°C; 1X SSC, 50% formamide	70°C; 0.3X SSC
F	RNA:RNA	<50	T_F*; 1X SSC	T_F*; 1X SSC
G	DNA:DNA	>50	65°C; 4X SSC -or- 42°C; 4X SSC, 50% formamide	65°C; 1X SSC
H	DNA:DNA	<50	T_H*; 4X SSC	T_H*; 4X SSC
I	DNA:RNA	>50	67°C; 4X SSC -or- 45°C; 4X SSC, 50% formamide	67°C; 1X SSC
J	DNA:RNA	<50	T_J*; 4X SSC	T_J*; 4X SSC
K	RNA:RNA	>50	70°C; 4X SSC -or- 50°C; 4X SSC, 50% formamide	67°C; 1X SSC
L	RNA:RNA	<50	T_L*; 2X SSC	T_L*; 2X SSC
M	DNA:DNA	>50	50°C; 4X SSC -or- 40°C; 6X SSC, 50% formamide	50°C; 2X SSC
N	DNA:DNA	<50	T_N*; 6X SSC	T_N*; 6X SSC
O	DNA:RNA	>50	55°C; 4X SSC -or- 42°C; 6X SSC, 50% formamide	55°C; 2X SSC
P	DNA:RNA	<50	T_P*; 6X SSC	T_P*; 6X SSC
Q	RNA:RNA	>50	60°C; 4X SSC -or- 45°C; 6X SSC, 50% formamide	60°C; 2X SSC
R	RNA:RNA	<50	T_R*; 4X SSC	T_R*; 4X SSC

[1]The hybrid length is that anticipated for the hybridized region(s) of the hybridizing polynucleotides. When hybridizing a polynucleotide to a target polynucleotide of unknown sequence, the hybrid length is assumed to be that of the hybridizing polynucleotide. When polynucleotides of known sequence are hybridized, the hybrid length can be determined by aligning the sequences of the polynucleotides and identifying the region or regions of optimal sequence complementarity.

[2]SSPE (1xSSPE is 0.15 M NaCl, 10 mM NaH_2PO_4, and 1.25 mM EDTA, pH 7.4) can be substituted for SSC (1xSSC is 0.15 M NaCl and 15 mM sodium citrate) in the hybridization and wash buffers; washes are performed for 15 min after hybridization is complete.

T_B* - T_R*: The hybridization temperature for hybrids anticipated to be less than 50 base pairs in length should be 5-10°C less than the melting temperature (T_m) of the hybrid, where T_m is determined according to the following equations. For hybrids less than 18 base pairs in length, T_m(°C) = 2(# of A + T bases) + 4(# of G + C bases). For hybrids between 18 and 49 base pairs in length, T_m(°C) = 81.5 + 16.6($\log_{10}Na^+$) + 0.41(%G + C) - (600/N), where N is the number of bases in the hybrid, and Na^+ is the concentration of sodium ions in the hybridization buffer (Na^+ for 1X SSC = 0.165 M).

Additional examples of stringency conditions for polynucleotide hybridization are provided in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Chs. 9 & 11, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989), and Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Sects. 2.10 & 6.3-6.4, John Wiley & Sons, Inc. (1995), herein incorporated by reference.

[0147] The isolated polynucleotides disclosed herein may be used as hybridization probes and primers to identify and isolate DNA having sequences encoding allelic variants of the disclosed polynucleotides. Allelic variants are naturally occurring alternative forms of the disclosed polynucleotides that encode polypeptides that are identical to or have significant similarity to the polypeptides encoded by the disclosed polynucleotides. Preferably, allelic variants have at least 90% sequence identity (more preferably, at least 95% identity; most preferably, at least 99% identity) with the disclosed polynucleotides.

[0148] The isolated polynucleotides disclosed herein may also be used as hybridization probes and primers to identify and isolate DNAs having sequences encoding polypeptides homologous to the disclosed polynucleotides. These homologs are polynucleotides and polypeptides isolated from a different species than that of the disclosed polypeptides and polynucleotides, or within the same species, but with significant sequence similarity to the disclosed polynucleotides and polypeptides. Preferably, polynucleotide homologs have at least 50%, 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99%,, sequence with the disclosed polynucleotides

[0149] The isolated polynucleotides disclosed herein may also be used as hybridization probes and primers to identify cells and tissues that express the antibodies and the conditions under which they are expressed.

[0150] The isolated polynucleotides disclosed herein may be operably linked to an expression control sequence for recombinant production of the polypeptides described herein. A polynucleotide can be operably linked to a nucleotide sequence encoding a constant region, e.g., a constant region of one of the various antibody isotypes. For example, a polynucleotide that encodes a light chain variable region disclosed herein (e.g., any one of those set forth in SEQ ID NOs:1-4, and 33) may be operably linked to a nucleotide sequence that encodes the constant region (or derivatives thereof) of either a kappa light chain (e.g., as set forth in SEQ ID NO:18) or lambda light chain, such that the expression of the linked nucleotides will result in a full kappa or lambda light chain with a variable region that specifically binds to IL-13, interferes with the formation of a functional IL-13 signaling complex, and neutralizes

one or more IL-13-associated activities. Similarly, a polynucleotide that encodes a heavy chain variable region disclosed herein (e.g., any of those set forth in SEQ ID NOs:5-8, and 34) may be operably linked to a nucleotide sequence that encodes the constant region of a heavy chain isotype (or derivatives thereof), e.g., IgM, IgD, IgE, IgG and IgA. General methods of expressing recombinant proteins are well known in the art. Such recombinant proteins may be expressed in soluble form for use in treatment of disorders resulting from IL-13-mediated signaling (e.g., allergic and nonallergic asthma).

[0151] The recombinant expression vectors disclosed herein 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. Patent Nos. 4,399,216, 4,634,665 and 5,179,017). For example, typically the selectable marker gene confers resistance to a drug, such as G418, hygromycin or methotrexate, on a host cell into which the vector has been introduced. Preferred selectable marker genes include the dihydrofolate reductase (DHFR) gene (for use in dhfr$^-$ host cells with methotrexate selection/amplification) and the *neo* gene (for G418 selection).

[0152] A number of cell lines are suitable host cells for recombinant expression. Mammalian host cell lines include, for example, COS cells, CHO cells, 293T cells, A431 cells, 3T3 cells, CV-1 cells, HeLa cells, L cells, BHK21 cells, HL-60 cells, U937 cells, HaK cells, Jurkat cells, as well as cell strains derived from *in vitro* culture of primary tissue and primary explants.

[0153] Alternatively, it may be possible to recombinantly produce polypeptides in lower eukaryotes such as yeast (e.g., *Saccharomyces, Pichia, Kluyveromyces* strains, and *Candida* strains) or in prokaryotes (e.g., *Escherichia coli, Bacillus subtilis*, and *Salmonella typhimurium*). Polypeptides made in yeast or bacteria can be modified, e.g., glycosylation of appropriate sites

[0154] Polypeptides can also be produced in animal cells, e.g., insect or mammalian cells. For example, a sequence encoding the polypeptide can be inserted

into an insect expression vector, such as a baculovirus vector, and used in an insect cell expression system (e.g., the MAXBAC® kit, Invitrogen, Carlsbad, CA).

[0155] The polypeptides disclosed herein may then be purified from culture medium or cell extracts using known purification processes, such as gel filtration and ion exchange chromatography. Purification may also include affinity chromatography with agents known to bind the polypeptides disclosed herein.

[0156] Alternatively, the polypeptides disclosed herein may also be recombinantly expressed in a form that facilitates purification. For example, the polypeptides may be expressed as fusions with proteins such as maltose-binding protein (MBP), glutathione-*S*-transferase (GST), or thioredoxin (TRX) or as fusions to hexa-histidine, penta-histidine, or small epitope tags, e.g., the FLAG epitope.

[0157] The polypeptides disclosed herein also encompass molecules that are structurally different from the disclosed polypeptides (e.g., which have a slightly altered sequence), but which have substantially the same biochemical properties as the disclosed polypeptides (e.g., are changed only in functionally nonessential amino acid residues). Such molecules include naturally occurring allelic variants and deliberately engineered variants containing alterations, substitutions, replacements, insertions, or deletions. Techniques for such alterations, substitutions, replacements, insertions, or deletions are well known to those skilled in the art.

[0158] IL-13 Binding agents

[0159] 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 mAb13.2 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 mAb13.2 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-4Rα, and, e.g., does not prevent binding of IL-13 to IL-13Rα1. 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.

[0160] 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. 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 mAb13.2 on IL-13, binding agents can be eluted by adding mAb13.2 (or related antibody), or binding agents can be evaluated in competition experiments with mAb13.2 (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 mAb13.2 (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 mAb13.2. It is also possible to use peptides from IL-13 that contain the mAb13.2 epitope as a target.

[0161] Phage display is described, for example, in 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; 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; 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. 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.

[0162] 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 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, The EMBO Journal 13, pp. 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 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 (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 is used as a scaffold

[0163] 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 region 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.

[0164] 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.

[0165] Examples of small scaffold domains include: Kunitz domains (58 amino acids, 3 disulfide bonds), *Cucurbida 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.

[0166] 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.

[0167] 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.,

[0168] 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 --[CH_2NH]-- reduced amide peptide bonds, --[$COCH_2$]-- ketomethylene peptide bonds, --[CH(CN)NH]--(cyanomethylene)amino peptide bonds, --[$CH_2CH(OH)$]-- hydroxyethylene peptide bonds, --[CH_2O]--peptide bonds, and --[CH_2S]-- thiomethylene peptide bonds (see e.g., U.S. Pat. No. 6,172,043).

[0169] Pharmaceutical Composition, Dosages and Modes of Administration

[0170] Anti-IL-13 antibodies (or other IL-13 binding agent) can be incorporated into a pharmaceutical composition, e.g., by combination with a pharmaceutically acceptable carrier. Such a composition may also contain , e.g., various diluents, fillers, salts, buffers, stabilizers, solubilizers, and other materials well known in the art. The term "pharmaceutically acceptable" means a nontoxic material that does not interfere with the effectiveness of the biological activity of the active ingredient(s). The characteristics of the carrier can depend on the route of administration.

[0171] The pharmaceutical compositions may also contain other factors, such as, but not limited to, other anti-cytokine antibodies 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 antibody described herein. For example, in the treatment of allergic asthma, a pharmaceutical composition may also include, e.g., anti-IL-4 antibodies or drugs known to reduce an allergic response.

[0172] In one embodiment, the pharmaceutical composition includes the anti-IL-13 antibody as the sole biologic (e.g., the sole protein component) or as the sole biologically active ingredient. For example, the composition can include less than 25, 20, 15, 10, 5, 3, 2, 1, 0.4, or 0.1% other protein components on a w/w basis.

[0173] The pharmaceutical compositions may be in the form of a liposome in which an antibody 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

acids, and the like. Preparation of such liposomal formulations is within the level of skill in the art, as disclosed, for example, in U.S. Patent Nos. 4,235,871; 4,501,728; 4,837,028; and 4,737,323, all of which are incorporated herein by reference.

[0174] As used herein, the term "therapeutically effective amount" means the total amount of each active component of the pharmaceutical composition or method 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, serially or simultaneously.

[0175] In practicing an exemplary method of treatment or use described herein, a therapeutically effective amount of antibody 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), can be administered to a subject, e.g., mammal (e.g., a human). An antibody may be administered in accordance with the methods described either alone or in combination with other therapies such as treatments employing cytokines, lymphokines or other hematopoietic factors, or anti-inflammatory agents. When coadministered with one or more agents, the antibody may be administered either simultaneously with the second agent, or separately, e.g., sequentially. If administered separately, e.g., sequentially, the attending physician will decide on the appropriate sequence of administering the antibody in combination with other agents.

[0176] Administration of a pharmaceutical composition (e.g., a pharmaceutical composition containing an antibody that binds to IL-13) can be carried out in a variety of conventional ways, such as oral ingestion, inhalation, or cutaneous, subcutaneous, or intravenous injection. Subcutaneous administration to the patient is preferred.

[0177] When a therapeutically effective amount of an antibody that binds to IL-13 and interferes with the formation of a functional IL-13 signaling complex is administered orally, the binding agent will be in the form of a tablet, capsule, powder, solution or elixir. When administered in tablet form, a pharmaceutical composition

may additionally contain a solid carrier such as a gelatin or an adjuvant. The tablet, capsule, and powder contain from about 5 to 95% binding agent, and preferably from about 25 to 90% binding agent. When administered in liquid form, a liquid carrier such as water, petroleum, oils of animal or plant origin such as peanut oil, mineral oil, soybean oil, or sesame oil, or synthetic oils may be added. The liquid form of the pharmaceutical composition may further contain physiological saline solution, dextrose or other saccharide solution, or glycols such as ethylene glycol, propylene glycol or polyethylene glycol. When administered in liquid form, the pharmaceutical composition contains from about 0.5 to 90% by weight of the binding agent, and preferably from about 1 to 50% the binding agent.

[0178] When a therapeutically effective amount of an antibody that binds to IL-13 is administered by intravenous, cutaneous, or subcutaneous injection, the binding agent will be in the form of a pyrogen-free, parenterally acceptable aqueous solution. The preparation of such parenterally acceptable protein solutions, having due regard to pH, isotonicity, stability, and the like, is within the skill in the art. A preferred pharmaceutical composition for intravenous, cutaneous, or subcutaneous injection should contain, in addition to binding agent 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. A pharmaceutical composition may also contain stabilizers, preservatives, buffers, antioxidants, or other additive known to those of skill in the art.

[0179] The amount of an antibody (or other IL-13 binding agent) 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. Ultimately, the attending physician will decide the amount of antibody with which to treat each individual patient. Initially, the attending physician will administer low doses of antibody and observe the patient's response. Larger doses of antibody 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, doses in the range of 0.1-50 mg/kg, 0.5-50 mg/kg, 1 –100 mg/kg, 0.5-25 mg/kg, 0.1-15 mg/kg, or 1-8 mg/kg of body weight can be administered. The pharmaceutical composition can be

administered to normal patients or patients who do not show symptoms, e.g., in a prophylactic mode.

[0180] Inhalation

[0181] A composition that includes an IL-13 antibody or fragment thereof can be formulated for inhalation or other mode of pulmonary delivery. Accordingly, the compounds described herein 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 antibody or fragment thereof can be administered in combination with one or more of the existing modalities for treating pulmonary diseases.

[0182] In one example, the compound is formulated for a nebulizer. In one embodiment, the compound can be stored in a lyophilized form (e.g., at room temperature) and reconstituted in solution prior to inhalation.

[0183] It is also possible to formulate the compound for inhalation using a medical device, e.g., an inhaler (see, e.g., U.S. Patent Nos. 6,102,035 (a powder inhaler) and 6,012,454 (a dry powder inhaler). The inhaler can include separate compartments for the active compound at a pH suitable for storage and another compartment for a neutralizing buffer, and a mechanism for combining the compound with a neutralizing buffer immediately prior to atomization. In one embodiment, the inhaler is a metered dose inhaler.

[0184] 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, used in 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 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 medium has also been explored. These and other methods can be used to deliver an IL-13 antibody or fragment thereof. In one embodiment, the IL-13 antibody or fragment thereof is associated with a polymer, e.g., a polymer that stabilizes or increases half-life of the compound.

[0185] For example, for administration by inhalation, an IL-13 antibody or fragment thereof is delivered in the form of an aerosol spray from a pressured container or dispenser that contains a suitable propellant or a nebulizer. The compound may be in the form of a dry particle or a liquid. Particles that include the compound can be prepared, e.g., by spray drying, by drying an aqueous solution of the IL-13 antibody or fragment thereof with a charge neutralizing agent and then creating particles from the dried powder, or by drying an aqueous solution in an organic modifier and then creating particles from the dried powder.

[0186] The compound 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, 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 antibody or fragment thereof and a suitable powder base such as lactose or starch, if the particle 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 antibody or fragment thereof to promote the delivery and dispersion of formulated or unformulated compound. Methods of preparing dry particles are described, for example, in PCT Publication WO 02/32406.

[0187] An IL-13 antibody or fragment thereof 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 peak activity can be achieved even more quickly, e.g., within 30 minutes or even within 10 minutes. An IL-13 antibody or

fragment thereof can be formulated for longer biological half-life (e.g., by association with a polymer such as PEG) and can be used as an alternative to other modes of administration, e.g., such that the compound enters the circulation from the lungs and is distributed to other organs or to a particular target organ.

[0188] In one embodiment, the IL-13 antibody or fragment thereof 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 the capillary lumen from the alveolar air space is very thin and extremely permeable. In addition, the liquid layer lining the alveolar surface is rich in lung surfactants. In other embodiments, at least 2%, 3%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, or 80% of the composition of an IL-13 antibody or fragment thereof 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 compound and high bioavailability. In one embodiment, the compound is provided in a metered dose using, e.g., an inhaler or nebulizer. For example, the compound 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 = (AUCnoninvasive/AUCi.v. or s.c.) x (dosei.v. or s.c./dosenoninvasive) x 100.

[0189] Although not necessary, delivery enhancers such as surfactants can be used to further enhance pulmonary delivery. A "surfactant" as used herein refers to a compound having hydrophilic and lipophilic moieties that promote absorption of a drug by interacting with an interface between two immiscible phases. Surfactants are useful with 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 compound 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, 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.

[0190] Stabilization and Retention

[0191] In one embodiment, an IL-13 antibody or fragment thereof is physically associated with a moiety that improves its stabilization and/or retention in circulation, e.g., in blood, serum, lymph, bronchopulmonary or bronchoalveolar lavage, or other tissues, e.g., by at least 1.5, 2, 5, 10, or 50 fold. For example, an IL-13 antibody or fragment thereof can be associated with a polymer, e.g., a substantially nonantigenic polymer, 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, or about 2,000 to about 12,500) can be used. For example, an IL-13 antibody or fragment thereof can be conjugated to a water-soluble polymer, e.g., hydrophilic polyvinyl polymers, e.g. polyvinylalcohol and polyvinylpyrrolidone. A nonlimiting 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.

[0192] The molecular weight of the polymer can range up to about 500,000 Da, and preferably is at least about 20,000 Da, or at least about 30,000 Da, or at least about 40,000 Da. The molecular weight chosen can depend upon the effective size of the conjugate to be achieved, the nature (e.g., structure, such as linear or branched) of the polymer, and the degree of derivatization. A covalent bond can be used to attach an IL-13 antibody or fragment thereof to a polymer, for example, cross linking to the N-terminal amino group of the antibody and epsilon amino groups found on lysine residues of the antibody, as well as other amino, imino, carboxyl, sulfhydryl, hydroxyl or other hydrophilic groups. Functionalized PEG polymers that can be attached to an IL-13 antibody or fragment thereof are available, e.g., from Shearwater Polymers, Inc. (Huntsville, AL). The reaction conditions for coupling PEG and other polymers may vary depending on the IL-13 antibody or fragment thereof, the desired degree of PEGylation, and the polymer utilized. Some factors involved in the choice of PEG

derivatives include: the desired point of attachment (such as lysine or cysteine R-groups), hydrolytic stability and reactivity of the derivatives, stability, toxicity and antigenicity of the linkage, suitability for analysis, etc. Specific instructions for the use of any particular derivative are available from the manufacturer.

[0193] The conjugates of an IL-13 antibody or fragment thereof 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 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).

[0194] Therapeutic and Prophylactic Uses of Anti-IL-13 Antibodies

[0195] In yet another aspect, this disclosure features a method for neutralizing and/or inhibiting one or more associated activities of IL-13 *in vivo* by administering an antibody that binds to and/or neutralizes IL-13, e.g., an antibody described herein in an amount sufficient to inhibit its activity. Such antibodies 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.

[0196] We have shown that an antibody that binds IL-13 reduces airway inflammation in cynomolgus monkeys exposed to the allergen *Ascaris suum* (Example 3.6). We have also demonstrated upregulation by IL-13 of CD23 in human peripheral blood monocytes. Accordingly, antibodies disclosed herein that bind to IL-13, interfere with the formation of a functional IL-13 signaling complex, and may neutralize one or more IL-13-associated activities, can be used 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 and/or atopic disorders (e.g., that result from increased sensitivity to IL-13).

[0197] Accordingly, the antibodies disclosed herein may be used to treat an IL-13-associated disorder, e.g., a disorder chosen from one or more of: respiratory disorders, e.g., asthma (e.g., allergic 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, urticaria, eczema, allergic rhinitis, and allergic enterogastritis); inflammatory and/or autoimmune conditions of, the skin (e.g., atopic dermatitis), gastrointestinal organs (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 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), as described herein.

[0198] Respiratory Disorders

[0199] IL-13 antagonists (e.g., an IL-13 binding agent such as an antibody or antigen binding fragment described herein) 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 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.

[0200] Asthma can be triggered by myriad conditions, e.g., inhalation of an allergen, presence of an upper-respiratory or ear infection, etc. (Opperwall (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 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,

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).

[0201] $CD4^+$ T helper (Th) cells are important for the chronic inflammation 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 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 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*).

[0202] The methods for treating or preventing asthma described herein include those for extrinsic asthma (also known as allergic asthma or atopic asthma), intrinsic 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.

[0203] 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 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 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 silent asthma or cough variant asthma.

[0204] 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 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 antagonist 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, 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.

[0205] Atopic Disorders and Symptoms Thereof

[0206] "Atopic" refers to a group of diseases in which there is often an inherited tendency to develop an allergic reaction. Examples of atopic disorders include allergy, allergic rhinitis, atopic 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 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 antagonist (e.g., an IL-13 binding agent such as an antibody or antigen binding fragment described herein) can be administered to ameliorate one or more of these symptoms.

[0207] Symptoms of allergic rhinitis (hay fever) include itchy, runny, sneezing, or stuffy nose, and itchy eyes. An IL-13 antagonist 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, 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 "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 antagonist (e.g., an IL-13 binding agent such as an antibody or antigen binding fragment described herein) can be administered to ameliorate one or more of these symptoms.

[0208] An exemplary method for treating allergic rhinitis or other allergic disorder can include initiating therapy with an IL-13 antagonist 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.

[0209] Cancer

[0210] 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-13Rα2 (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 antagonists, e.g., anti-IL-13 antibodies and fragments thereof, can be useful to inhibit cancer cell proliferation or other cancer cell activity. A cancer 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.

[0211] Examples of cancers against which IL-13 antagonists (e.g., an IL-13 binding agent such as an antibody or antigen binding fragment described herein) can be 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.

[0212] Fibrosis

[0213] IL-13 antagonists (e.g., an IL-13 binding agent such as an antibody or antigen binding fragment described herein) can also be useful in treating inflammation and fibrosis, e.g., fibrosis of the liver. IL-13 production has been correlated with the 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 complications such as liver failure or hepatocellular carcinoma. Blocking IL-13 activity using the IL-13 antagonists, 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.

[0214] Inflammatory Bowel Disease

[0215] 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). IL-13 antagonists (e.g., an IL-13 binding agent such as an antibody or antigen binding fragment described herein) can be useful in treating, preventing, or alleviating inflammatory bowel disease or one or more symptoms of inflammatory bowel disease.

[0216] In one embodiment, an antibody described herein, e.g., a pharmaceutical composition 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 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.

[0217] For example, the combination therapy can include one or more antibodies described herein, i.e., that bind to IL-13 and interfere with the formation of a functional IL-13 signaling complex, 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 anti-IL-13 antibodies described herein 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 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 antibodies.

[0218] Examples of preferred additional therapeutic agents that can be coadministered and/or coformulated with one or more IL-13 antagonists, e.g., anti-IL-13 antibodies or fragments thereof, include, but are not limited to, one or more of: inhaled steroids; beta-agonists, e.g., short-acting or long-acting beta-agonists; leukotriene antagonists or leukotriene receptor antagonists; 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 disorders. 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., TNFα 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 NFκB inhibitors, among others.

[0219] It is also possible to provide kits for carrying out the combined administration of an IL-13 antibody with one or more other therapeutic compounds, or for using the anti-IL-13 antibodies as a research or therapeutic tool to determine the presence and/or level of IL-13 in a biological sample, such as an ELISA kit. In one embodiment, the kit comprises one or more anti-IL-13 antibody formulated in a pharmaceutical carrier, and at least one agent, e.g., a therapeutic agent, formulated as appropriate, in one or more separate pharmaceutical preparations.

[0220] Vaccine Formulations

[0221] IL-13 antagonists (e.g., an IL-13 binding agent such as an antibody or antigen binding fragment described herein) can be used to increase the efficacy of a vaccine formulation to immunize an subject. For example, an IL-13 antagonist can be administered before, during, and/or after an immunization to increase vaccine efficacy. In one embodiment, the vaccine formulation contains one or more IL-13 antagonists and an antigen, i.e., an immunogen. In another embodiment, the IL-13 antagonist and the immunogen are administered separately, e.g., within one hour, three hours, one day, or two days of each other.

[0222] 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. 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 antagonist, e.g., anti-IL 13 antibody or fragment thereof, 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 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).

[0223] A vaccine formulation may be administered to a subject in the form of a pharmaceutical or therapeutic composition. Pharmaceutical compositions comprising the IL-13 antagonists described herein and an antigen may be manufactured by means of conventional mixing, dissolving, granulating, dragee-making, levigating, emulsifying, encapsulating, entrapping, or lyophilizing processes. Pharmaceutical compositions may be formulated in conventional manner using one or more pharmaceutically acceptable carriers, diluents, excipients, or auxiliaries that facilitate processing of the antigens and antagonists described herein into preparations which can be used pharmaceutically. Proper formulation is dependent upon the route of administration chosen. Systemic formulations include those designed for administration by injection, e.g. subcutaneous, intradermal, intramuscular, or intraperitoneal injection. For injection, the vaccine preparations may be formulated in aqueous solutions, preferably in physiologically compatible buffers such as Hanks's solution, Ringer's solution, phosphate buffered saline, or any other physiological saline buffer. The solution may contain formulatory agents such as suspending, stabilizing, and/or dispersing agents. Alternatively, the proteins may be in powder form for constitution with a suitable vehicle, e.g., sterile pyrogen-free water, before use..

[0224] An effective dose can be estimated initially using animal models. For example, a dose can be formulated in animal models to achieve an induction of an immune response using techniques that are well known in the art. Dosage amount and interval may be adjusted individually. For example, when used as a vaccine, the vaccine formulations may be administered in about 1 to 3 doses for a 1-36 week period. Preferably, 1 or 2 doses are administered at intervals of about 3 weeks to about 4 months, and booster vaccinations may be given periodically thereafter. Alternative protocols may be appropriate for individual animals. A suitable dose is an amount of the vaccine formulation that, when administered as described above, is capable of raising an immune response in an immunized subject sufficient to protect the subject from an infection for at least 4 to 12 months. In general, the amount of the antigen present in a dose ranges from about 1 pg to about 100 mg per kg of host, typically from about 10 pg to about 1 mg, and preferably from about 100 pg to about 1 μg. Suitable dose range will vary with the route of injection and the size of the patient, but will typically range from about 0.1 mL to about 5 mL.

[0225] Methods for Diagnosing, Prognosing, and Monitoring Disorders

[0226] Proteins that bind to IL-13, e.g., antibodies, described herein have *in vitro* and in *vivo* diagnostic, utilities. An exemplary method includes: (i) administering the IL-13 antibody to a subject; and (ii) detecting the IL-13 antibody in the subject. The detecting can include determining location of the IL-13 antibody in the subject. Another exemplary method includes contacting an IL-13 antibody to a sample, e.g., a sample from a subject.

[0227] 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, biopsy) or in vivo (e.g., in vivo imaging in a subject). The method includes: (i) contacting a sample with IL-13 antibody; and (ii) detecting formation of a complex between the IL-13 antibody and the sample. The method can also include contacting a reference sample (e.g., a control sample) with the ligand, and determining the extent of formation of the complex between the ligand 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 sample or subject relative to the control sample or subject can be indicative of the presence of IL-13 in the sample.

[0228] The IL-13 antibody 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.

[0229] Complex formation between the IL-13 antibody and IL-13 can be detected by measuring or visualizing either the ligand bound to the IL-13 or unbound ligand. 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 antibody, 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 antibody.

[0230] Methods for Diagnosing, Prognosing, and Monitoring the Progress of Asthma

[0231] It is also possible to diagnose, prognose, and/or monitor the progress of asthma and/or atopic disorders (e.g., resulting from increased sensitivity to IL-13) by measuring the level of IL-13 in a biological sample. In particular, the antibodies disclosed herein can be used in a method of distinguishing whether a patient is suffering from allergic or nonallergic asthma.

[0232] 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 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.

[0233] Methods for prognosing asthma and/or atopic disorders can include detecting upregulation of IL-13, at the mRNA or protein level. "Prognostic" or "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 certain prognoses for asthma. The detection of an amount of IL-13 at a particular prognostic level provides a prognosis for the subject.

[0234] The present invention also provides methods for monitoring the course of asthma and/or atopic disorders 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 first and second time, and comparing the amounts. A change in

amount of IL-13 between the first and second time indicates 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 intervention (e.g., disease attenuation and/or reversal) in patients being treated for asthma and/or atopic disorder.

[0235] Fluorophore- and chromophore-labeled protein ligands can be prepared. Since antibodies and other proteins absorb light having wavelengths up to about 310 nm, the fluorescent moieties should be selected to have substantial absorption at wavelengths above 310 nm, and preferably above 400 nm. A variety of suitable fluorescers and chromophores are described by Stryer (*Science* (1968) 162:526) and by Brand et al. (*Annual Rev. Biochem.* (1972) 41:843 868). The protein ligands 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 protein ligand 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).

[0236] Immunohistochemistry can be performed using the protein ligands described herein. For example, in the case of an antibody, the antibody can 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.

[0237] 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.

[0238] The IL-13 antibody 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 ligands, e.g., that bind to IL-13 or to other target molecules.

[0239] Methods of producing polypeptide 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 apparati, 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 include a porous matrix, e.g., acrylamide, agarose, or another polymer.

[0240] For example, the array can be an array of antibodies, e.g., as described in De Wildt, *supra*. Cells that produce the protein ligands can be grown on a filter in an arrayed format. Polypeptide production is induced, and the expressed polypeptides are immobilized to the filter at the location of the cell.

[0241] A protein array can be contacted with a labeled target to determine the extent of binding of the target to each immobilized polypeptide from the diversity strand library. If the target is unlabeled, a sandwich method can be used, e.g., using a labeled probed, to detect binding of the unlabeled target.

[0242] Information about the extent of binding at each address of the array can be stored as a profile, e.g., in a computer database. The protein array can be produced in replicates and used to compare binding profiles, e.g., of a target and a non-target. Thus, protein arrays can be used to identify individual members of the diversity strand library that have desired binding properties with respect to one or more molecules.

[0243] The IL-13 antibody can be used to label cells, e.g., cells in a sample (e.g., a patient sample). The ligand is also attached (or attachable) to a fluorescent compound. The cells can then be 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 detecting fluorescence. The amount of label bound to each cell can be quantified and analyzed to characterize the sample.

[0244] The sorter can also deflect the cell and separate cells bound by the ligand from those cells not bound by the ligand. The separated cells can be cultured and/or characterized.

[0245] In still another embodiment, the invention provides a 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.

[0246] Examples of labels useful for diagnostic imaging include radiolabels such as ^{131}I, ^{111}In, ^{123}I, ^{99m}Tc, ^{32}P, ^{33}P, ^{125}I, ^{3}H, ^{14}C, and ^{188}Rh, fluorescent labels such as fluorescein and rhodamine, nuclear magnetic resonance active labels, positron emitting isotopes detectable by a positron emission tomography ("PET") scanner, chemiluminescers such as luciferin, and enzymatic markers such as peroxidase or phosphatase. Short range radiation emitters, such as isotopes detectable by short range detector probes can also be employed. The protein ligand can be labeled with such reagents using known techniques. For example, see Wensel and Meares (1983) *Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy*, Elsevier, New York for techniques relating to the radiolabeling of antibodies and Colcher et al. (1986) *Meth. Enzymol.* 121: 802 816.

[0247] A radiolabeled ligand can also be used for in vitro diagnostic tests. The specific activity of a isotopically-labeled ligand depends upon the half life, the isotopic purity of the radioactive label, and how the label is incorporated into the antibody.

[0248] Procedures for labeling polypeptides with the radioactive isotopes (such as ^{14}C, ^{3}H, ^{35}S, ^{99m}Tc, ^{125}I, ^{32}P, ^{33}P, and ^{131}I) are generally known. See, e.g., 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) and the references cited therein; and 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).

[0249] IL-13 antibodies described herein can be conjugated to Magnetic Resonance Imaging (MRI) contrast agents. Some MRI techniques are summarized in EP-A-0 502 814.

[0250] The differences in these relaxation time constants can be enhanced by contrast agents. Examples of such contrast agents include a number of magnetic agents paramagnetic agents (which primarily alter T1) and ferromagnetic or superparamagnetic (which primarily alter T2 response). Chelates (e.g., EDTA, DTPA and NTA chelates) can be used to attach (and reduce toxicity) of some paramagnetic substances (e.g., Fe^{3+}, Mn^{2+}, Gd^{3+}). Other agents can be in the form of particles, e.g., less than 10 mm to about 10 nm in diameter and having ferromagnetic, antiferromagnetic, or superparamagnetic properties.

[0251] The IL-13 antibodies can also be labeled with an indicating group containing the NMR active ^{19}F atom, or a plurality of such atoms as described by Pykett ((1982) *Scientific American* 246:78-88) to locate and image IL-13 distribution.

[0252] Also within the scope described herein are kits comprising the protein ligand that binds to IL-13 and instructions for diagnostic use, e.g., the use of the IL-13 antibody (e.g., antibody or antigen-binding fragment thereof, 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 ligand can be formulated as a pharmaceutical composition.

[0253] Kits

[0254] An IL-13 antagonist, e.g., anti-IL-13 antibody or fragment thereof, can be provided in a kit, e.g., as a component of a kit. For example, the kit includes (a) an

IL-13 antagonist, e.g., anti-IL-13 antibody or fragment thereof, e.g., a composition that includes an IL-13 antibody or fragment thereof, and, optionally (b) informational material. The informational material can be descriptive, instructional, marketing, or other material that relates to the methods described herein and/or the use of an IL-13 antagonist, e.g., anti-IL-13 antibody or fragment thereof, for the methods described herein.

[0255] 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 ligand to treat, prevent, diagnose, prognose, or monitor a disorder described herein.

[0256] In one embodiment, the informational material can include instructions to administer an IL-13 antagonist, e.g., anti-IL-13 antibody or fragment thereof, 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 antagonist, e.g., anti-IL-13 antibody or fragment thereof, 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).

[0257] For example, the material can include instructions to administer an IL-13 antagonist, e.g., anti-IL-13 antibody or fragment thereof, 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.

[0258] The kit can include one or more containers for the composition containing an IL-13 antagonist, e.g., anti-IL-13 antibody or fragment thereof. 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

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 form described herein) of an IL-13 antagonist, e.g., anti-IL-13 antibody or fragment thereof. 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 antagonist, e.g., anti-IL-13 antibody or fragment thereof, or multiple unit doses.

[0259] The kit optionally includes a device suitable for administration of the 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 ligand.

[0260] The Examples which follow are set forth to aid in the understanding of the inventions but are not intended to, and should not be construed to, limit its scope in any way.

[0261] Example 1: Generation of a murine monoclonal antibody specific for human IL-13

[0262] *Example 1.1: Isolation of a murine monoclonal antibody that binds to human IL-13 (mAb13.2)*

[0263] Polyclonal antisera were prepared by immunization of female BALB/c mice with recombinant human IL-13 (R&D Systems, Minneapolis, MN). Sera were screened for binding to human IL-13 by ELISA. Splenocytes from a mouse demonstrating high serum antibody titers were fused with the P3X63_AG8.653 myeloma (ATCC), and plated in selective media. Fusions were isolated with 3 rounds of subcloning by limiting dilution and screened for the production of antibodies that had a binding affinity to human IL-13. Three monoclonal antibodies were capable of binding IL-13, interfering with the formation of a functional IL-13 signaling complex

and neutralizing and/or inhibiting one or more IL-13-associated activities; antibody mAb13.2 (IgG1 kappa) was chosen for further study.

[0264] *Example 1.2: Murine monoclonal antibody, mAb13.2, binds human IL-13 with high affinity and specificity*

[0265] Several measures were taken to confirm that the murine monoclonal antibody isolated in Example 1.1, i.e., mAb13.2, binds with high affinity and specificity to human IL-13. First, BIACORE™ analyses of three monoclonal antibodies to human IL-13 (mAb13.2, mAb13.4, and mAb13.9) were performed using a 69 RU streptavidin chip to which biotinylated IL-13 had been immobilized. The three antibodies were individually passed over the chip and each showed rapid binding (**FIG. 1**). Upon buffer exchange, dissociation was slow (**FIG. 1**). Second, BIACORE™ analysis of mAb13.2 was performed using a Biacore chip to which mAb13.2 had been immobilized. Different concentrations of IL-13 were passed over the chip. Again, rapid binding and slow dissociation was shown (**FIG. 2**). Third, analysis by ELISA determined that mAb13.2 bound to all forms of human IL-13 tested, including native IL-13 derived from cord blood T cells (**FIG. 3**). Plates were coated with anti-FLAG™ M2 antibody. The binding of FLAG™-human IL-13 was detected with biotinylated mAb13.2 and streptavidin-peroxidase. ELISA demonstrated that the binding between mAb13.2 and IL-13 could be competed with native human IL-13 isolated from mitogen-activated, Th2-skewed, cord blood mononuclear cells and recombinant human IL-13 (**FIG. 3**). There was no detectable binding of mAb13.2 to recombinant murine IL-13 (**FIG. 3**). To confirm the results found by ELISA, the monoclonal antibody, mAb13.2, was coated onto a Biacore chip, and solutions containing recombinant human IL-13 or a polymorphic form of IL-13 (ARG variant), which is expressed at high frequency in patients suffering from asthma (Heinzmann et al. (2000) *Hum. Mol. Genet.* 9:594), were passed over the chip. Both forms showed rapid binding and undetectable dissociation from the antibody (**FIG. 4A**). Finally, during a preliminary cross-reactivity study performed under GLP (good laboratory practice) conditions, mAb13.2 demonstrated no significant cross-reactivity when screened against a panel of 37 normal human tissues obtained at autopsy or biopsy, i.e., a tissue panel that included 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 all 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".

[0266] *Example 1.3: Murine monoclonal antibody mAb13.2 neutralizes IL-13-associated activities in vitro*

[0267] The ability of mAb13.2 to neutralize one or more IL-13-associated activities *in vitro* was confirmed using the TF1 bioassay, human peripheral blood monocytes, and human peripheral blood B cells. Under appropriate conditions, proliferation of the human TF1 erythroleukemia cell line can be made dependent on IL-13. It was first determined whether proliferation of the cytokine-depending TF1 cell line induced with suboptimal concentrations of either recombinant human IL-13 or the ARG-variant form of human IL-13 could be inhibited by mAb13.2. **FIG. 4B** demonstrates that mAB13.2 inhibited the abilities of both recombinant human IL-13 and the ARG-variant form of human IL-13 to stimulate TF1 proliferation. Second, the TF1 cell line was starved for IL-13, then exposed to a suboptimal concentration of recombinant human IL-13 to induce proliferation in the presence of either purified mouse mAb13.2 or soluble IL-13 receptor (rhuIL-13Rα2). Cells were incubated for 3 days, and ^{3}H-thymidine incorporation over the final 4 hours was determined by liquid scintillation counting. At suboptimal IL-13 concentrations, mAb13.2 caused a dose-dependent inhibition of TF1 proliferation (**FIG. 5**). The IC_{50} for this effect, 250 pM, is highly comparable to that of soluble rhuIL-13Rα2 (**FIG. 5**). Exemplary antibodies have an IC_{50} for this effect between about 50 -500 pM, or 120-300 pM, or 240-350 pM.

[0268] Since human peripheral blood monocytes respond in a dose-dependent manner to IL-13 or IL-4 by increasing cell-surface expression of low affinity IgE receptor (CD23) (**FIG. 6A**), human monocytes were used to confirm the ability of mAb13.2 to neutralize this IL-13-associated activity. To determine whether mAb13.2 could neutralize IL-13-mediated CD23 cell surface expression by monocytes, peripheral blood mononuclear cells were isolated from a healthy donor and incubated with increasing amounts of IL-13 only, increasing amounts of IL-4 only, 1 ng/ml IL-13 and increasing amounts of mAb13.2, or 0.3 ng/ml IL-4 and increasing amounts of

mAb13.2. The next day, cells were harvested, and stained with CYCHROME™-labeled anti-CD11b (monocyte marker) and PE-labeled anti-CD23. Gated $CD11b^+$ monocytes were assayed for CD23 expression by flow cytometry. As expected, mAb13.2 inhibited IL-13-mediated CD23 expression (**FIG. 6B**) but did not inhibit IL-4-induced CD23 expression (**FIG. 6C**).

[0269] The effects of mAb13.2 were also tested in a model of IL-13-mediated IgE production by human peripheral blood B cells. In response to IL-13 and the T cell mitogen, PHA, human B cells undergo an Ig isotype switch recombination to IgE, resulting in higher IgE levels in culture. This effect can be seen as an increased frequency of IgE-producing B cells. PBMCs from a healthy donor were cultured in microtiter wells in the presence of autologous irradiated PBMCs as feeders, and stimulated with PHA and IL-13. After 3 weeks, each well was assayed for IgE concentrations by ELISA. PHA + IL-13 increased the frequency of IgE-producing B cell clones (**FIG. 7**). This effect was inhibited by mAb13.2, but not by an IL-13-specific nonneutralizing antibody (mAb13.8) or by control mouse IgG (msIgG) (**FIG. 7**), demonstrating that mAb13.2 efficiently blocked IL-13-mediated IgE isotype switching by cultured B cells.

[0270] Finally, the ability of mAb13.2 to block an early cellular response to IL-13 was tested by examining its effects on signal transducer and activator of transcription (STAT) 6 phosphorylation. Upon IL-13 interaction with its cell surface receptor, STAT6 dimerizes, becomes phosphorylated, and translocates from the cytoplasm to the nucleus, where it activates transcription of cytokine-responsive genes (Murata et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270:30829-36). Specific antibodies to phosphorylated STAT6 can detect this activation by Western blot and/or flow cytometric analysis within 30 minutes of IL-13 exposure.

[0271] The HT-29 human epithelial cell line was used to assay STAT6 phosphorylation. HT-29 cells were incubated in increasing concentrations of IL-13 for 30 minutes at 37 °C. Western blot analysis of cell lysates demonstrated dose-dependent IL-13-mediated phosphorylation of STAT6 (**FIG. 8A**). Similarly, flow cytometric analysis demonstrated 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 (**FIG. 8B**). Treated cells stained with an isotype control antibody did not demonstrate fluorescence. Finally, when cells were treated with a suboptimal concentration of IL-13 alone, IL-13 and mAb13.8, IL-13 and mAB13.2, or IL-13 and a control msIgG1 antibody, flow cytometric analysis demonstrated complete abrogation of STAT6 phosphorylation only when cells were treated in the presence of mAb13.2, i.e., whereas mAb13.2 blocked STAT6 phosphorylation, an IL-13-specific nonneutralizing antibody (mAb13.8) and a control mouse IgG1 had no effect (**FIG. 8C**). These studies demonstrated that mAb13.2 inhibited IL-13-mediated STAT6 phosphorylation.

[0272] *Example 1.4: Murine monoclonal antibody mAb13.2 neutralizes IL-13-associated activities in vivo*

[0273] The efficacy of mouse mAb13.2 to neutralize one or more IL-13-associated activities *in vivo* was 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 cells, especially eosinophils, into the airways. To test the ability of mAb13.2 to prevent this influx of cells, the antibody was administered 24 hours prior to challenge with *Ascaris suum* antigen. On the day of challenge, a baseline bronchoalveolar lavage (BAL) sample was taken from the left lung. The antigen was then instilled intratracheally into the right lung. Twenty-four hours later, the right lung was lavaged, and the BAL fluid from animals treated intravenously with 8 mg/kg ascites-purified mAb13.2 was compared to BAL fluid from untreated animals. Eosinophil counts increased in 4 of 5 untreated animals following challenge, as compared to 1 of 6 animals treated with mAb13.2 (**FIG. 9**). The percent BAL eosinophils was significantly increased for the untreated group ($p < 0.02$), but not for the antibody-treated group. These results confirm that mAb13.2 effectively prevents airway eosinophilia in allergic animals challenged with an allergen.

[0274] The average serum half-life of mouse mAb13.2 was less than one week in the monkeys. At the 3-month time point, when all traces of mAb13.2 would have been gone from the serum, mAb13.2-treated animals were rechallenged with *Ascaris*

suum to confirm the *Ascaris*-responsiveness of those individuals. Two of six monkeys in the treated group were found to be nonresponders.

[0275] *Example 1.5: Murine monoclonal antibody mAb13.2 binds to a region of IL-13 that normally binds to IL-4Rα*

[0276] IL-13-associated activities are presumably mediated through a receptor complex consisting of the IL-13Rα1 and IL-4Rα chains. The cytokine first undergoes a relatively low affinity interaction with IL-13Rα1 on the surface of cells. The IL-13/IL-13Rα1 complex then recruits IL-4Rα to form the complete IL-13 receptor, which is bound to its ligand (IL-13) with high affinity (Zurawski et al. (1993) *EMBO J.* 12:2663; Zurawski et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270:23869). The binding of IL-13 with the high affinity receptor then sends downstream signals through the IL-4Rα chain involving the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT) pathway, e.g., via phosphorylation of STAT6, which can be monitored as one of the earliest cellular responses to IL-13 (Murata et al., *supra*). Several approaches, such as epitope mapping, x-ray crystallography, and further BIACORE™ analysis, were used to elucidate the interaction between murine mAb13.2 antibody and human IL-13 and further examine the basis underlying the ability of mAb13.2 to modulate one or more IL-13-associated activities.

[0277] The interaction between mAb13.2 and IL-13 was studied by x-ray crystallography. Total IgG from ascites was isolated over a protein A column and digested with papain to generate mAb13.2 Fab fragments, which were then highly purified. The Fab fragments themselves were crystallized, and structural analyses were obtained at 2.8 Å resolution using synchrotron radiation. In addition, mAb13.2 Fab fragments were cocrystallized with human IL-13, and this crystal structure resolved to 1.8 Å resolution. The major contact sites between mAb13.2 and IL-13 were identified as clustered mainly at the CDR loops of the antibody and the C-terminal region of the C-helix of IL-13 (**FIG. 10**). According to the numbering sequence shown in **FIG. 11** for the mature IL-13 protein, i.e., the IL-13 protein from which the signal peptide has been cleaved, the major residues of IL-13 that contact mAb13.2 are GLU49, ASN53, GLY69, PRO72, HIS73, LYS74, and ARG86 of SEQ ID NO:32.

[0278] The ability of mAb13.2 Fab fragments to bind to human IL-13 was confirmed by ELISA. The binding of FLAG-human IL-13 to ELISA plates that were coated overnight with anti-FLAG M2 antibody was detected using biotinylated mAb13.2. Unlabeled mAb13.2, isolated mAb13.2 Fab fragments, or irrelevant antibody was introduced to compete with biotinylated mAb13.2 binding to FLAG-human IL-13. The data demonstrate that unlabeled mAb13.2 and mAb13.2 Fab fragments were able to compete with biotinylated mAb13.2 for binding to FLAG-human IL-13 (**FIG. 12**). Additionally, although it appeared that a greater concentration of Fab fragments was required to achieve a similar degree of competition as unlabeled mAb13.2 (**FIG. 12A**), this discrepancy was resolved when the competition was analyzed as a function of the concentration of binding sites, e.g., assuming one binding site per each isolated Fab fragment and two binding sites per each unlabeled mAb13.2 (**FIG. 12B**). In contrast to unlabeled mAb13.2 and mAb13.2 Fab fragments, irrelevant antibody was unable to compete with biotinylated mAb13.2 for binding to FLAG-human IL-13 (**FIG. 12**).

[0279] The ability of mAb13.2 Fab fragments to neutralize one or more IL-13-associated activities *in vitro* was confirmed by determining the proliferation of TF1 cells and expression of CD23 by human peripheral blood monocytes, as described above, in the absence or presence of mAb13.2 Fab fragments. **FIG. 13A** demonstrates that mAB13.2 Fab fragments, similar to mAb13.2, inhibited the ability of recombinant human IL-13 to stimulate TF1 proliferation in a binding site concentration-dependent manner. Additionally, mAb13.2 Fab fragments, similar to mAb13.2, inhibited IL-13-mediated expression of CD23 in a binding site concentration-dependent manner (**FIG. 13B**).

[0280] The x-ray crystallography, epitope mapping, ELISA, TF1 proliferation, and CD23 expression analyses described above indicated that mAb13.2 binds to the C-terminal region of IL-13 helix, i.e., the IL-4R binding region. To confirm this analysis, the interaction between mAb13.2 and IL-13 was analyzed with a BIACORE™ chip. This analysis was done in several formats. First, IL-4R was bound to the BIACORE™ chip, and a complex of IL-13 prebound to IL-13Rα1 was flowed over the chip. In absence of mAb13.2, formation of a trimolecular complex was demonstrated. However, addition of mAb13.2 to the mixture of IL-13 prebound to IL-13Rα1

prevented binding to IL-4R on the chip. Second, mAb13.2 was immobilized on the chip and bound IL-13 was added in solution phase. Although IL-13Rα1 was detected to interact with the bound IL-13, no interaction of IL-4R with bound IL-13 was detected. Third, it was demonstrated that mAb13.2 could bind to IL-13 that was bound to IL-13Rα1-Fc or IL-13Rα1 monomer immobilized on the chip. These observations support the hypothesis that mAb13.2 does not inhibit IL-13 interaction with IL-13Rα1 but disrupts the interaction of IL-13Rα1 with IL-4Rα. This disruption is thought to interfere with the formation of a functional IL-13 signaling complex. These observations provide a theoretical model for the neutralizing activity of this antibody.

[0281] The *in vitro* demonstration of a complex of mAb13.2 with IL-13 and IL-13Rα1 suggests that mAb13.2 could potentially be bound to receptor-associated IL-13 at the cell surface. In order to determine whether cell-bound mAb13.2 could be detected under conditions of saturating receptor-bound IL-13, the HT-29 human epithelial cell line was treated with various concentrations of IL-13 at 4 °C followed by addition of monoclonal antibody mAb13.2, mAb13.8 or control mouse IgG1. Binding was detected by flow cytometric analysis using biotinylated anti-mouse IgG1 and PE-streptavidin. Although HT-29 cells express IL-13Rα1, binding of mAb13.2 to cell surface-bound IL-13 was not detected at concentrations of mAb13.2 up to 2 mg/ml. This observation, together with the demonstration that mAb13.2 is a potent neutralizer of one or more IL-13-associated activities, indicates that normal functioning of the IL-13 signaling complex, i.e., the IL-13 receptor, is disrupted by mAb13.2.

[0282] The findings described above confirm that murine monoclonal antibody mAb13.2, binds with high affinity and specificity to IL-13, and exhibits potent neutralization activity, i.e., mAb13.2 efficiently blocks every IL-13-associated activity that was tested. These observations are correlated with the finding that mAb13.2 may interact with the IL-4Rα binding site, and not the IL-13Rα1 binding site, of human IL-13.

[0283] Example 2: Generation of a chimeric mAb13.2 antibody (ch13.2)

[0284] *Example 2.1: Isolation of a chimeric mAb13.2 antibody (ch13.2)*

[0285] The variable heavy (VH) and variable light (VL) genes encoding mAb13.2 were cloned and sequenced from mRNA isolated from the hybridoma producing the antibody. The VH sequence was subcloned into the pED6 huIgG1_mut expression vector, which encodes human IgG1 containing two point mutations (L234A and G237A) to reduce binding to human Fc receptors and complement components (SEQ ID NO:17; Morgan et al. (1995) *Immunology* 86:319-24; Shields et al (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-604). The VL sequence of mAb13.2 was subcloned into the pED6 Kappa expression vector. The expression vectors containing the mAb13.2 VH and VL sequences were cotransfected into COS-1 cells and the chimeric mAb13.2 antibody (ch13.2) was purified from conditioned medium.

[0286] *Example 2.2: Chimeric mAb13.2 antibody (ch13.2) neutralizes IL-13-associated activities in vitro*

[0287] The chimeric antibody, ch13.2, was tested for IL-13 binding. Monoclonal antibody mAb13.2, the chimeric form of mAb13.2 (ch13.2), and a control antibody (13.8) were tested for their abilities to compete with biotinylated mouse mAb13.2 for binding to human IL-13-FLAG immobilized on an ELISA plate with anti-FLAG antibody. Chimeric antibody, ch13.2, was able to competitively bind to IL-13 similarly to mAb13.2 (**FIG. 14A**). In another test, human peripheral blood monocytes were treated overnight with IL-13 to induce CD23 expression in the presence of various concentrations of mouse mAb13.2 or ch13.2. As shown in **FIG. 14B,** ch13.2 prevented IL-13-mediated CD23 expression by monocytes to the same degree as mAb13.2.

[0288] Example 3: Generation of partially and fully humanized mAb13.2 antibodies (h13.2v1 and h13.2v2)

[0289] *Example 3.1: Isolation of a partially humanized mAb13.2 antibody (h13.2v1)*

[0290] Humanization of mAb13.2 was based on amino acid sequence homology, CDR cluster analysis, frequency of use among expressed human antibodies,

and available information on the crystal structures of human antibodies. Humanization was based on the human DP-54 variable heavy (VH) and DPK-9 variable light (VL) germline genes (shown, e.g., in **FIGs. 16 and 17**, respectively). Taking into account possible effects on antibody binding, VH-VL pairing, and other factors, murine residues were mutated to human residues where murine and human framework residues were different, with a few exceptions. A comparison of the ch13.2 VH chain amino acid sequence to the predicted amino acid sequence of the human DP-54 germline gene and the resulting partially humanized h13.2v1 VH chain amino acid sequence is shown in **FIG. 15**. A comparison of the ch13.2 VL chain amino acid sequence to the predicted amino acid sequence of human DPK-9 and the resulting partially humanized h13.2v1 VL chain is shown in **FIG. 16**. As can be seen in **FIGs. 16 and 17**, the h13.2v1 VH and VL chains retained the complementarity determining regions (CDR), or antigen-binding regions, of ch13.2 VH and VL chains, respectively. Additionally, only one residue in the VH framework and two in the VL framework were kept murine to reduce the risk of drastically changing the antigen-binding region and the VH-VL pairing (**FIGs. 16 and 17**).

[0291] Partial humanization of mAb13.2 was achieved by mutating the nucleotide sequence encoding (murine) mAb13.2 such that amino acids corresponding to the human germline gene would be substituted at the indicated framework positions. For each amino acid change to be introduced, appropriate nucleotide substitutions were devised, with codons optimized for expression in CHO cells. Humanization of VH was done by a process of PCR mutagenesis, in which oligonucleotide primers incorporating mutations for one or two amino acids at a time were used to amplify the murine template gene sequence. Several rounds of PCR mutagenesis were required to achieve partial humanization. Humanization of VL was done by PCR using a panel of nine overlapping oligonucleotides corresponding to the murine VL sequence with appropriate nucleotide substitutions. The overlapping regions served as templates, and PCR was used to fill in the gaps between primers on the sense and antisense strands. The resulting partially humanized antibody was named h13.2v1. The nucleotide sequences encoding the VL and VH of h13.2v1 are designated SEQ ID NO:3 and SEQ ID NO:7, respectively.

[0292] *Example 3.2: Isolation of fully humanized mAb13.2 (h13.2v2)*

[0293] As indicated in **FIG. 15** and **FIG. 16**, h13.2v1 retained 3 murine residues in the framework regions: one in the VH chain and two in the VL chain. Preliminary work and analysis of the cocrystal structure of mAb13.2 Fab with human IL-13 confirmed that all 3 residues could be mutated to human. These were residue #3 in the VH chain (K in mouse, Q in human), residue #4 in the VL chain (L in mouse, M in human) and residue #72 in the VL chain (#68 in germline; R in mouse, G in human). Therefore, to produce the fully humanized version of mAb13.2, h13.2v2, PCR mutagenesis was used to introduce the mutations K3Q in the VH chain of h13.2v1, and L4M and R72G in the VL chain of h13.2v1. The final VH and VL sequences of h13.2v2 are shown in **FIG. 17** and **FIG. 18**, respectively. Nucleotide sequences encoding the VL and VH of h13.2v2 are designated SEQ ID NO:4 and SEQ ID NO:8, respectively.

[0294] According to the sequence shown in **FIG. 29** (using the linear numbering scheme), it was determined that the major residues of the mAb13.2 heavy chain that make hydrogen bond contacts with IL-13 are SER50 (CDR2), SER53 (CDR2), TYR101 (CDR3), and TYR102 (CDR3). Additionally, the major residues of the mAb13.2 heavy chain that make Van der Waals contacts with IL-13 are ILE30 (CDR1), SER31 (CDR1), ALA33 (CDR1), TRP47, SER50 (CDR2), SER52 (CDR2), SER53 (CDR2), TYR58 (CDR2), LEU98 (CDR3), ASP99 (CDR3), GLY100 (CDR3), TYR101 (CDR3), TYR102 (CDR3), and PHE103 (CDR3) (based on **FIG. 29** using the linear numbering scheme).

[0295] According to the sequence shown in **FIG. 30** (using the linear numbering scheme), it was determined that the major residues of mAb13.2 light chain that make hydrogen bond contacts with IL-13 are ASN31 (CDR1), TYR32 (CDR1), LYS34 (CDR1), ASN96 (CDR3), and ASP98 (CDR3). The major residues of the mAb13.2 light chain that make Van der Waals contacts with IL-13 are ASN31 (CDR1), TYR32 (CDR1), LYS34 (CDR1), ARG54 (CDR2), ASN96 (CDR3), ASP98 (CDR3), and TRP100 (CDR3) (based on **FIG. 30** using the linear numbering scheme).

[0296] *Example 3.3: Fully humanized mAb13.2 (h13.2v2) retains full binding activity to IL-13*

[0297] The ability of fully humanized mAb13.2 (h13.2v2) to compete with biotinylated mAb13.2 for binding to IL-13-FLAG was determined by ELISA as described in Example 2. The data demonstrated that the chimeric (ch13.2), partially humanized (h13.2v1) and fully humanized versions of mAb13.2 were capable of competing with biotinylated mAb13.2 for binding to FLAG-human IL-13 to similar degrees (**FIG. 19A**). BIACORE analysis also confirmed that IL-13 had rapid binding to and slow dissociation to immobilized h13.2v2 (**FIG. 19B**).

[0298] *Example 3.4: Fully humanized mAb13.2 (h13.2v2) neutralizes IL-13-associated activities in vitro*

[0299] Additionally, the ability of the chimeric (ch13.2), partially humanized (h13.2v1) and fully humanized (h13.2v2) versions of mAb13.2 to inhibit IL-13-mediated cell surface expression of CD23 by human monocytes and reduce IL-13-induced STAT6 phosphorylation in HT-29 cells was determined by flow cytometric analysis, as described in Example 1.3. Briefly, human peripheral blood monocytes were incubated overnight with a suboptimal concentration of recombinant human IL-13 in the presence of increasing concentrations of ch13.2, h13.2v1 or h13.2v2. Monocytes were gated and assayed for CD23 expression as an indication of IL-13 responsiveness. Flow cytometric analysis demonstrated that all three versions of mAb13.2, i.e., ch13.2, h13.2v1, and h13.2v2, were capable of mitigating IL-13-mediated CD23 expression by monocytes in a dose dependent manner (**FIG. 20A**).

[0300] To test for STAT6 phosphorylation, the HT-29 human epithelial cell line was incubated for 30 minutes at 37 °C with a suboptimal dose of recombinant human IL-13 and increasing concentrations of ch13.2, h13.2v1, or h13.2v2, then assayed for phosphorylated STAT6 expression using ALEXA™ Fluor 488-labeled monoclonal antibody to phosphorylated STAT6. Flow cytometric analysis demonstrated that all three versions of mAb13.2, i.e., ch13.2, h13.2v1, and h13.2v2, were capable of mitigating IL-13-mediated STAT6 phosphorylation (**FIG. 20B**).

[0301] Since h13.2v2 was capable of inhibiting recombinant IL-13-associated and native human IL-13-associated activities *in vitro* (**FIG. 21**), it was tested for its ability to inhibit IL-13-associated disorders in animal models. In preparation for testing fully humanized mAb13.2, h13.2v2, in nonhuman primate (NHP) and sheep models of respiratory disease, the antibody's ability to neutralize recombinant IL-13 from cynomolgus monkeys or from sheep was assayed. IL-13 was cloned from cynomolgus monkeys or from sheep. The NHP IL-13 was expressed in *E. coli*, purified and refolded as for recombinant human IL-13. In contrast, the recombinant sheep IL-13 was expressed in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells. The ability of mAb13.2 or h13.2v2 to inhibit one or more activities associated with the recombinant NHP cynomolgus monkey form of IL-13 or the recombinant sheep form of IL-13 was tested *in vitro*. **FIG. 22** demonstrates that h13.2v2 strongly neutralized the ability of cynomolgus monkey NHP IL-13 to induce cell surface expression of CD23 by human monocytes. However, h13.2v2 only weakly neutralized sheep IL-13, as neutralization of sheep IL-13-associated activity required much higher concentrations of antibody **(FIG. 22)**.

[0302] *Example 3.5: Fully humanized mAb13.2 (h13.2v2) neutralizes IL 13 activities in a sheep model of asthma.*

[0303] Despite its relatively low potency in neutralizing the bioactivity of the sheep form of IL-13, h13.2v2 was tested for efficacy in a sheep model of *Ascaris*-induced airway hyperreactivity. Sheep were sensitized to the roundworm parasite, *Ascaris suum*, by natural exposure. When given a lung challenge with the *Ascaris* antigen, the animals undergo bronchoconstriction similar to the response of asthmatic humans to antigen challenge. The response consists of an immediate reaction followed by a late-phase response, beginning 4-5 hours post-challenge. The early phase is thought to be a smooth muscle response, while the late phase is an inflammatory reaction.

[0304] To test the ability of h13.2v2 to reduce *Ascaris*-induced bronchoconstriction, sheep were administered 20 mg/kg, 5 mg/kg, or 2 mg/kg antibody by intravenous (i.v.) infusion. Twenty-four hours post-infusion, the animals were given an intratracheal challenge with *Ascaris suum* antigen. Results indicated that h13.2v2 at

20 mg/kg or 5 mg/kg attenuated the late-phase response to antigen **(FIG. 23)**. h13.2v2 at 2 mg/kg had no significant effect on the antigen response compared to the control, presumably due to the weak neutralization activity of h13.2v2 on sheep IL-13.

[0305] In addition, the ability of h13.2v2 to reduce airway hyperreactivity induced by airway challenge with the cholinergic agonist, carbachol, in sheep was tested. Carbachol elicits bronchoconstriction, measured as a decrease in forced expiratory volume (FEV), and the dose of stimulus required to elicit a given magnitude of response (PC400) is typically lower for asthmatics than for healthy subjects. Sheep remained untreated or were administered 20 mg/kg, 5 mg/kg, or 2 mg/kg of h13.2v2 intravenously 24 hours prior to carbachol-inhalation challenge, and PC400 was determined in the sheep pre- and post-challenge with *Ascaris suum*. The data demonstrates that h13.2v2 at 20 mg/kg or 5 mg/kg prevented the drop in PC400 induced by challenge with *Ascaris suum* **(FIG. 24)**. Similar to results of the antigen response experiment, h13.2v2 at 2 mg/kg had no significant effect on PC400 compared to the control.

[0306] *Example 3.6: Fully humanized mAb13.2 (h13.2v2) neutralizes IL-13 activities in a nonhuman primate model of asthma*

[0307] To test the ability of h13.2v2 to prevent *Ascaris*-induced lung inflammation in nonhuman primates, control cynomolgus monkeys were treated with saline, 8 mg/kg irrelevant human IgG (IVIG), or 2 mg/kg dexamethasone intramuscularly (as a positive control). Test cynomolgus monkeys were administered 10 mg/kg h13.2v2 intravenously. The next day, prechallenged BAL samples were collected from the left lung, and animals were challenged with *Ascaris suum* antigen intratracheally in the right lung. Twenty-four hours post-challenge, BAL samples were collected from the right lung and assayed for cellular infiltrate. Results showed that pretreatment of animals with h13.2v2 prevented airway inflammation induced by the *Ascaris suum* allergen **(FIG. 25)**. In a parallel experiment, IL-5 and eotaxin were induced in BAL following Ascaris challenge. Pretreatment of animals with h13.2v2 reduced the level of induction of both IL-5 and eotaxin.

[0308] Non-human primates sensitized to *Ascaris suum* develop IgE to Ascaris antigen. This IgE binds to FcεRI on circulating basophils, such that *in vitro* challenge of peripheral blood basophils with *Ascaris* antigen induces degranulation and release of histamine. Repeated antigen exposure boosts basophil sensitization, resulting in enhanced histamine release responses. To test the effects of h13.2v2 on this process, cynomolgus monkeys dosed with h13.2v2 or saline or IVIG controls as described were bled at 8 weeks post-*Ascaris* challenge, and levels of total and *Ascaris*-specific IgE in plasma were determined by ELISA. The levels of *Ascaris*-specific IgE were increased at 8 weeks post-challenge in control animals treated with saline or IVIG **(FIG. 31B)**. In contrast, animals treated with h13.2v2 showed a significant reduction in levels of circulating IgE specific for *Ascaris* **(FIG. 31A)**. There were no significant change in total IgE titer for any of the treatment groups.

[0309] To evaluate effects on basophil histamine release, the animals were bled at 24 hours, 8 weeks, and 4 months post-*Ascaris* challenge. Whole blood was challenged with *Ascaris* antigen for 30 minutes at 37 °C, and histamine released into the supernatant was quantitated by ELISA (Beckman Coulter, Fullerton, CA). As shown in **FIG. 32A**, these sensitized animals demonstrated some level of *Ascaris*-induced basophil histamine release even before the segmental antigen challenge. Following challenge, the control animals showed the expected increase in basophil responsiveness. In contrast, the animals treated with h13.2v2 failed to undergo this increase in basophil sensitization, such that at 2-4 months post-challenge, they had a significantly lower *in vitro* histamine release response to *Ascaris* **(FIG. 32B)**. Thus, a single administration of h13.2v2 had long-term disease-modifying activity in this model.

[0310] Example 4 Humanization of mAb13.2 based on various human germline genes

[0311] Example 3 provided a method and result for humanizing mAb13.2 based on the DP-54 and DPK9 germline genes; in this Example, the humanization of mAb13.2 based on other germline genes is briefly detailed.

[0312] Additional humanization strategies were designed based on an analysis of human germline antibody sequences, or a subgroup thereof, that possessed a high degree of homology, i.e., sequence similarity, to the actual amino acid sequence of the murine antibody variable regions. For example, the VH group 3 of V-BASE showed a high degree of sequence similarity to mAb13.2. It was determined that the CDRs of heavy chain variable region of mAb13.2 could be transferred into any one of a subgroup of germline genes within VH group 3, i.e., 3-53 (DP-42), 3-48 (DP-51), 3-09 (DP-31), 3-13 (DP-48), 3-15 (DP-38), 3-20 (DP-32), 3-21 (DP-77), 3-23 (DP-47), 3-30 and 3-30.5 (DP-49), 3-64 (DP-45), 3-66 (DP-86), and 3-73 (YAC-9) (**FIG. 26**). Also shown in **FIG. 26** is the sequence for DP-61, which may also be used to humanize mAb13.2. It was determined that the following common amino acid substitutions could be introduced into mAb13.2 to convert its VH framework into any of the proposed human germlined frameworks: K3Q, K13Q or K13R, K19R, T40A, E42G, R44G, R75K, I77S or I77T, S83N, S87A or S87D, M92V or M92L, and T113L. The individual amino acid substitutions for humanization based on a particular germline gene were also delineated, e.g., humanization based on DP-47 may involve the additional mutations of V5L, A49S, and A74S; humanization based on DP-42 may involve the additional mutations of V12I, A49S, and A74S; humanization based on DP-51 may involve the additional mutation of A49S; humanization based on DP-48 may involve the additional mutations of P41T, D72E, and E88G; humanization based on DP-53 may involve the additional mutations of E46V and A49S; humanization based on DP-32 may involve the additional mutations of L11V, A49S, and Y94H; humanization based on DP-38 may involve the additional mutations of A49G, A74D, R75S, N76K, R86K, and S87T; humanization based on DP-31 may involve the additional mutations of G16R, A49S, and R97K; humanization based on DP-61 may involve the additional mutations of W47Y, A49S, A74S, and T90M; and humanization based on DP-45 may involve the additional mutations of E6Q, A24G, A49S, and T90M. For example, when humanization of mAb13.2 is based on the human germline gene DP-47, which has 79% sequence identity, the following mutations, K3Q, V5L, K13Q, K19R, T40A, E42G, R44G, A49S, A74S, R75K, I77T, S83N, S87A, M92V, and T113L, can be introduced into mAb13.2. Introduction of the common amino acid substitutions alone, or in combination with the individual amino acid substitutions based on a particular human germline gene, into mAb13.2 during humanization should

result in an active antibody. For example, an active antibody, h13.2v3, resulted when humanization of mAb13.2 was based on 3-21 (DP-77), as described below.

[0313] An alternative humanization of mAb13.2 was based on the germline genes DP-77 and B1. The alignment between the predicted amino acid sequence of DP-77, the variable heavy chain amino acid sequence of ch13.2, and the heavy chain amino acid sequence of fully humanized mAb13.2 antibody (h13.2v3) is shown in **FIG. 27**. The alignment between the predicted amino acid sequence of B1, the variable light chain amino acid sequence of ch13.2, and the variable light chain amino acid sequence of h13.2v3 is shown in **FIG. 28.** The predicted amino acid sequences of DP-77 and B1 demonstrated 80.4% amino acid identity with the variable heavy chain of mAb13.2 and 77.5% amino acid identity with the variable light chain of mAb13.2, respectively. Although amino acid differences between DP-77 and the heavy chain of mAb13.2 (and the heavy chain of ch13.2, as well), and between B1 and the light chain of mAb13.2 (and the light chain of ch13.2, as well), were found in both the framework and complementarity determining regions, the differences in the CDRs remained unchanged. In contrast, where an amino acid found in the framework region of the heavy chain mAb13.2 differed from the amino acid in the same position in DP-77, the amino acid of the variable heavy region of mAb13.2 was changed to the amino acid in DP-77. Similarly, where an amino acid found in the framework region of the light chain of mAb13.2 differed from the amino acid in the same position in B1, the amino acid in the variable light chain of mAb13.2 was changed to the amino acid in B1. Two rounds of PCR mutagenesis, as described above, introduced the changes. After the first round of changes in the heavy and light chains, ELISA was performed, as described in Example 2, to ensure that the changes did not affect the ability of the antibody to bind to IL-13. After the second round of changes, the amino acid sequences of the framework regions within the heavy and light chains of mAb13.2 were identical to the amino acid sequences of the framework regions of DP-77 and B1, respectively.

[0314] The humanized mAb13.2 antibody, h13.2v3, was also capable of inhibiting IL-13-associated activities *in vitro*. h13.2v3 was tested by ELISA and the TF1 proliferation assay to determine its ability to bind and inhibit one or more IL-13-associated activities. It was demonstrated that h13.2v3 could similarly compete with mAb13.2 for binding to IL-13 when compared to ch13.2 and h13.2v1 . Additionally,

h13.2v3 was capable of inhibiting TF1 proliferation to the same degree as mAb13.2 and h13.2v1.

[0315] Example 5: Effector activity mediated by the wild-type Fc revertant of h13.2v2

[0316] The cell signaling form of the IL-13 receptor, which includes the IL-13Rα1 and IL-4Rα polypeptides, is found on the surface of cell types that respond to the cytokine. IL-13Rα2 is not typically expressed on the surface of IL-13-responsive cells, but has been reported on tumors of the brain, head, and neck (Kawakami et al. (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:6381-8; Mintz et al. (2002) *Neoplasia* 4:388-99; Liu et al. (2000) *Cancer Immunol. Immunother.* 49:319-24). IL-13Rα2 expression may also be induced on IFNγ-treated primary human monocytes (Daines et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:10387-93), or TNFα- or IL-13-treated primary human fibroblasts (Yoshikawa et al. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312:1248-55). This receptor is not competent to mediate signaling responses to IL-13 (Kawakami et al. (2001) *Blood* 97:2673-9), but instead appears to act as a decoy receptor, competing for productive IL-13 interactions with IL-13Rα1 (Feng et al. (1998) *Lab. Invest.* 78:591-602). IL-13Rα2 has a high affinity for IL-13 (Andrews et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:46073-8), and appears to interact primarily with the C-terminal region of the cytokine (Madhankumar et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:43194-205), which is not predicted to include the h13.2v2 binding site. Therefore, it was examined whether h13.2v2 could interact with IL-13 captured by IL-13Rα2 on the cell surface. A375 is a human melanoma cell line that expresses IL-13Rα2. Recombinant human IL-13 (3 ng/ml) was contacted to these cells at 4 °C for 20 minutes. The cells were washed, and tested for binding of biotinylated h13.2v2. Results showed a dose-dependent binding of the antibody in to these cells in the presence of IL-13, indicating that h13.2v2 bound to IL-13 that was bound to its receptor **(FIG. 33)**.

[0317] In order to determine whether h13.2v2 could promote Fc-dependent effector function, the mutated Fc residues of h13.2v2 (L234A / G237A; residues 116 and 119 of SEQ ID NO:17) were reverted to wild-type, and the antibodies expressing wild-type or mutated Fc were expressed and purified. Effector function was tested in an antibody-dependent cellular cytotoxicity assay (ADCC) using IL-13-loaded A375

cells as targets. A375 target cells were labeled with Chromium-51 and incubated with 10 ng/ml recombinant human IL-13. Human PBMC enriched for natural killer (NK) cells by treatment with ROSETTESEP® Human NK Enrichment Cocktail (StemCell Technologies, Seattle, WA) were used as effectors. Effector and target cells were incubated together in the presence of increasing concentrations of h13.2v2 or its wild-type Fc revertant for 5 hours at 37 °C. Cytotoxicity was measured as the release of Chromium-51 into the supernatant, and expressed as a percentage of the maximum release, determined by lysing the A375 target cells with TRITON® X-100.

[0318] Results showed that the wild-type Fc revertant was able to mediate ADCC of the IL-13-loaded A375 target cells, whereas h13.2v2 was not **(FIG. 34A)**. No cytotoxicity was observed in the absence of IL-13 **(FIG. 34B)**. Similar results were seen using effector cells from three different donors. These results indicate that, due to the presence of the L234A and G237A Fc mutations, h13.2v2 is unable to mediate ADCC, even under optimal in vitro conditions.

[0319] Taken together, these observations indicate that h13.2v2 can bind to cells expressing IL-13Rα2 **(FIG. 33)**, but not to those expressing IL-13Rα1. Experiments were done to test whether the h13.2v2 wild-type revertant could mediate ADCC of the IL-13Rα1-expressing HT-29 cells, even in the absence of detectable binding. HT-29 cells were used as targets in an ADCC assay performed as described above. Results showed that under conditions leading to cytolysis of the IL-13Rα2-expressing A375 cells, the IL-13Rα1-expressing HT-29 cells were not lysed **(FIG. 35)**. These results also demonstrate that, whereas antibodies that include the L234A and G237A Fc mutations do not induce ADCC, antibodies with wild-type Fc effector function can be useful for the treatment of certain cancers that express IL-13Rα2.

[0320] Example 6: Expression of humanized 13.2 antibody in COS cells

[0321] In order to evaluate the expression of humanized anti-IL13 antibodies in the mammalian recombinant system the variable regions of mouse 13.2 (SEQ ID NO:9 and SEQ ID NO:13), hu13.2 V1 (SEQ ID NO:11 and SEQ ID NO:15), and hu13.2 V2 (SEQ ID NO:12 and SEQ ID NO:16) were subcloned into a pED6 expression vector containing human kappa and IgG1mut constant regions. Monkey kidney COS-1 cells

were grown in DME media (Gibco) containing 10% of heat-inactivated fetal bovine serum, 1 mM of glutamine and 0.1 mg/ml of Penicillin/ Streptomycin. Transfection of COS cells was performed using TRANSITIT®-LT1 Transfection reagent (Mirus Bio Corp., Madison, WI) according to the protocol suggested by 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 the secretion of the antibody and its accumulation in the conditioned media. The expression of 13.2 antibody was quantified by total human IgG ELISA using purified human IgG1/kappa antibody as a standard. The chimeric 13.2 antibody as well as both humanized versions expressed well in COS cells.

Table 5. Transient expression of humanized 13.2 antibodies in COS cells.

N	Construct	Expression μg /ml, 48 hours
1	Chimeric 13.2	14.5
2	Partially humanized 13.2(V1)	13.2
3	Fully humanized 13.2.2 (V2)	14.9

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An antibody, or antigen-binding fragment thereof, that binds to IL-13 with a K_D of less than 10^{-7} M and has one or more of the following properties:

(a) the heavy chain immunoglobulin variable region comprises a heavy chain CDR3 of mAb13.2 (SEQ ID NO:24), or a heavy chain CDR3 that differs by fewer than 3 amino acid substitutions from a corresponding heavy chain CDR3 of mAb13.2;

(b) the light chain immunoglobulin variable region comprises a light chain CDR1 of mAb13.2 (SEQ ID NO:19), or a light chain CDR1 that differs by fewer than 3 amino acid substitutions from a corresponding light chain CDR1 of mAb13.2;

(c) the heavy chain immunoglobulin variable region comprises a sequence encoded by a nucleic acid that hybridizes under high stringency conditions to the complement of a nucleic acid encoding a heavy chain variable domain of h13.2 (SEQ ID NO:15, 16, or 36);

(d) the light chain immunoglobulin variable region 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 h13.2 (SEQ ID NO:11, 12, or 35);

(e) the heavy chain immunoglobulin variable region is at least 90% identical a heavy chain variable domain of h13.2 (SEQ ID NO:15, 16, or 36);

(f) the light chain immunoglobulin variable region is at least 90% identical a light chain variable domain of h13.2 (SEQ ID NO:11, 12, or 35);

(g) the antibody, or antigen-binding fragment thereof, competes with mAb13.2 for binding to human IL-13;

(h) the antibody, or antigen-binding fragment thereof, contacts one or more amino acid residues from IL-13 selected from the group consisting of residues 68, 72, 88, 91, 92, 93, and 105 of SEQ ID NO:31;

(i) the heavy chain variable region has the same canonical structure as mAb13.2;

(j) the light chain variable region has the same canonical structure as mAb13.2;

(k) the heavy chain variable region and/or the light chain variable region has FR1, FR2, and FR3 framework regions from VH segments 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;

(l) confers a post-injection protective effect against exposure to Ascaris antigen in a sheep model at least 6 weeks after injection.

2. The antibody, or antigen-binding fragment thereof, of claim 1 that is purified.

3. The antibody, or antigen-binding fragment thereof, of claim 1 that is a recombinant, full length IgG.

4. The antibody, or antigen-binding fragment thereof, of claim 1 that is a Fab or scFv.

5. The antibody, or antigen-binding fragment thereof, of claim 1 that comprises framework regions that are at least 90% identical to human germline framework regions.

6. The antibody, or antigen-binding fragment thereof, of claim 1 that comprises human framework regions, a human Fc region, or both.

7. The antibody, or antigen-binding fragment thereof, of claim 1, wherein the heavy chain variable region has the same canonical structure as mAb13.2 (as in (i)), and the heavy chain variable domain comprises at least four IL-13 contacting amino acid residues of mAb13.

8. The antibody, or antigen-binding fragment thereof, of claim 1 that binds to human IL-13 with a K_D of between 90 and 120 pM.

9. The antibody, or antigen-binding fragment thereof, of claim 1 that binds to human IL-13 with a k_{off} of less than 1×10^{-4} s^{-1}.

10. The antibody, or antigen-binding fragment thereof, of claim 1 that binds to human IL-13 with a k_{on} of between 5×10^{4} and 8×10^{5} $M^{-1}s^{-1}$.

11. The antibody, or antigen-binding fragment thereof, of claim 1 that reduces the ability of IL-13 to bind to IL-4Rα.

12. The antibody, or antigen-binding fragment thereof, of claim 1 that binds to IL-13 that is in an in vitro complex with IL-13Rα1.

13. An isolated, recombinant IgG antibody that comprises two immunoglobulin chains: a light chain that include SEQ ID NO:9, 10, 11, 12, or 35 and a heavy chain that includes SEQ ID NO:13, 14, 15, 16, or 36.

14. The isolated, recombinant IgG antibody of claim 13 wherein the heavy chain further includes SEQ ID NO:17 and the light chain further includes SEQ ID NO:18.

15. An antibody, or antigen-binding fragment thereof, that has one or more of the following properties:

(a) it specifically binds to an epitope comprising residues 81-93 or 114-132 of human IL-13 (SEQ ID NO:31), or a conservatively substituted form thereof;

(b) it specifically binds to an epitope of human IL-13 comprising one or more of the following amino acid residues: Glutamate at position 49, Asparagine at position 53, Glycine at position 69, Proline at position 72, Histidine at position 73, Lysine at position 74, and Arginine at position 86 of SEQ ID NO:32, or a conservative amino acid substitution thereof;

(c) it binds to a complex of IL-13 and IL13Rα1;

(d) it interferes with a binding interaction between IL-13 and IL-4Rα;

(e) it interferes with a binding interaction between IL-13/IL-13Rα1 and IL-4Rα; and

(f) it binds specifically to human IL-13 and competitively inhibits the binding of a second antibody to said human , wherein said second antibody is chosen from mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, or h13.2v3.

16. The antibody, or antigen-binding fragment thereof, of claim 15 having a constant region mutated to decrease one or more of: Fc receptor binding, antibody glycosylation, the number of cysteine residues, effector cell function, or complement function.

17. The antibody, or antigen-binding fragment thereof, of claim 15, further comprising a human IgG1 constant region mutated at one or more residues 116 and 119 of SEQ ID NO:17.

18. The antibody, or antigen-binding fragment thereof, of claim 15, further comprising a human kappa light chain.

19. The antibody, or antigen-binding fragment thereof, of claim 15, further comprising at least one complementarity determining region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO:19, the amino acid sequence of SEQ ID NO:20, the amino acid sequence of SEQ ID NO:21, the amino acid sequence of SEQ ID NO:22, the amino acid sequence of SEQ ID NO:23, the amino acid sequence of SEQ ID NO:24.

20. The antibody, or antigen-binding fragment thereof, of claim 15, wherein the fragment is an scFv, Fab, or a $F(ab')_2$ fragment.

21. The antibody, or antigen-binding fragment thereof, of claim 15, further comprising a light chain comprising a human kappa constant region, or an active fragment thereof, and a heavy chain comprising a human IgG constant region, or an active fragment thereof.

22. The antibody, or antigen-binding fragment thereof, of claim 21, wherein the human kappa constant region of said light chain comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:18, or an active fragment thereof.

23. The antibody, or antigen-binding fragment thereof, of claim 21, wherein the human IgG constant region of said heavy chain is mutated to reduce FcR and complement binding.

24. The antibody, or antigen-binding fragment thereof, of claim 23, wherein the mutated human IgG constant region of said heavy chain comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:17, or an active fragment thereof.

25. A pharmaceutical composition comprising the antibody, or antigen-binding fragment thereof, of claim 1 or 15 and a pharmaceutically acceptable carrier.

26. The pharmaceutical composition of claim 25 that is adapted for subcutaneous, inhalatory, or topical administration.

27. A nucleic acid that comprises a sequence that:

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

(a) comprises a heavy CDR3 of mAb13.2 (SEQ ID NO:24), or a CDR3 that differs by fewer than 3 amino acid substitutions from a corresponding CDR3 of mAb13.2; or

(b) is at least 90% identical to a heavy chain variable domain of h13.2 (SEQ ID NO: 15, 16, or 36); or

(ii) hybridizes under high stringency conditions to the complement of a nucleic acid encoding a heavy chain variable domain of h13.2 (SEQ ID NO: 15, 16, or 36).

28. A nucleic acid that comprises a sequence that:

(i) encodes a polypeptide that comprises a light chain immunoglobulin variable region that:

(a) comprises a light chain CDR1 of mAb13.2 (SEQ ID NO:19), or a CDR1 that differs by fewer than 3 amino acid substitutions from a corresponding CDR1 of mAb13.2; or

(b) is at least 90% identical to a light chain variable domain of h13.2 (SEQ ID NO:11, 12, or 35); or

(ii) hybridizes under high stringency conditions to the complement of a nucleic acid encoding a heavy chain variable domain of h13.2 (SEQ ID NO:11, 12, or 35).

29. A host cell comprising a nucleic acid sequence that encodes the antibody, or antigen-binding fragment thereof, of claim 1 or 15.

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

providing a host cell a nucleic acid sequence that encodes the antibody, or antigen-binding fragment thereof, and

maintaining the cell under conditions in which the antibody, or antigen-binding fragment thereof, is expressed.

31. The method of claim 30, further comprising isolating the protein from the host cell or media in which the host cell is maintained.

32. The method of claim 31, further comprising formulating the isolated protein as a pharmaceutical composition.

33. A method of treating an IL-13-associated disorder, the method comprising:

administering, to a subject having or at risk for the disorder, an effective amount of the antibody, or antigen-binding fragment thereof, of claim 1.

34. The method of claim 33, wherein the IL-13 associated disorder is selected from the group consisting of: asthmatic disorders, atopic disorders, chronic obstructive 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.

35. The method of claim 33, wherein the disorder is an asthmatic disorder or allergic rhinitis.

36. The method of claim 33, wherein the disorder is inflammatory bowel disease.

37. The method of claim 33, wherein the disorder is chronic obstructive pulmonary disease (COPD).

38. The method of claim 33, wherein the disorder is an atopic disorder.

39. The method of claim 33, wherein the protein is administered subcutaneously, by inhalation, or topically.

40. A method of treating an IL-13-associated disorder, comprising administering to a subject an antibody that binds to IL-13, wherein the antibody has one or more of the following properties:

(i) confers a post-injection protective effect against exposure to Ascaris antigen in a sheep model at least 6 weeks after injection, or

(ii) prevents binding of IL-13 to IL-4Rα, but does not prevent binding of IL-13 to IL-13Rα1.

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

(i) contacting the sample with an anti-IL-13 antibody or fragment thereof; and

(ii) detecting formation of a complex between the anti-IL-13 antibody or fragment thereof and the sample, wherein formation of the complex in the sample is indicative of the presence of IL-13 in the sample.

42. The method of claim 41, wherein the sample is from a subject.

43. 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 or 15, wherein the antibody binds to IL-13 and interferes with the formation of a functional IL-13 signaling complex.

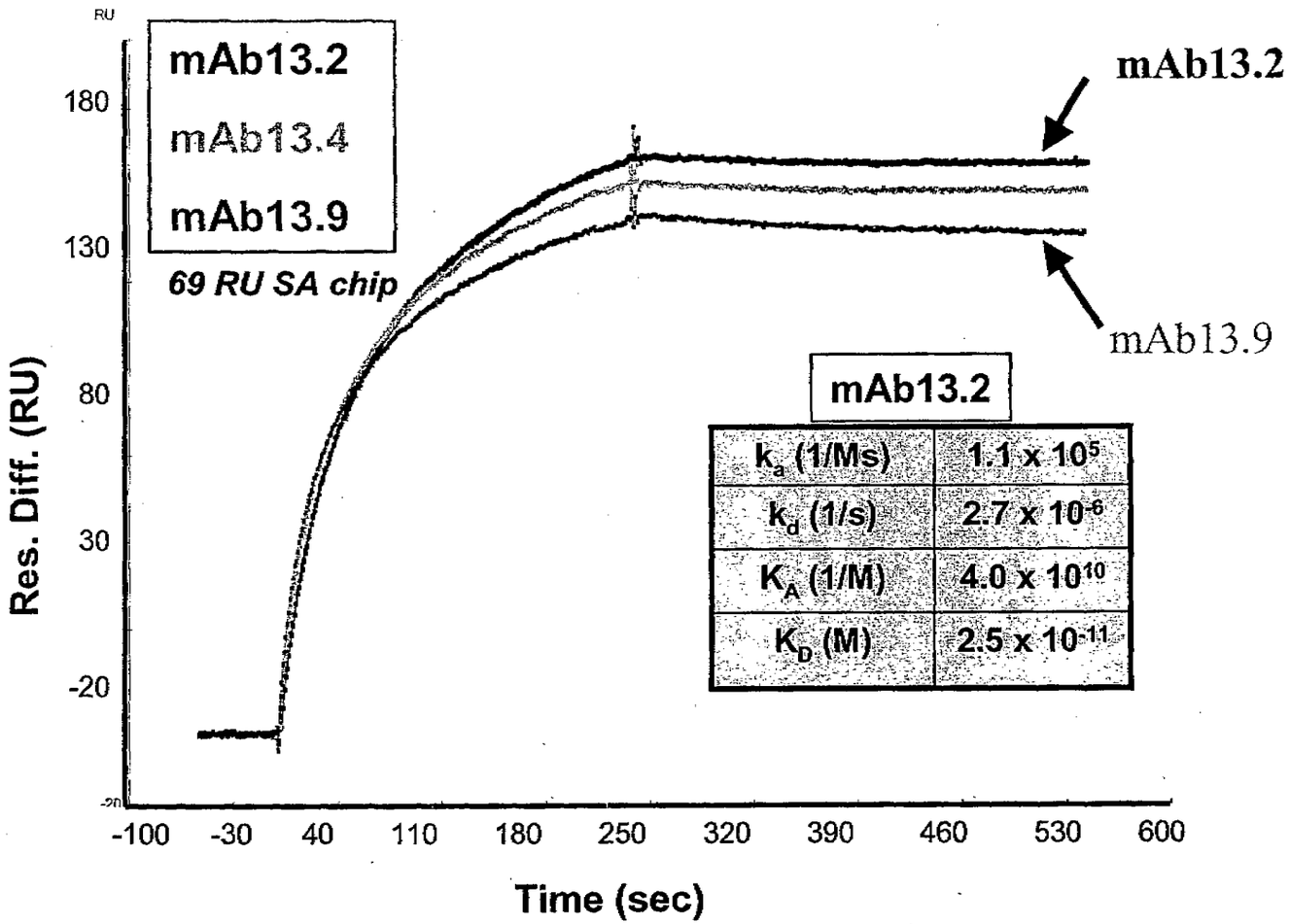
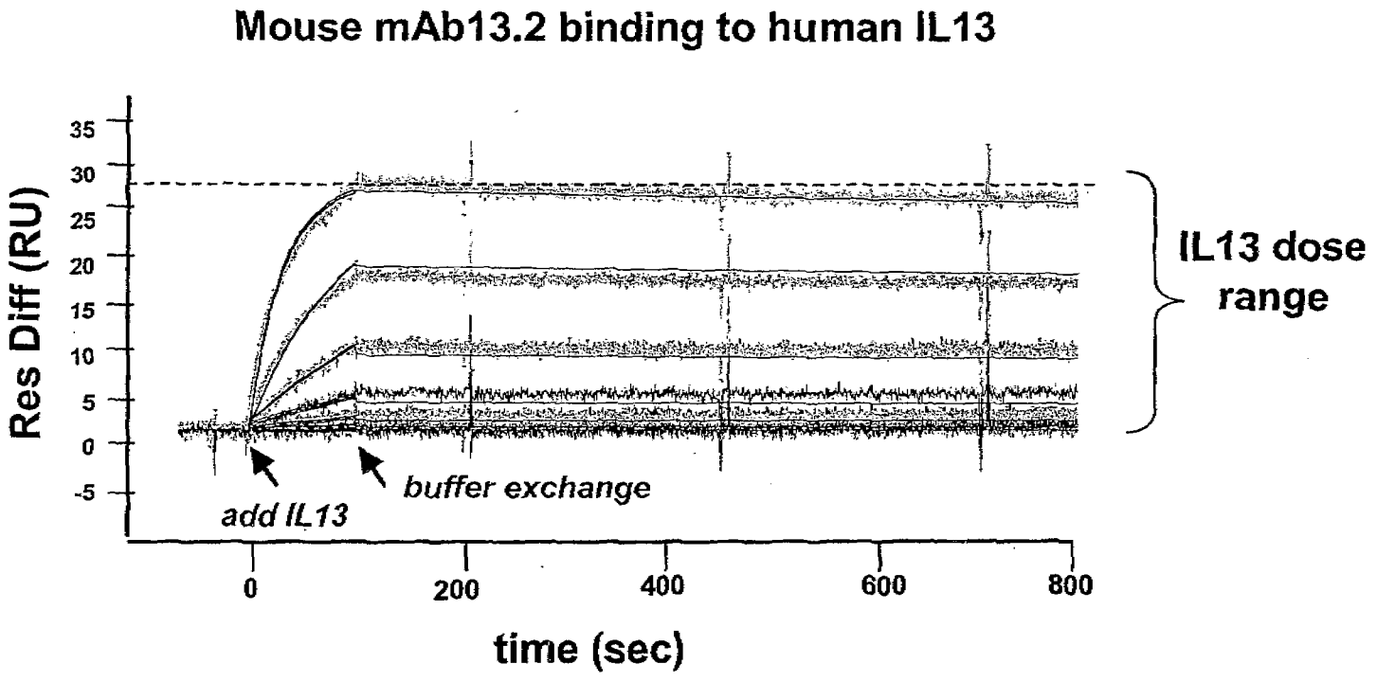


Figure 1

WO 2005/123126 1/37 PCT/US2005/020160



K_A (1/M)	K_D (M)
2.1×10^9	4.7×10^{-10}

Figure 2

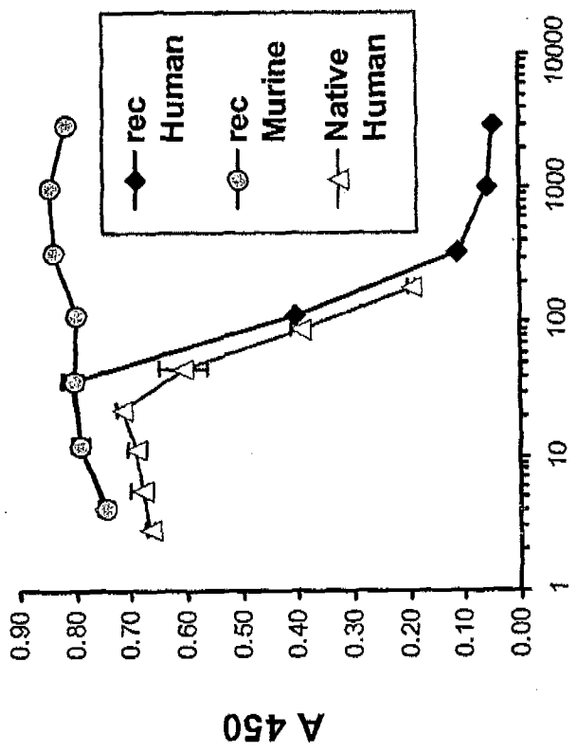

rec Human
rec Murine
Native Human
A 450
0.90
0.80
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
1
10
100
1000
10000
IL13 (ng/ml)

Figure 3

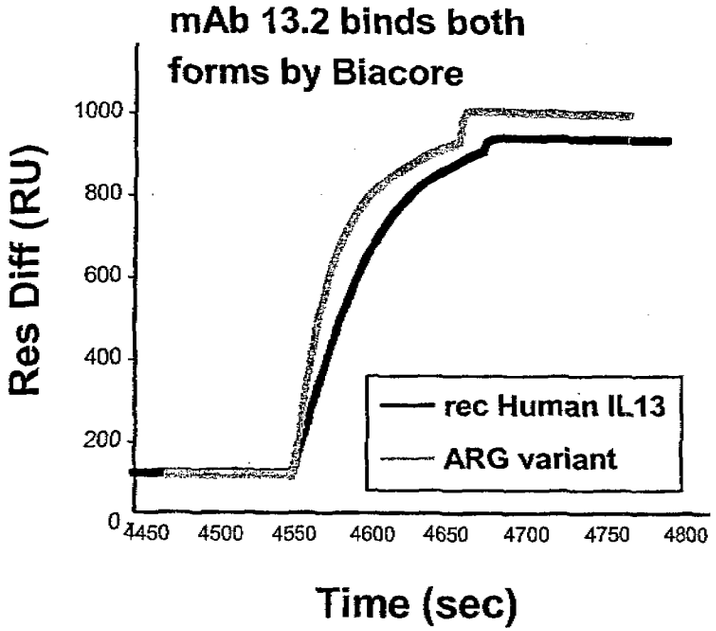


Figure 4A

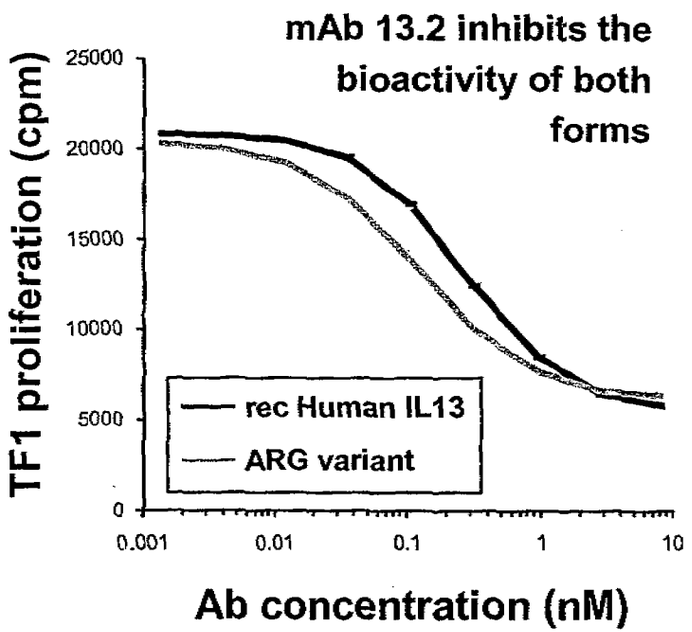


Figure 4B

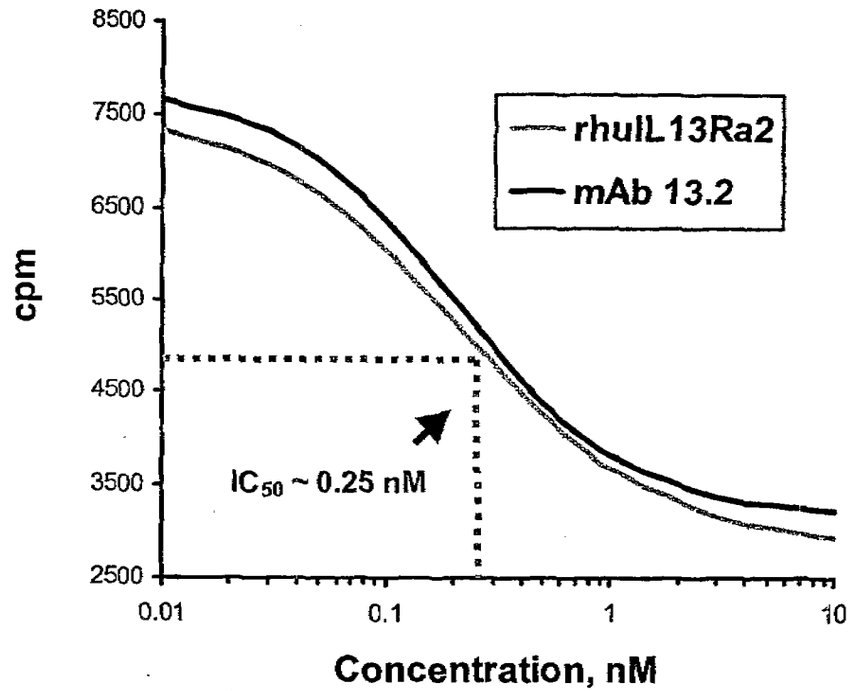

8500
7500
6500
5500
4500
3500
2500
cpm
rhuIL13Ra2
mAb 13.2
IC50 ~ 0.25 nM
0.01
0.1
1
10
Concentration, nM

Figure 5

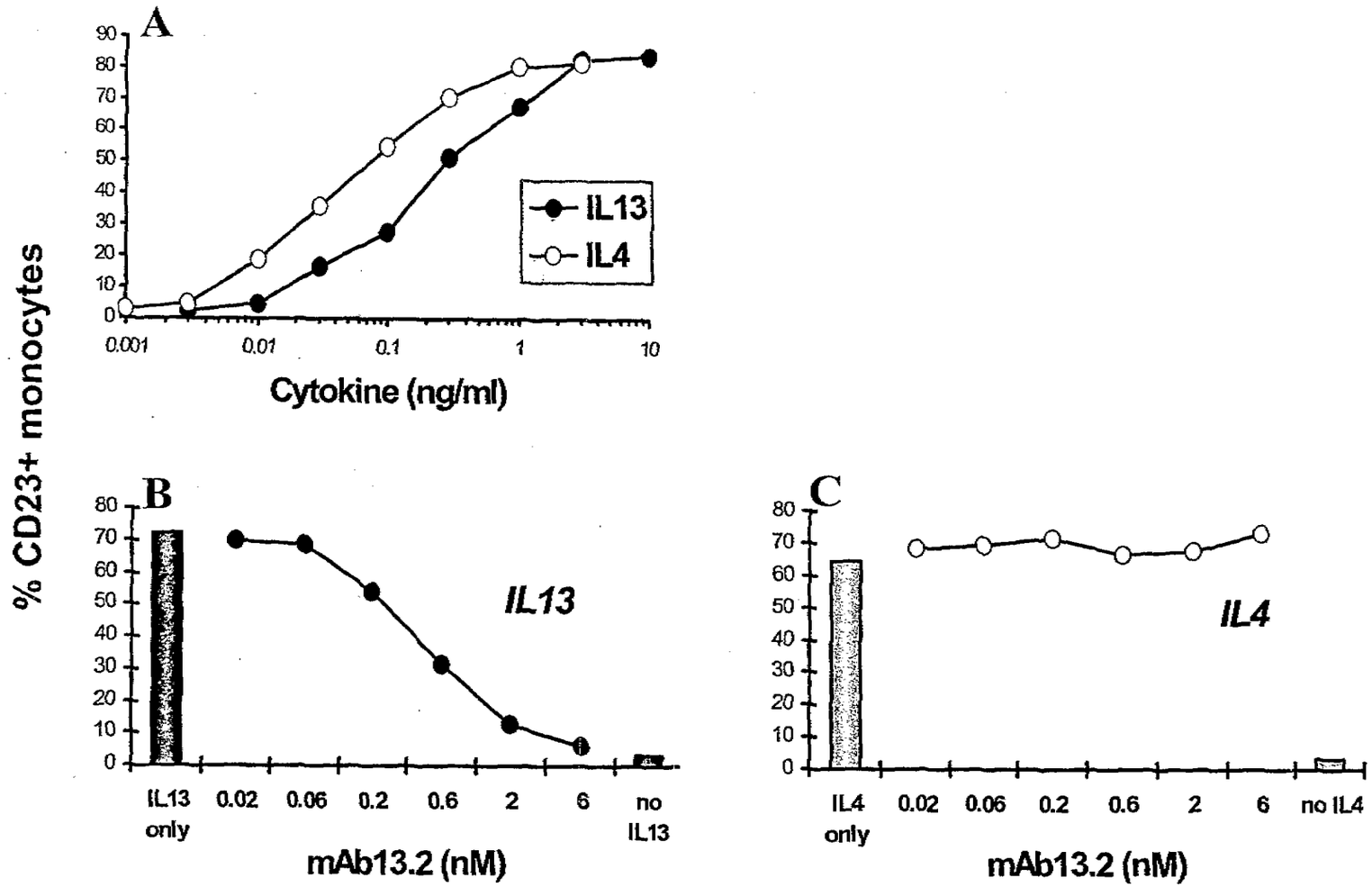

A
% CD23+ monocytes
Cytokine (ng/ml)
IL13
IL4
B
IL13
mAb13.2 (nM)
IL13 only
no IL13
C
IL4
mAb13.2 (nM)
IL4 only
no IL4

Figure 6

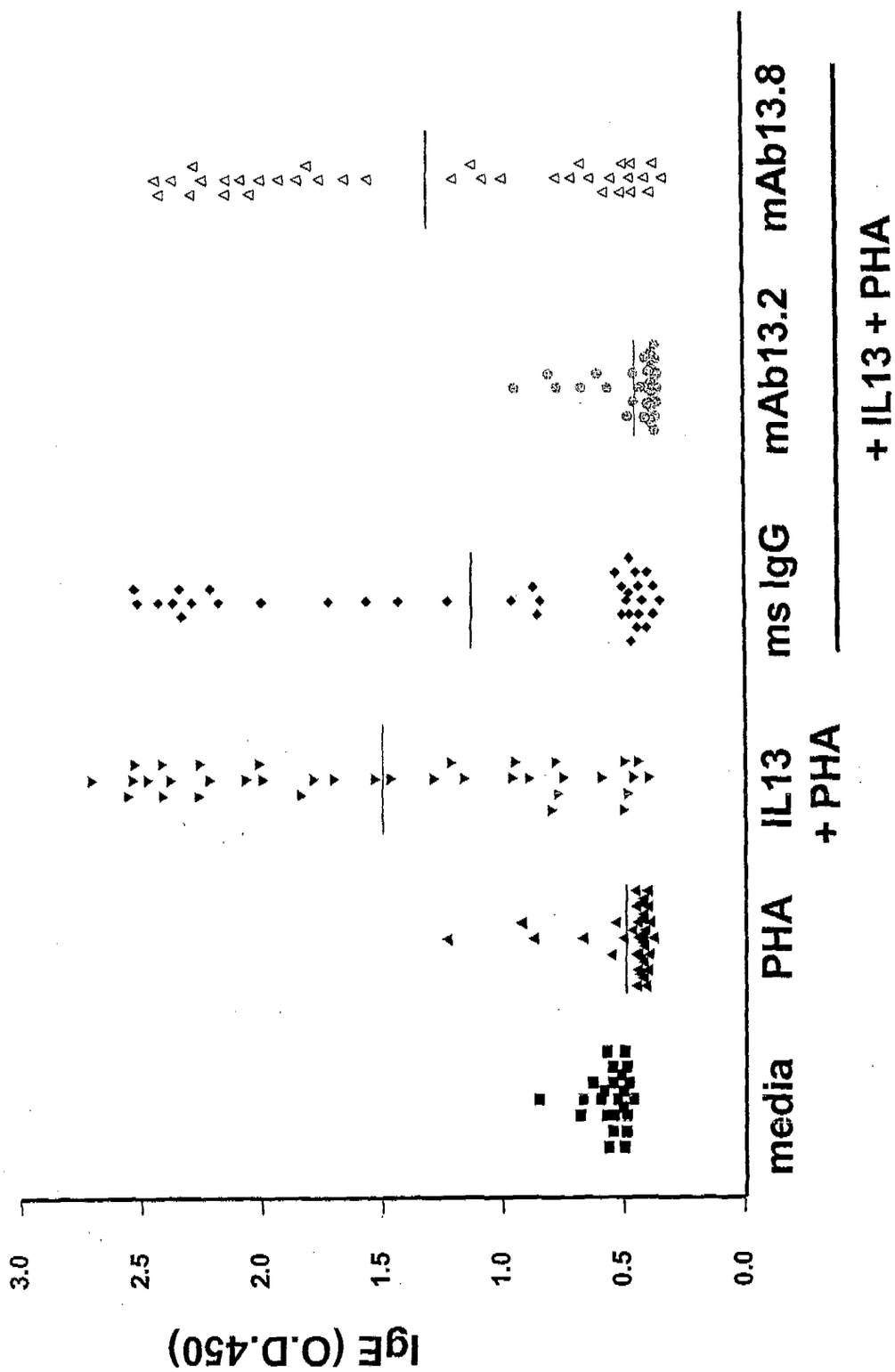

IgE (O.D.450)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
media
PHA
IL13 + PHA
ms IgG
mAb13.2
mAb13.8
+ IL13 + PHA

Figure 7

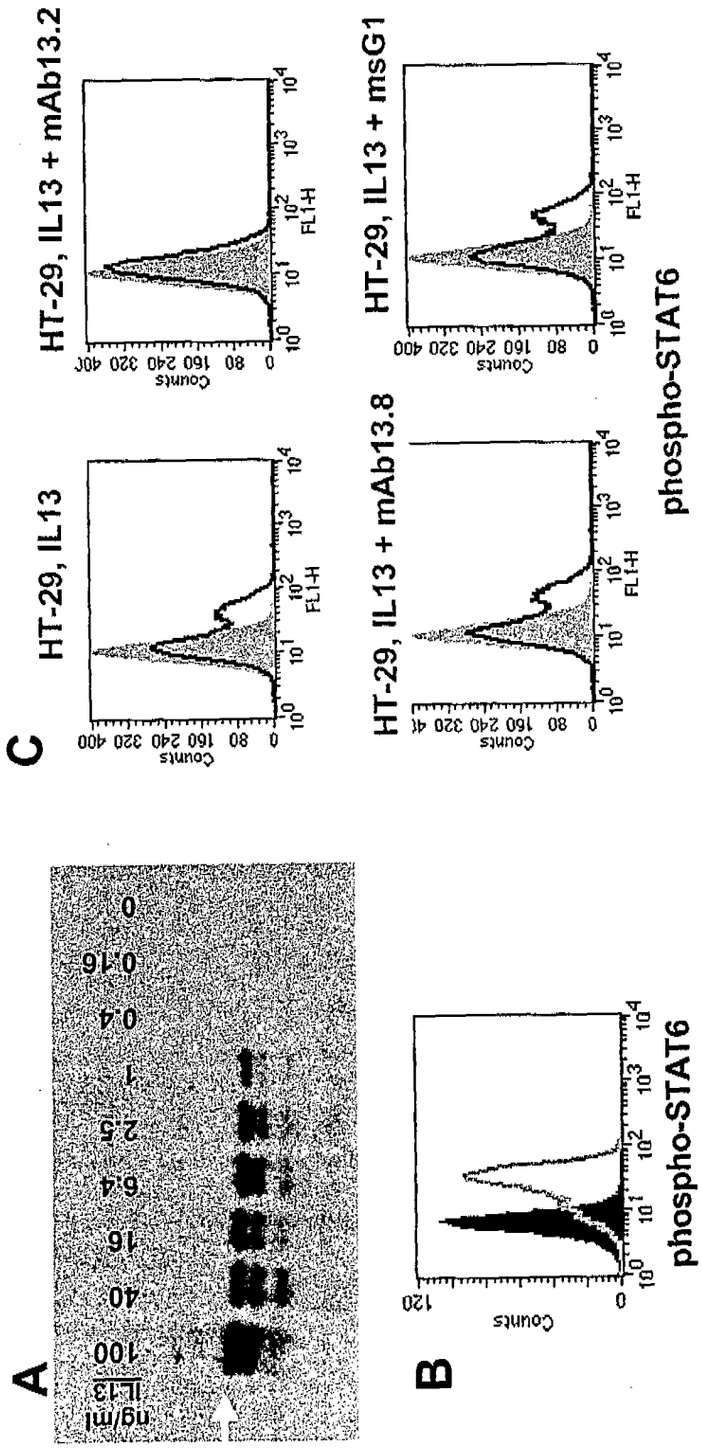

A
ng/ml IL-13
100
40
16
6.4
2.5
1
0.4
0.16
0
B
phospho-STAT6
Counts
120
0
C
HT-29, IL13
HT-29, IL13 + mAb13.8
HT-29, IL13 + msG1
HT-29, IL13 + mAb13.2
phospho-STAT6
Counts
FL1-H
0 80 160 240 320 400

Figure 1

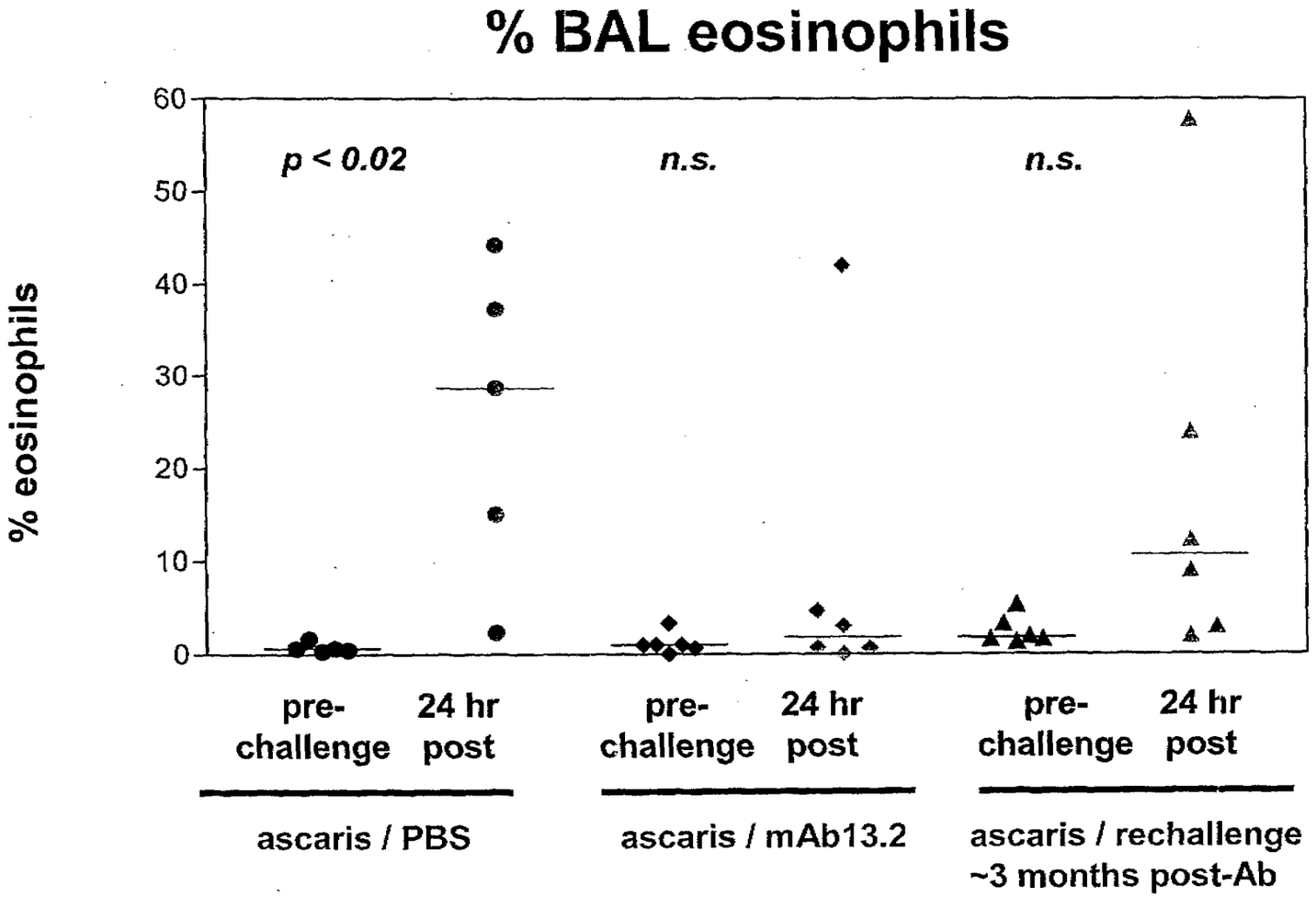

% BAL eosinophils
% eosinophils
60
50
40
30
20
10
0
p < 0.02
n.s.
n.s.
pre-challenge
24 hr post
pre-challenge
24 hr post
pre-challenge
24 hr post
ascaris / PBS
ascaris / mAb13.2
ascaris / rechallenge ~3 months post-Ab

Figure 9



Figure 10

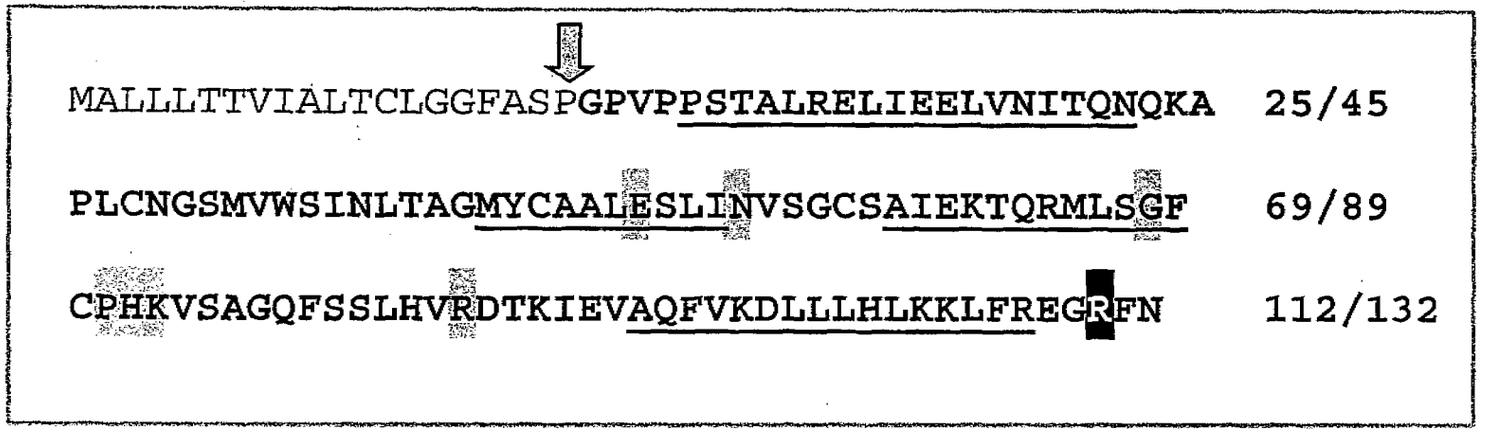

MALLLTTVIALTCLGGFASPGPVPPSTALRELIEELVNITQNQKA 25/45
PLCNGSMVWSINLTAGMYCAALESLINVSGCSAIEKTQRMLSGF 69/89
CPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLLHLKKLFREGRFN 112/132
Major Ab-contact sites from crystal structure
ARG variant (R130Q)
alpha helices

Figure 11

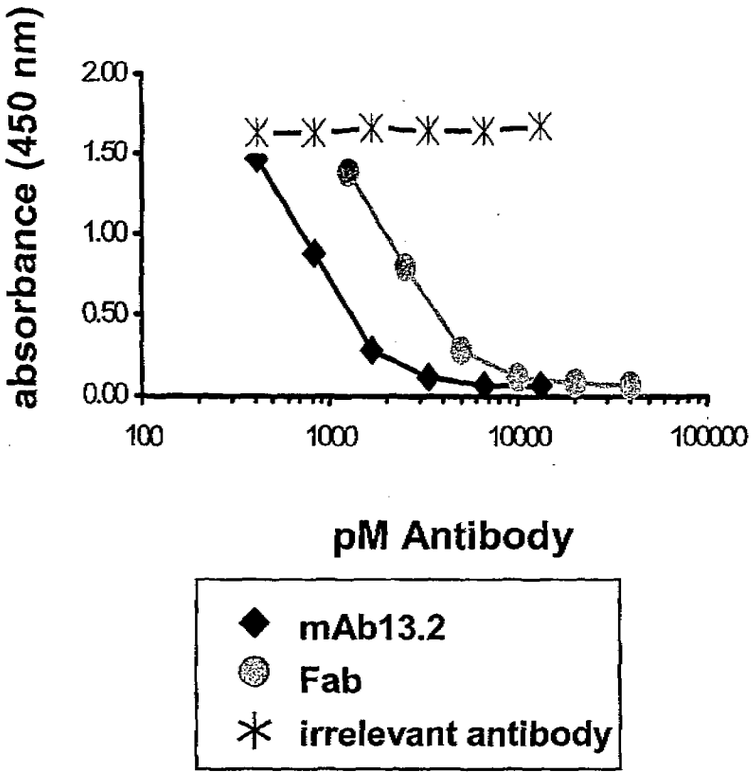


Figure 12A

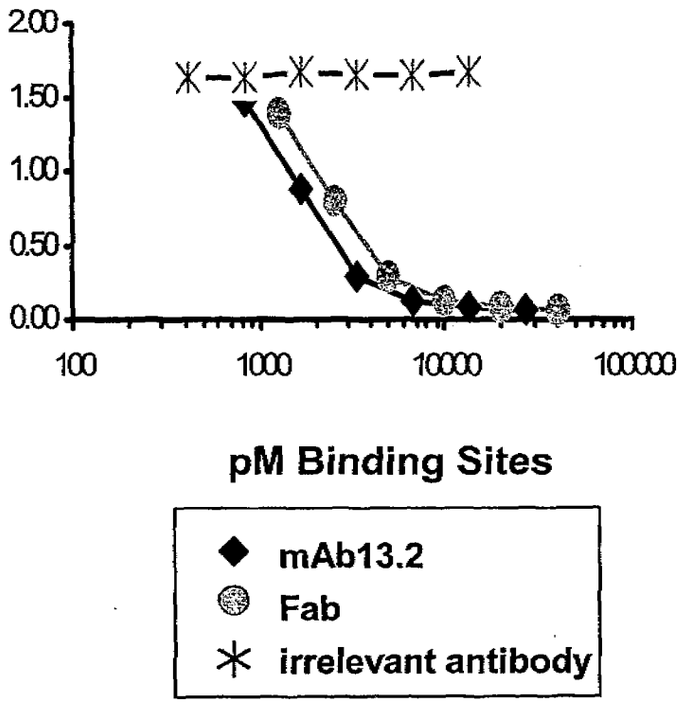


Figure 12B

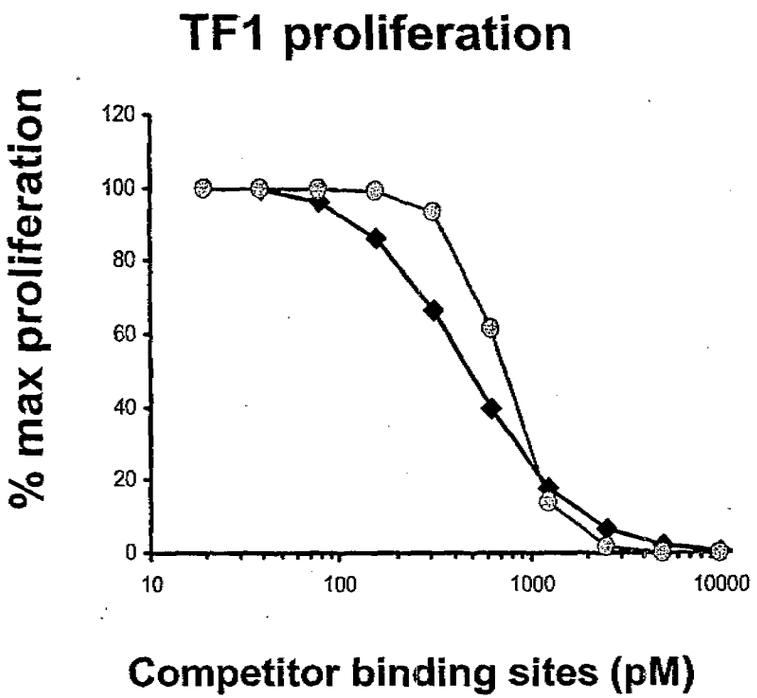


Figure 13A

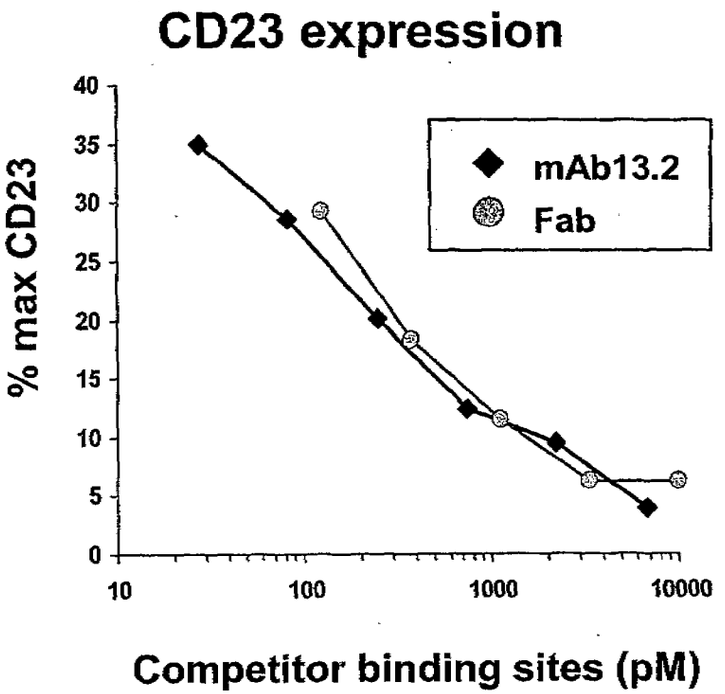


Figure 13B

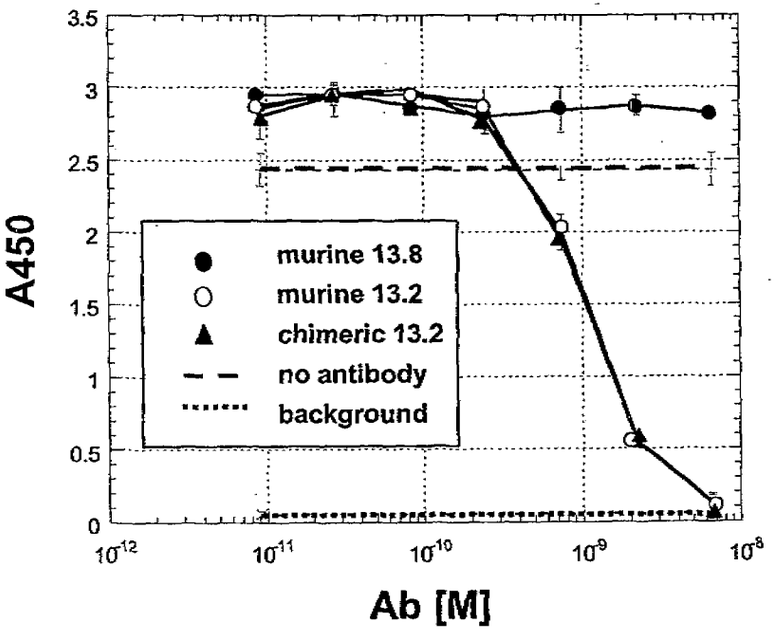


Figure 14A

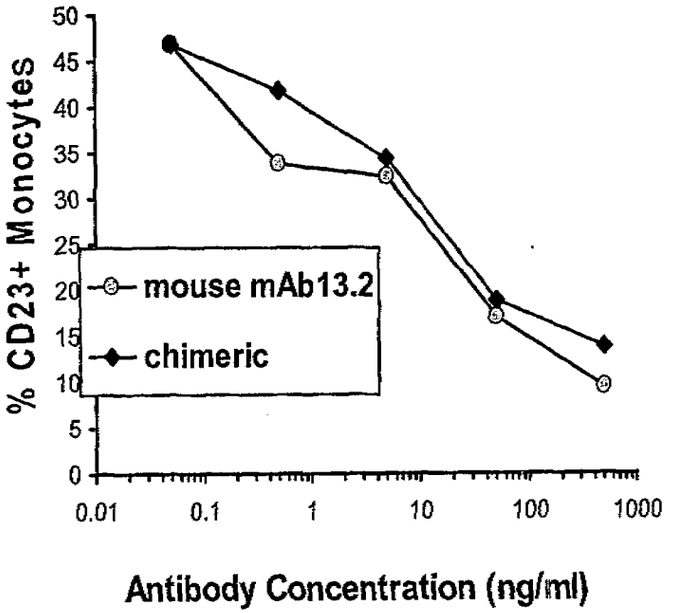


Figure 14B

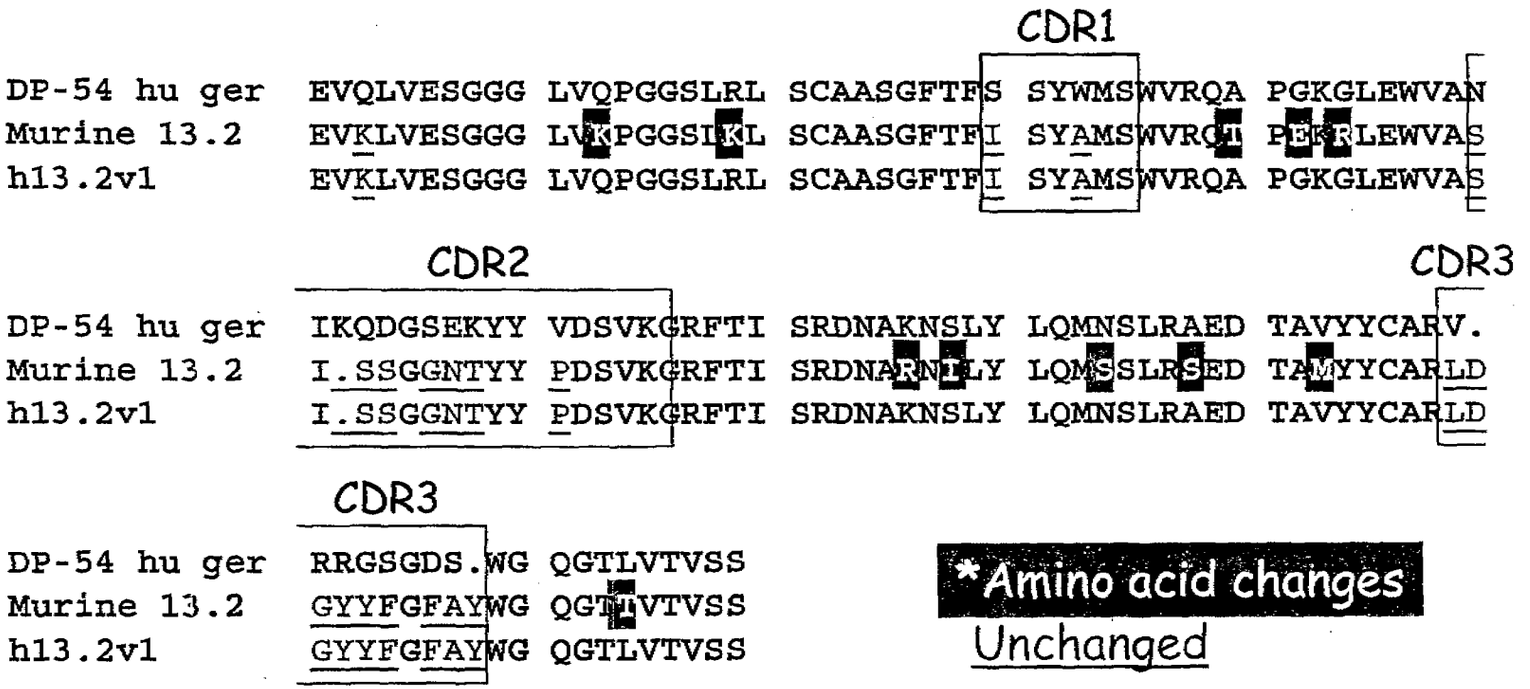

CDR1
DP-54 hu ger EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMSWVRQA PGKGLEWVAN
Murine 13.2 EVKLVESGGG LVKPGGSIKL SCAASGFTFI SYAMSWVRQT PEKRLEWVAS
h13.2v1 EVKLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFI SYAMSWVRQA PGKGLEWVAS
CDR2
CDR3
DP-54 hu ger IKQDGSEKYY VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARV.
Murine 13.2 I.SSGGNTYY PDSVKGRFTI SRDNARNILY LQMSSLRSED TAMYYCARLD
h13.2v1 I.SSGGNTYY PDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARLD
CDR3
DP-54 hu ger RRGSGDS.WG QGTLVTVSS
Murine 13.2 GYYFGFAYWG QGTLVTVSS
h13.2v1 GYYFGFAYWG QGTLVTVSS
*Amino acid changes
Unchanged

Figure 15

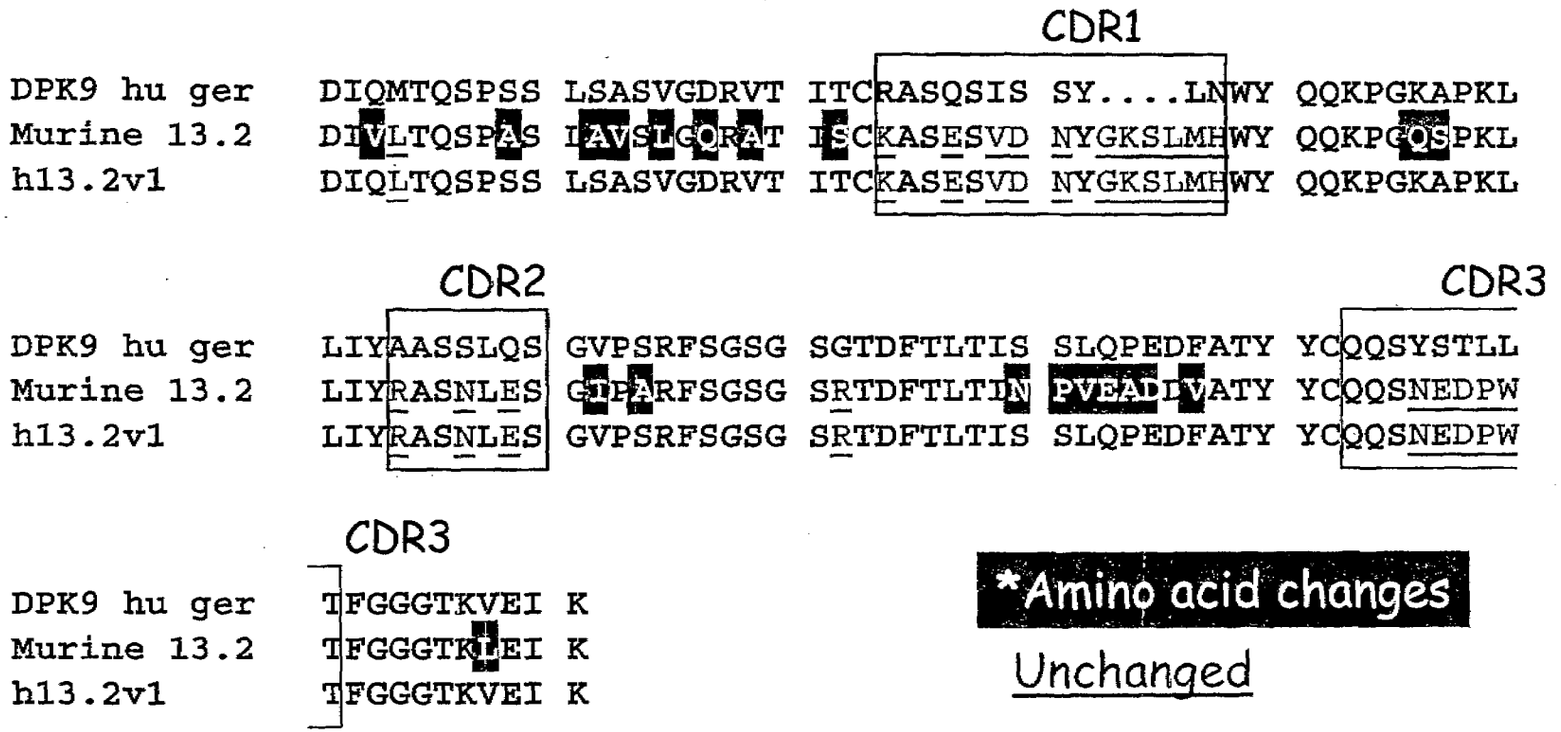

CDR1
DPK9 hu ger DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIS SY....LNWY QQKPGKAPKL
Murine 13.2 DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASESVD NYGKSLMHWY QQKPGQSPKL
h13.2v1 DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASESVD NYGKSLMHWY QQKPGKAPKL
CDR2
CDR3
DPK9 hu ger LIYAASSLQS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSYSTLL
Murine 13.2 LIYRASNLES GIPARFSGSG SRTDFTLTIN PVEADVATY YCQQSNEDPW
h13.2v1 LIYRASNLES GVPSRFSGSG SRTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSNEDPW
CDR3
DPK9 hu ger TFGGGTKVEI K
Murine 13.2 TFGGGTKLEI K
h13.2v1 TFGGGTKVEI K
*Amino acid changes
Unchanged

Figure 16

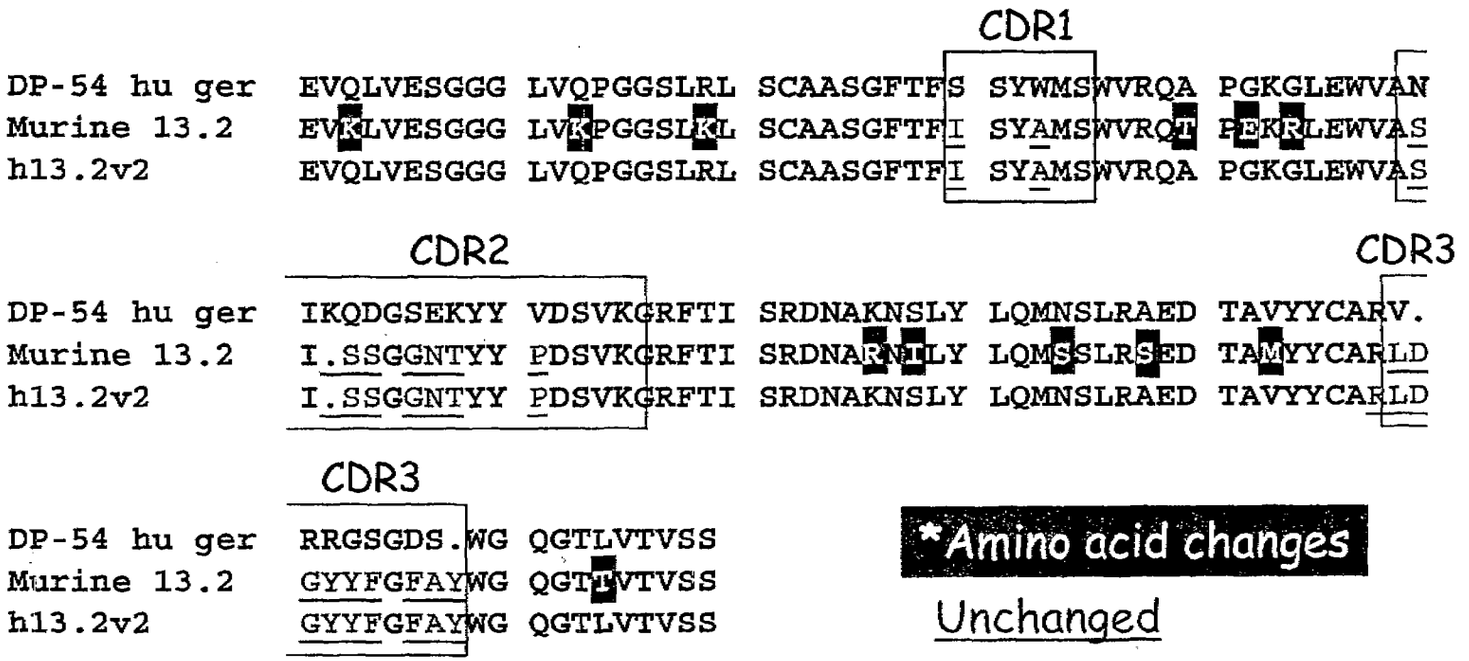

CDR1
DP-54 hu ger EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMSWVRQA PGKGLEWVAN
Murine 13.2 EVKLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFI SYAMSWVRQT PEKRLEWVAS
h13.2v2 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFI SYAMSWVRQA PGKGLEWVAS
CDR2
CDR3
DP-54 hu ger IKQDGSEKYY VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARV.
Murine 13.2 I.SSGGNTYY PDSVKGRFTI SRDNARNILY LQMSSLRSED TAMYYCARLD
h13.2v2 I.SSGGNTYY PDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARLD
CDR3
DP-54 hu ger RRGSGDS.WG QGTLVTVSS
Murine 13.2 GYYFGFAYWG QGTTVTVSS
h13.2v2 GYYFGFAYWG QGTLVTVSS
*Amino acid changes
Unchanged

Figure 17

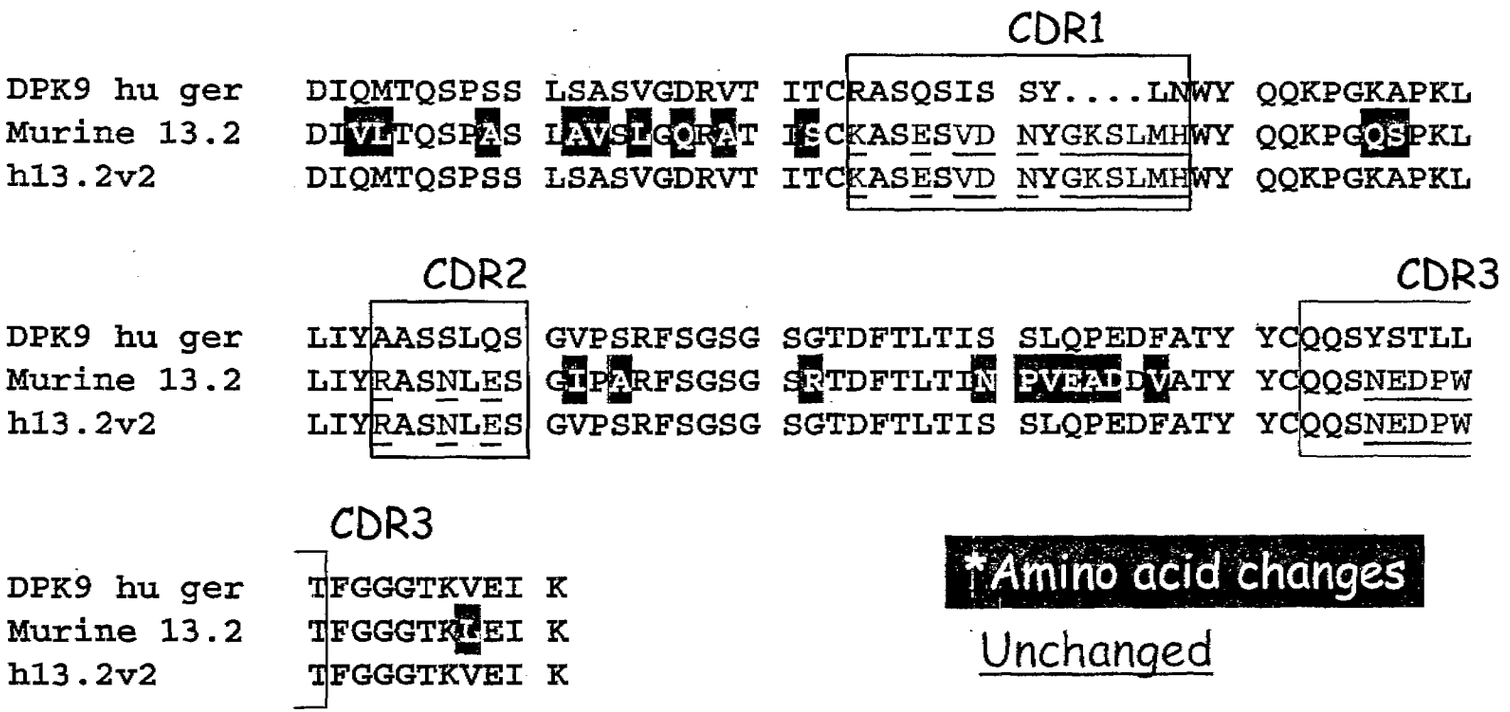

CDR1
DPK9 hu ger DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIS SY....LNWY QQKPGKAPKL
Murine 13.2 DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASESVD NYGKSLMHWY QQKPGQSPKL
h13.2v2 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASESVD NYGKSLMHWY QQKPGKAPKL
CDR2
CDR3
DPK9 hu ger LIYAASSLQS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSYSTLL
Murine 13.2 LIYRASNLES GIPARFSGSG SRTDFTLTIN PVEADDVATY YCQQSNEDPW
h13.2v2 LIYRASNLES GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSNEDPW
CDR3
DPK9 hu ger TFGGGTKVEI K
Murine 13.2 TFGGGTKLEI K
h13.2v2 TFGGGTKVEI K
*Amino acid changes
Unchanged

Figure 18

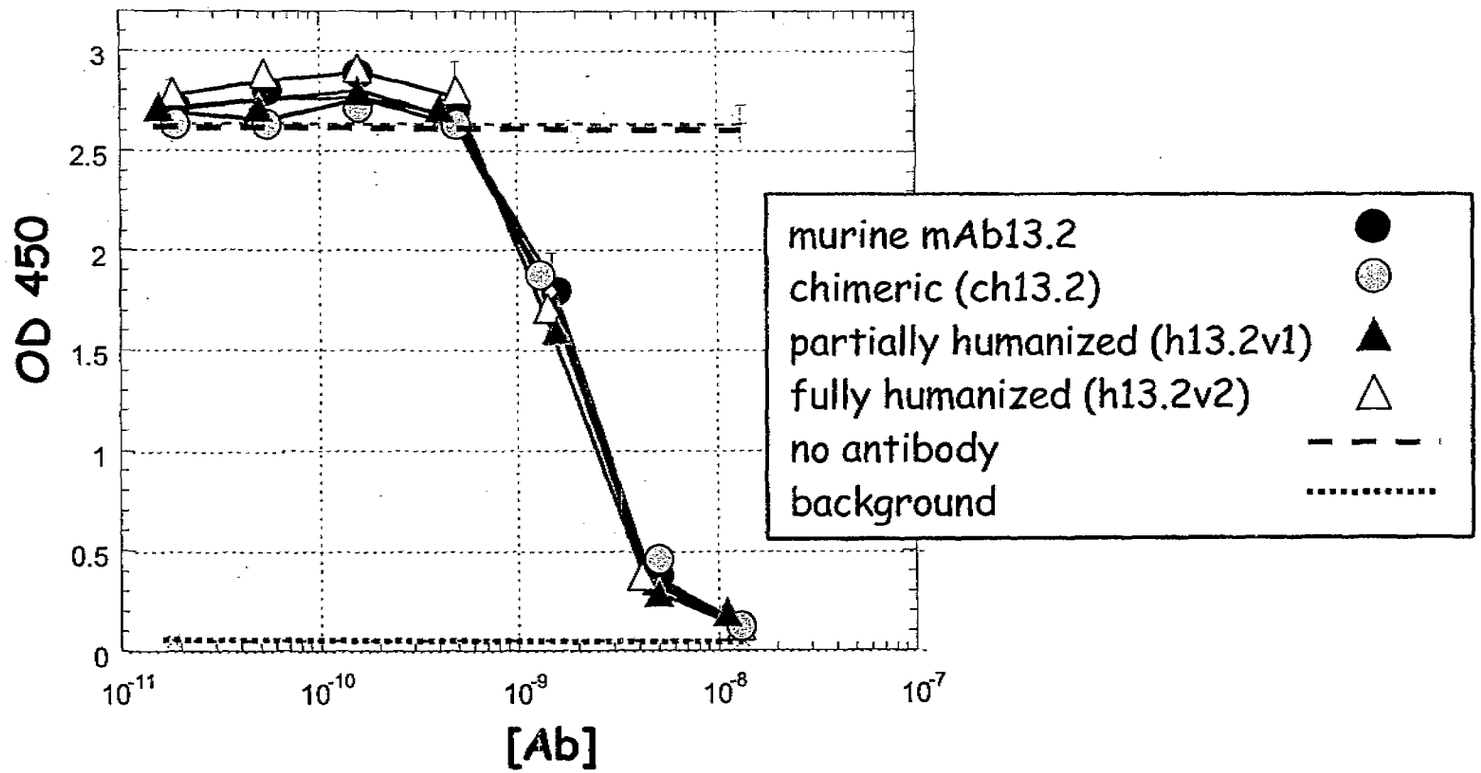
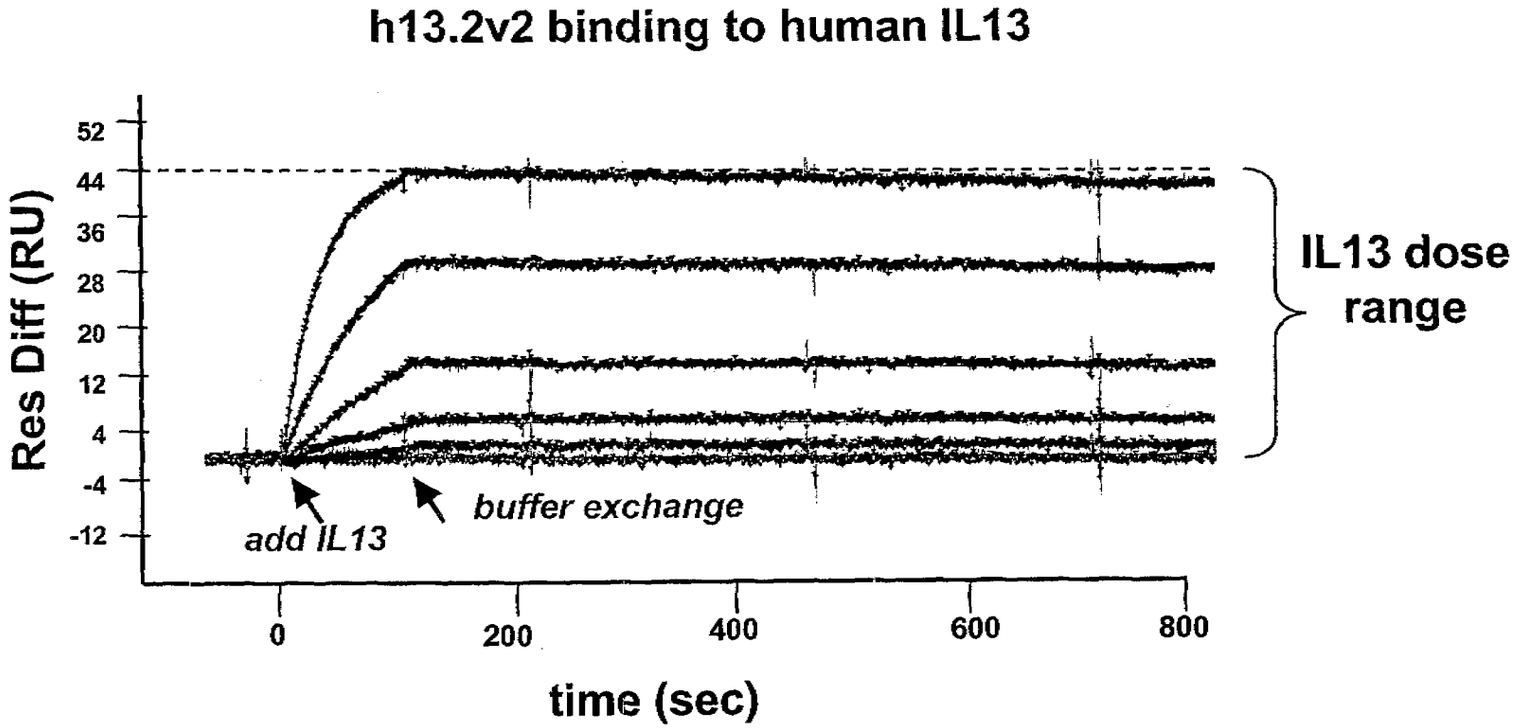

OD 450
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
10^{-11}
10^{-10}
10^{-9}
10^{-8}
10^{-7}
[Ab]
murine mAb13.2
chimeric (ch13.2)
partially humanized (h13.2v1)
fully humanized (h13.2v2)
no antibody
background

Figure 19A



K_A (1/M)	K_D (M)
9.3×10^{9}	1.1×10^{-10}

Figure 19B

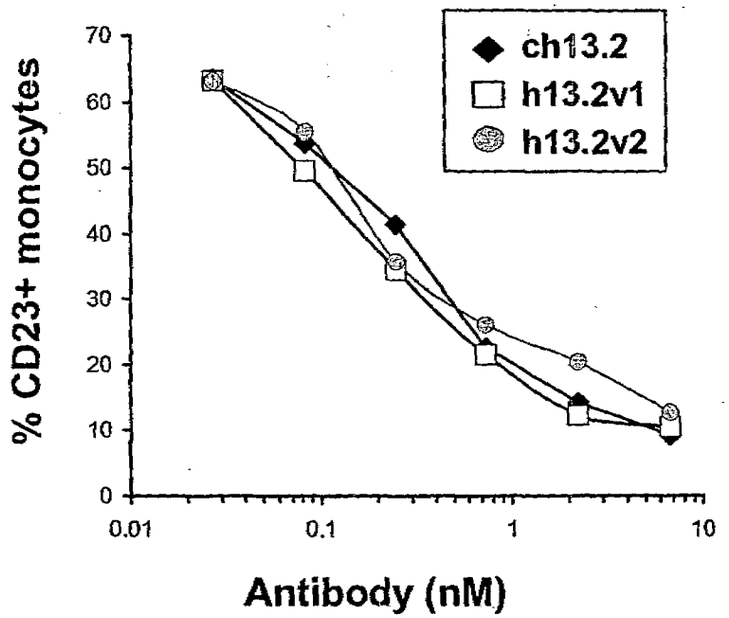


Figure 20A

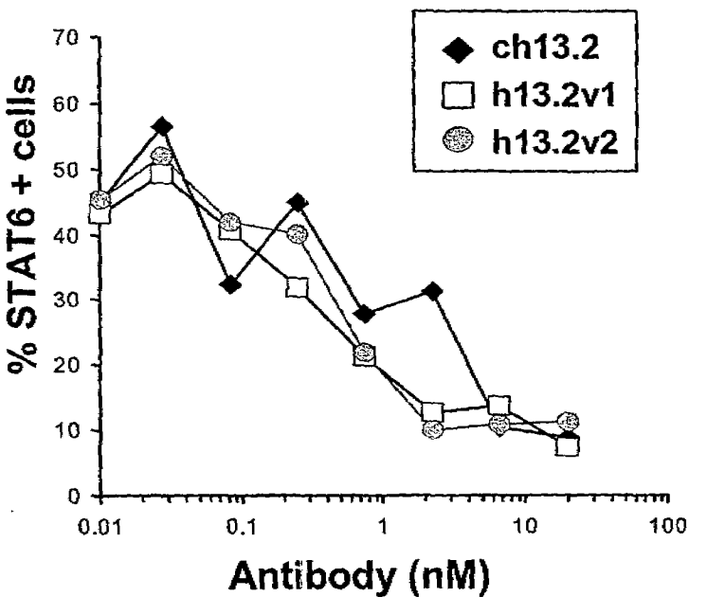


Figure 20B

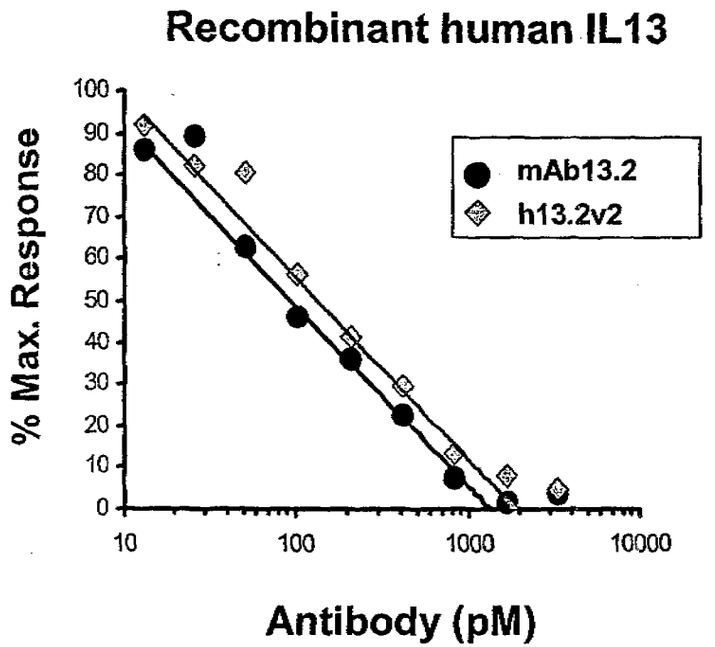


Figure 21A

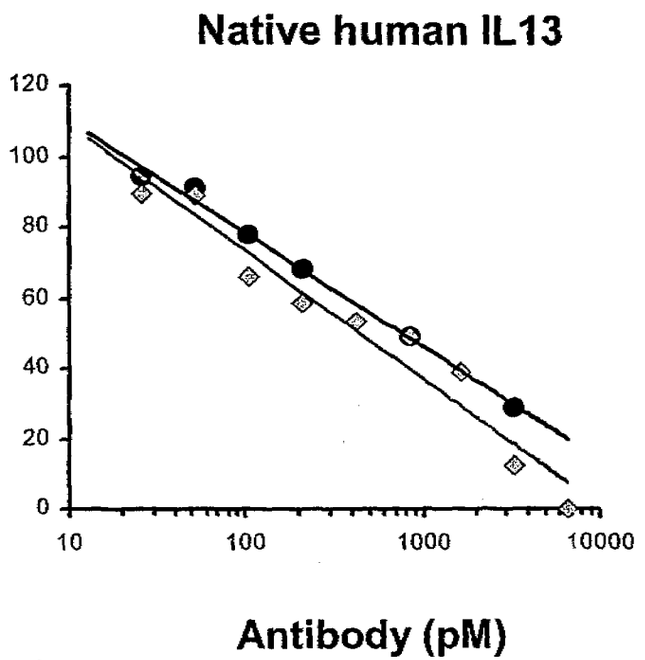


Figure 21B

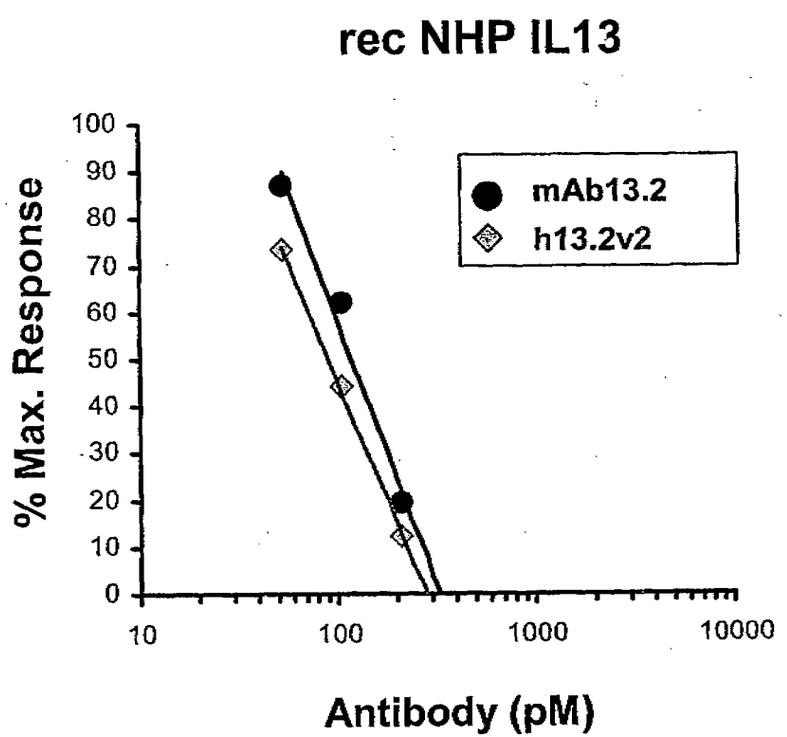


Figure 22A

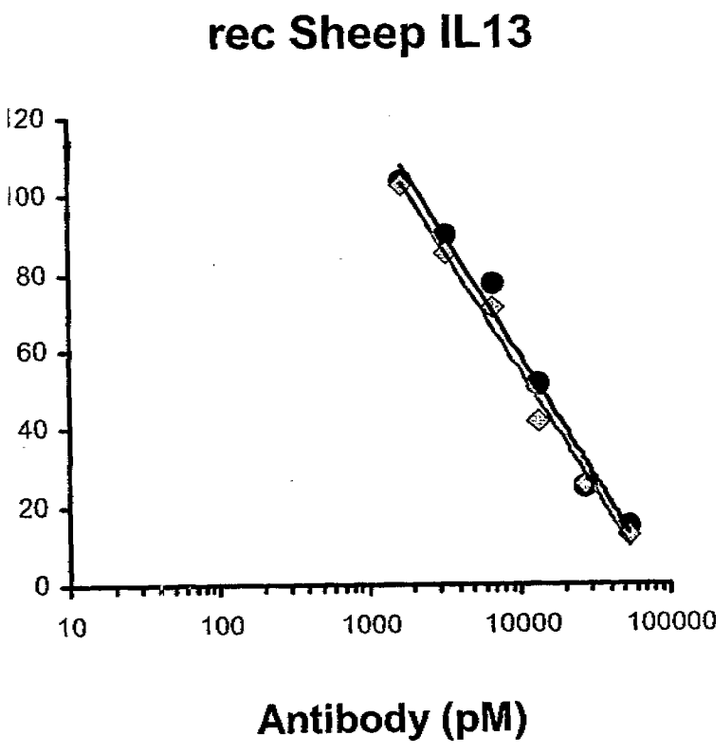


Figure 22B

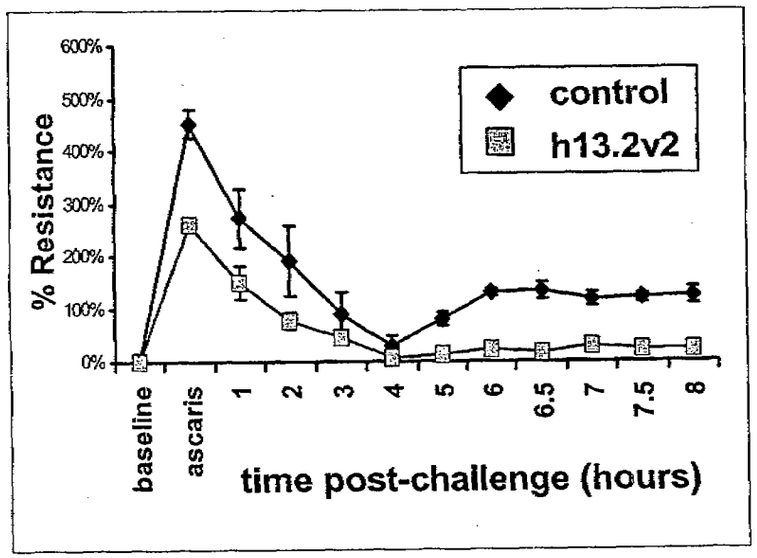


Figure 23A

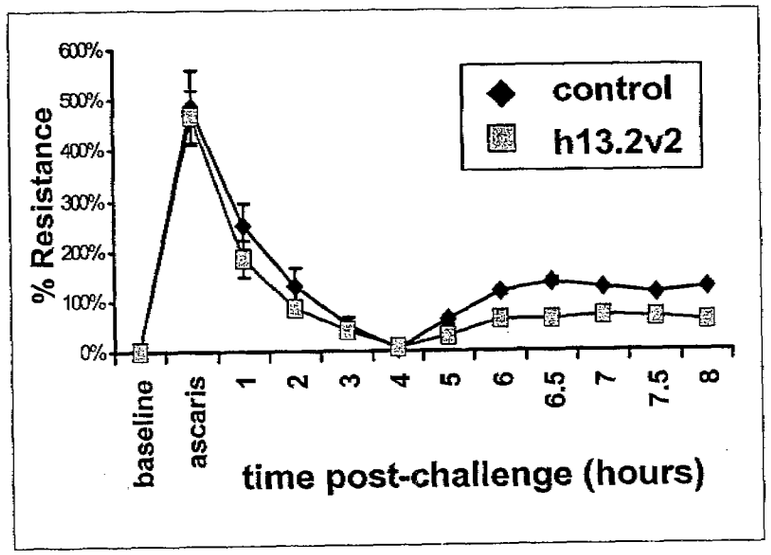


Figure 23B

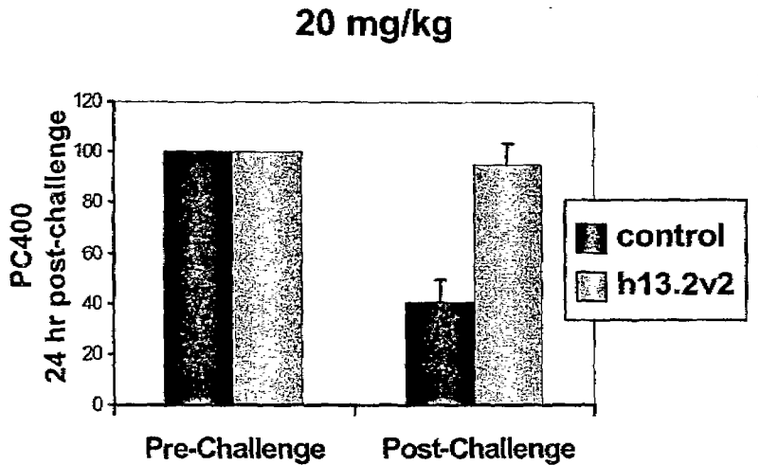


Figure 24A

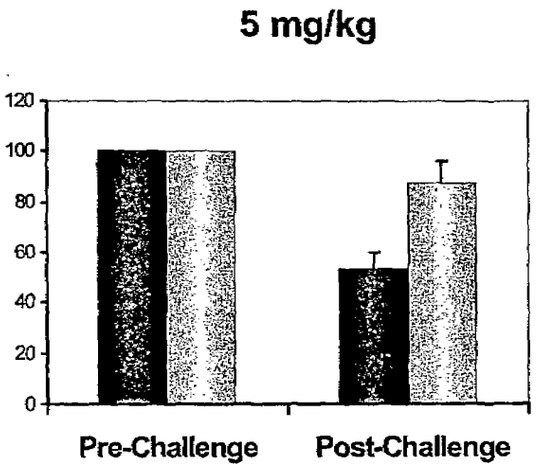


Figure 24B

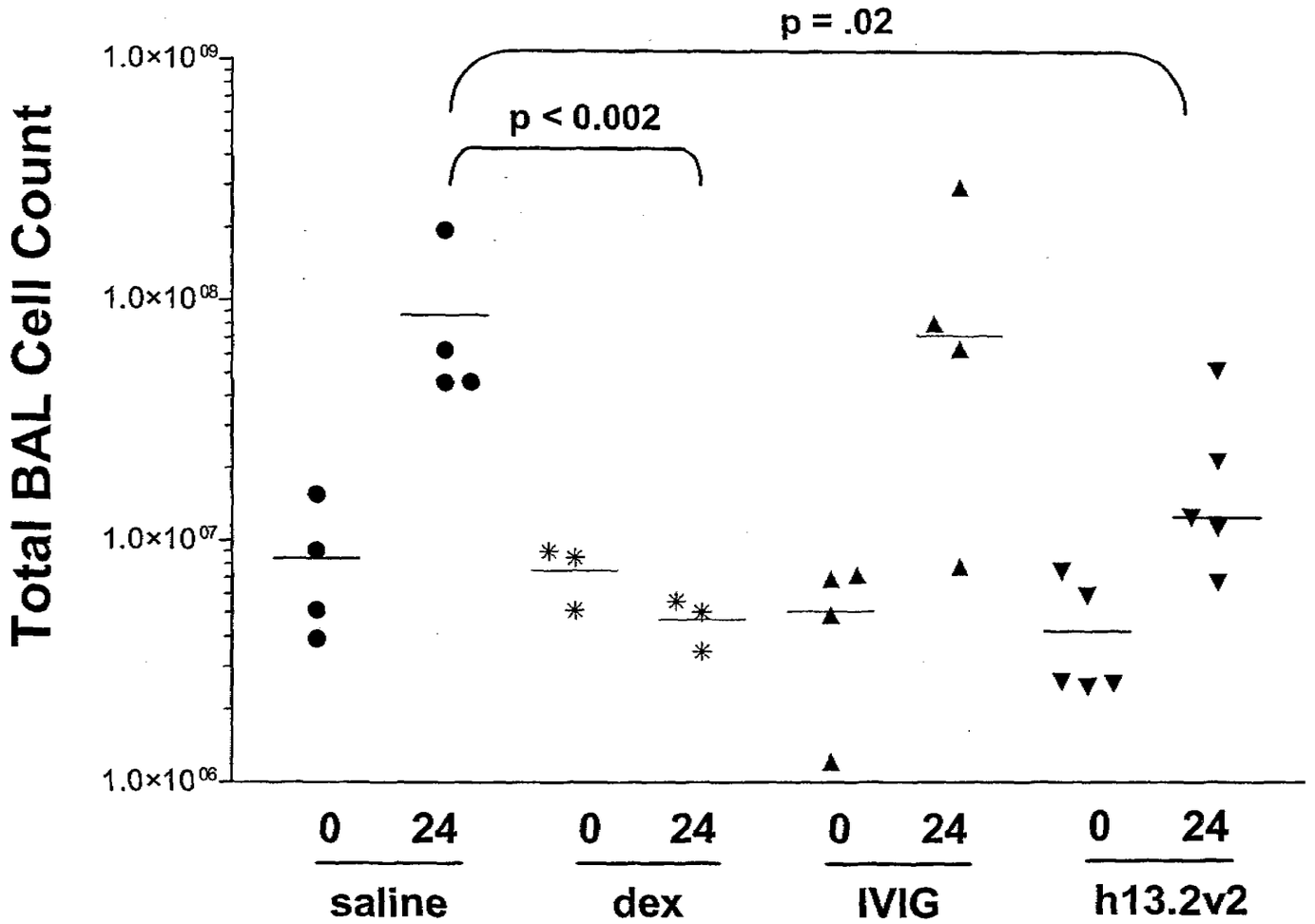

p = .02
p < 0.002
Total BAL Cell Count
1.0×10^09
1.0×10^08
1.0×10^07
1.0×10^06
0 24
0 24
0 24
0 24
saline
dex
IVIG
h13.2v2

Figure 25

VH3	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3
3-07	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	S--YWMS	WVRQAPGKGLEWVA	NIKQ--DGSEKYYVDSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
3-09	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFD	D--YAMH	WVRQAPGKGLEWVS	GISW--NSGSIGYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKD
3-11*	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	D--YYMS	WIRQAPGKGLEWVS	YISS--SGSTIYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
3-13	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	S--YDMH	WVRQATGKGLEWVS	AIG---TAGDTYYPGSVKG	RFTISRENAKNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCAR
3-15	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	N--AWMS	WVRQAPGKGLEWVG	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT
3-20	EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFD	D--YGMS	WVRQAPGKGLEWVS	GINW--NGGSTGYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYHCAR
3-21	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	S--YSMN	WVRQAPGKGLEWVS	SISS--SSSYIYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
3-23	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	S--YAMS	WVRQAPGKGLEWVS	AISG--SGGSTYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
3-30	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	S--YGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VISY--DGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
3-30.3	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	S--YAMH	WVRQAPGKGLEWVA	VISY--DGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
3-30.5	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	S--YGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VISY--DGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
3-33	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	S--YGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VIWY--DGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
3-43	EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFD	D--YTMH	WVRQAPGKGLEWVS	LISW--DGGSTYYADSVKG	RFTISRDNSKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAKD
3-48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	S--YSMN	WVRQAPGKGLEWVS	YISS--SSSTIYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR
3-49	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFG	D--YAMS	WFRQAPGKGLEWVG	FIRSKAYGGTTEYTASVKG	RFTISRDGSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCTR
3-53	EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVS	S--NYMS	WVRQAPGKGLEWVS	VIY---SGGSTYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
3-64	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	S--YAMH	WVRQAPGKGLEYVS	AISS--NGGSTYYANSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMGSLRAEDMAVYYCAR
3-66	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVS	S--NYMS	WVRQAPGKGLEWVS	VIY---SGGSTYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
3-72	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	D--HYMD	WVRQAPGKGLEWVG	RTRNKANSYTTEYAASVKG	RFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCAR
3-73	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFS	G--SAMH	WVRQASGKGLEWVG	RIRSKANSYATAYAASVKG	RFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTR
3-74	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	S--YWMH	WVRQAPGKGLVWVS	RINS--DGSSTSYADSVKG	RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
3-d	EVQLVESRGVLVQPGGSLRLSCAASGFTVS	S--NEMS	WVRQAPGKGLEWVS	SI----SGGSTYYADSRKG	RFTISRDNSKNTLHLQMNSLRAEDTAVYYCKK
DP-61	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFS	S--YAMH	WVRQAPGKGLEWVS	AI---GTGGGTYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDMAVYYCAR
mAb13.2	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFI	S--YAMS	WVRQTPEKRLEWVA	SI---SSGGNTYYPDSVKG	RFTISRDNARNILYLQMSSLRSEDTAMYYCAR

Figure 26

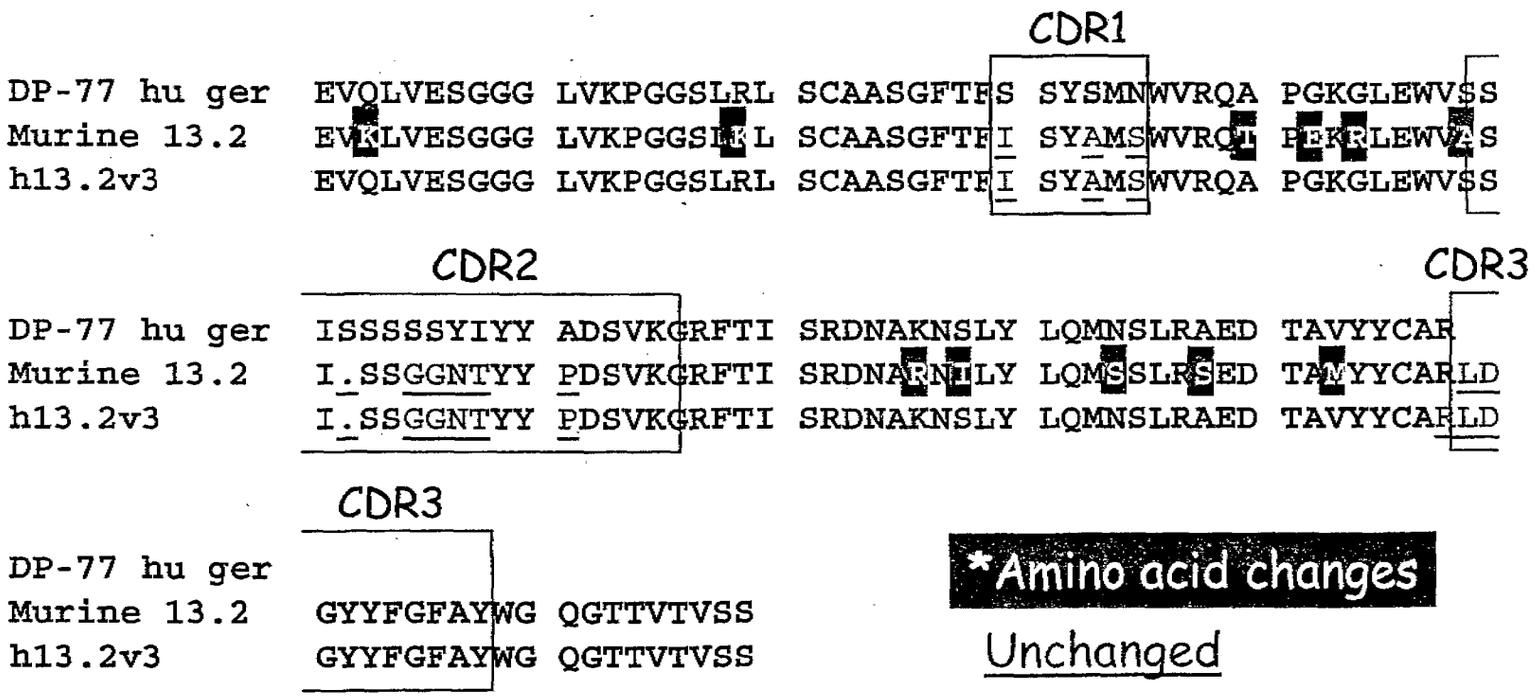

CDR1
DP-77 hu ger EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSS
Murine 13.2 EVKLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFI SYAMSWVRQT PEKRLEWVAS
h13.2v3 EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFI SYAMSWVRQA PGKGLEWVSS
CDR2
CDR3
DP-77 hu ger ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAR
Murine 13.2 I.SSGGNTYY PDSVKGRFTI SRDNARNILY LQMSSLRSED TAMYYCARLD
h13.2v3 I.SSGGNTYY PDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARLD
CDR3
DP-77 hu ger
Murine 13.2 GYYFGFAYWG QGTTVTVSS
h13.2v3 GYYFGFAYWG QGTTVTVSS
*Amino acid changes
Unchanged

Figure 27

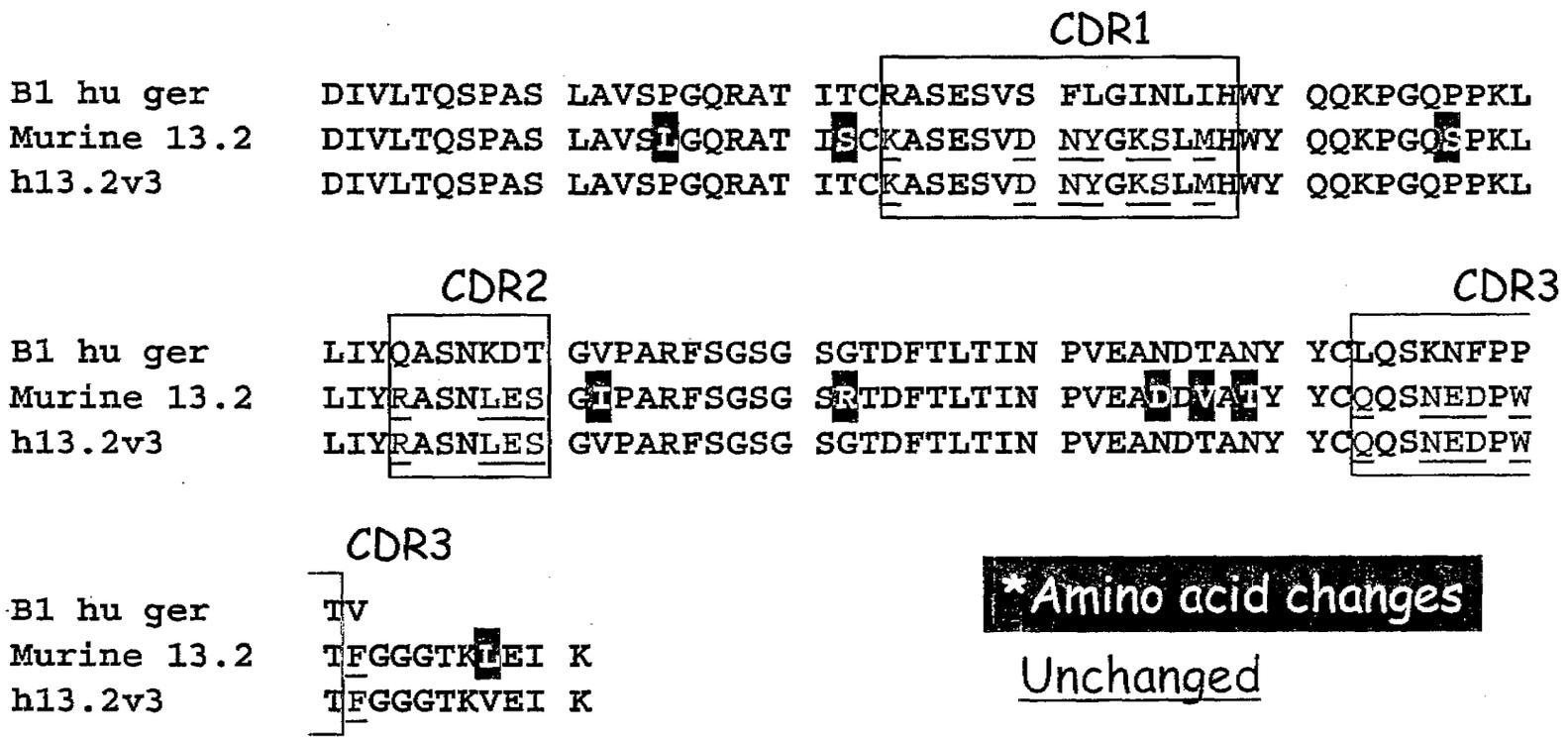

CDR1
B1 hu ger DIVLTQSPAS LAVSPGQRAT ITCRASESVS FLGINLIHWY QQKPGQPPKL
Murine 13.2 DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASESVD NYGKSLMHWY QQKPGQSPKL
h13.2v3 DIVLTQSPAS LAVSPGQRAT ITCKASESVD NYGKSLMHWY QQKPGQPPKL
CDR2
CDR3
B1 hu ger LIYQASNKDT GVPARFSGSG SGTDFTLTIN PVEANDTANY YCLQSKNFPP
Murine 13.2 LIYRASNLES GIPARFSGSG SRTDFTLTIN PVEADDVATY YCQQSNEDPW
h13.2v3 LIYRASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIN PVEANDTANY YCQQSNEDPW
CDR3
B1 hu ger TV
Murine 13.2 TFGGGTKLEI K
h13.2v3 TFGGGTKVEI K
*Amino acid changes
Unchanged

Figure 28

Residue	Linear Sequence Number	Chothia Structure Number	Kabat Sequence Number
E	1	1	1
V	2	2	2
K	3	3	3
L	4	4	4
V	5	5	5
E	6	6	6
S	7	7	7
G	8	8	8
G	9	9	9
G	10	10	10
L	11	11	11
V	12	12	12
K	13	13	13
P	14	14	14
G	15	15	15
G	16	16	16
S	17	17	17
L	18	18	18
K	19	19	19
L	20	20	20
S	21	21	21
C	22	22	22
A	23	23	23
A	24	24	24
S	25	25	25
G	26	26	26
F	27	27	27
T	28	28	28
F	29	29	29
I	30	30	30
S	31	31	31
Y	32	32	32
A	33	33	33
M	34	34	34
S	35	35	35
W	36	36	36
V	37	37	37
R	38	38	38
Q	39	39	39
T	40	40	40
P	41	41	41
E	42	42	42
K	43	43	43
R	44	44	44
L	45	45	45
E	46	46	46
W	47	47	47
V	48	48	48
A	49	49	49
S	50	50	50
I	51	51	51
S	52	52	52
S	53	53	53
G	54	54	54
G	55	55	55
N	56	56	56
T	57	57	57
Y	58	58	58
Y	59	59	59
P	60	60	60
D	61	61	61
S	62	62	62
V	63	63	63
K	64	64	64
G	65	65	65
R	66	66	66
F	67	67	67
T	68	68	68
I	69	69	69
S	70	70	70
R	71	71	71
D	72	72	72
N	73	73	73
A	74	74	74
R	75	75	75
N	76	76	76
I	77	77	77
L	78	78	78
Y	79	79	79
L	80	80	80
Q	81	81	81
M	82	82	82
S	**83**	**82A**	**82A**
S	**84**	**82B**	**82B**
L	**85**	**82C**	**82C**
R	86	83	83
S	87	84	84
E	88	85	85
D	89	86	86
T	90	87	87
A	91	88	88
M	92	89	89
Y	93	90	90
Y	94	91	91
C	95	92	92
A	96	93	93
R	97	94	94
L	98	95	95
D	99	96	96
G	100	97	97
Y	101	98	98
Y	102	99	99
F	103	100	100
G	**104**	**100A**	**100A**
F	**105**	**100B**	**100B**
A	106	101	101
Y	107	102	102
W	108	103	103
G	109	104	104
Q	110	105	105
G	111	106	106
T	112	107	107
T	113	108	108
V	114	109	109
T	115	110	110
V	116	111	111
S	117	112	112
S	118	113	113

Numbering of mAb13.2 Variable Heavy Chain According to Different Schemes

Figure 29

Residue	Linear Sequence Number	Chothia Structure Number	Kabat Sequence Number
D	1	1	1
I	2	2	2
V	3	3	3
L	4	4	4
T	5	5	5
Q	6	6	6
S	7	7	7
P	8	8	8
A	9	9	9
S	10	10	10
L	11	11	11
A	12	12	12
V	13	13	13
S	14	14	14
L	15	15	15
G	16	16	16
Q	17	17	17
R	18	18	18
A	19	19	19
T	20	20	20
I	21	21	21
S	22	22	22
C	23	23	23
K	24	24	24
A	25	25	25
S	26	26	26
E	27	27	27
S	28	28	**27A**
V	29	29	**27B**
D	30	30	**27C**
N	**31**	**30A**	**27D**
Y	**32**	**30B**	28
G	**33**	**30C**	29
K	**34**	**30D**	30
S	35	31	31
L	36	32	32
M	37	33	33
H	38	34	34
W	39	35	35
Y	40	36	36
Q	41	37	37
Q	42	38	38
K	43	39	39
P	44	40	40
G	45	41	41
Q	46	42	42
S	47	43	43
P	48	44	44
K	49	45	45
L	50	46	46
L	51	47	47
I	52	48	48
Y	53	49	49
R	54	50	50
A	55	51	51
S	56	52	52
N	57	53	53
L	58	54	54
E	59	55	55
S	60	56	56
G	61	57	57
I	62	58	58
P	63	59	59
A	64	60	60
R	65	61	61
F	66	62	62
S	67	63	63
G	68	64	64
S	69	65	65
G	70	66	66
S	71	67	67
R	72	68	68
T	73	69	69
D	74	70	70
F	75	71	71
T	76	72	72
L	77	73	73
T	78	74	74
I	79	75	75
N	80	76	76
P	81	77	77
V	82	78	78
E	83	79	79
A	84	80	80
D	85	81	81
D	86	82	82
V	87	83	83
A	88	84	84
T	89	85	85
Y	90	86	86
Y	91	87	87
C	92	88	88
Q	93	89	89
Q	94	90	90
S	95	91	91
N	96	92	92
E	97	93	93
D	98	94	94
P	99	95	95
W	100	96	96
T	101	97	97
F	102	98	98
G	103	99	99
G	104	100	100
G	105	101	101
T	106	102	102
K	107	103	103
L	108	104	104
E	109	105	105
I	110	106	106
K	111	107	107

Numbering of mAb13.2 Variable Light Chain According to Different Schemes

Figure 30

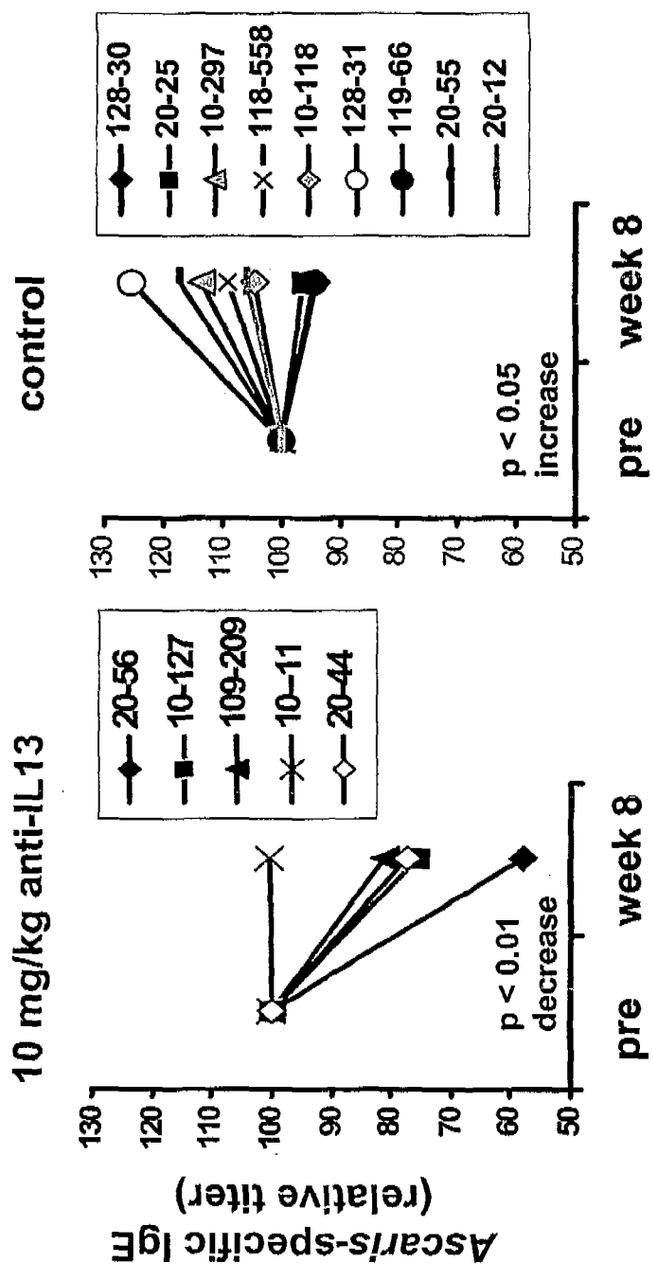


Figure 31A

Figure 31B

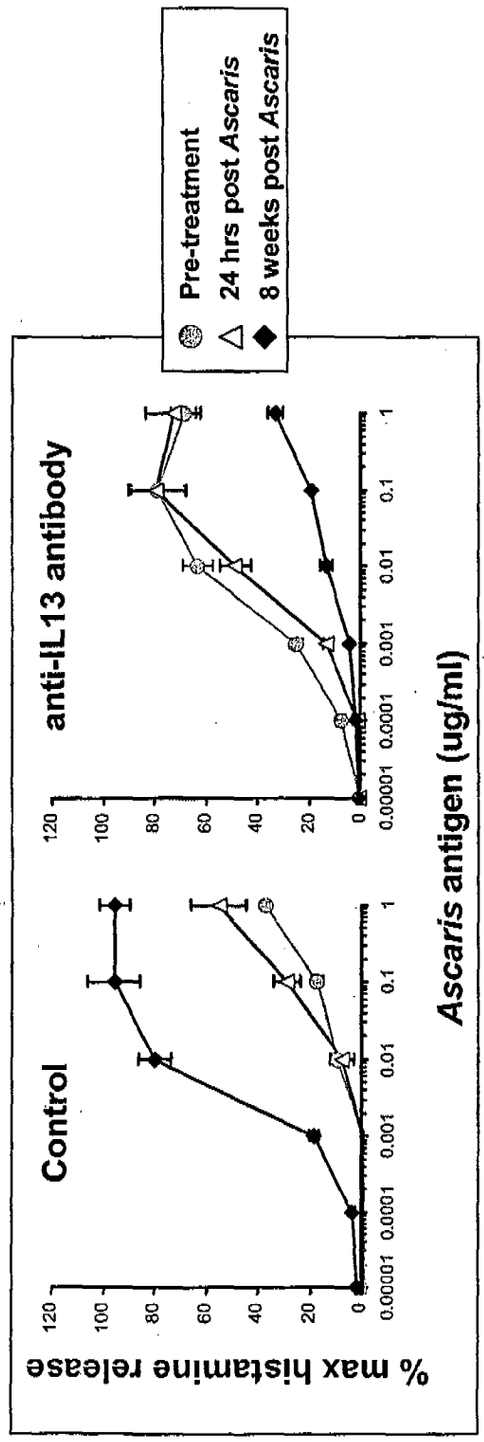

Pre-treatment
24 hrs post Ascaris
8 weeks post Ascaris
anti-IL13 antibody
Control
% max histamine release
Ascaris antigen (ug/ml)
0
20
40
60
80
100
120
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1

Figure 32A

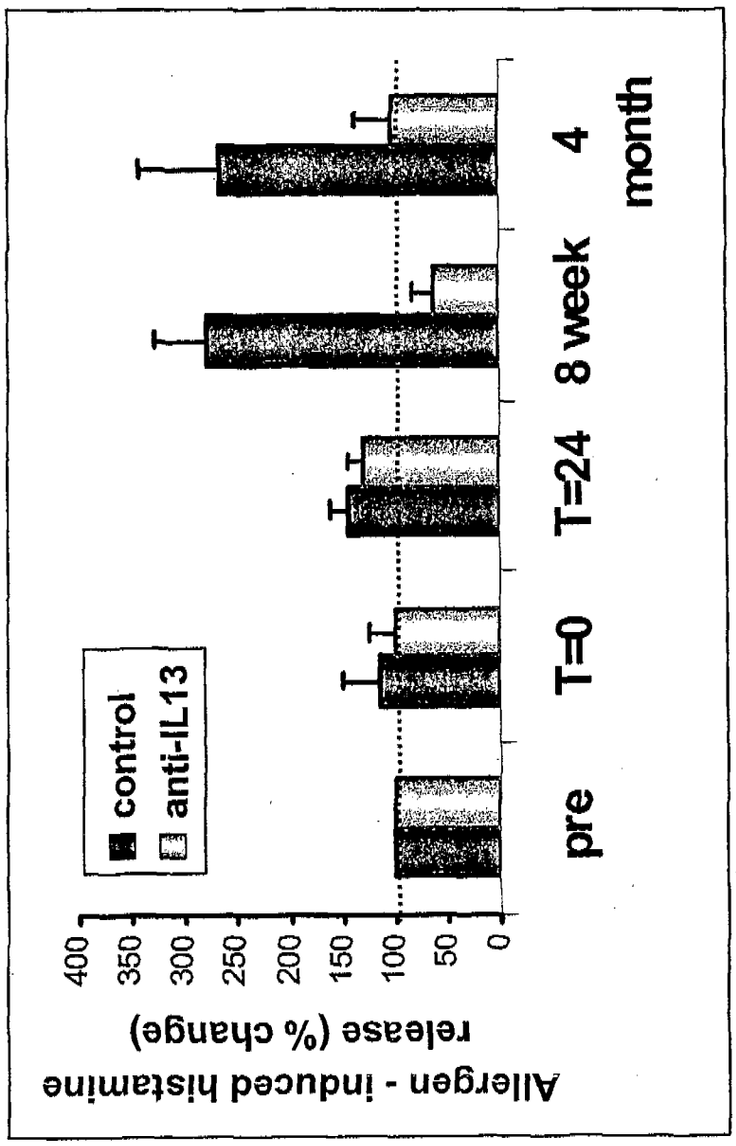

Allergen - induced histamine release (% change)
400
350
300
250
200
150
100
50
0
control
anti-IL13
pre
T=0
T=24
8 week
4 month

Figure 32B

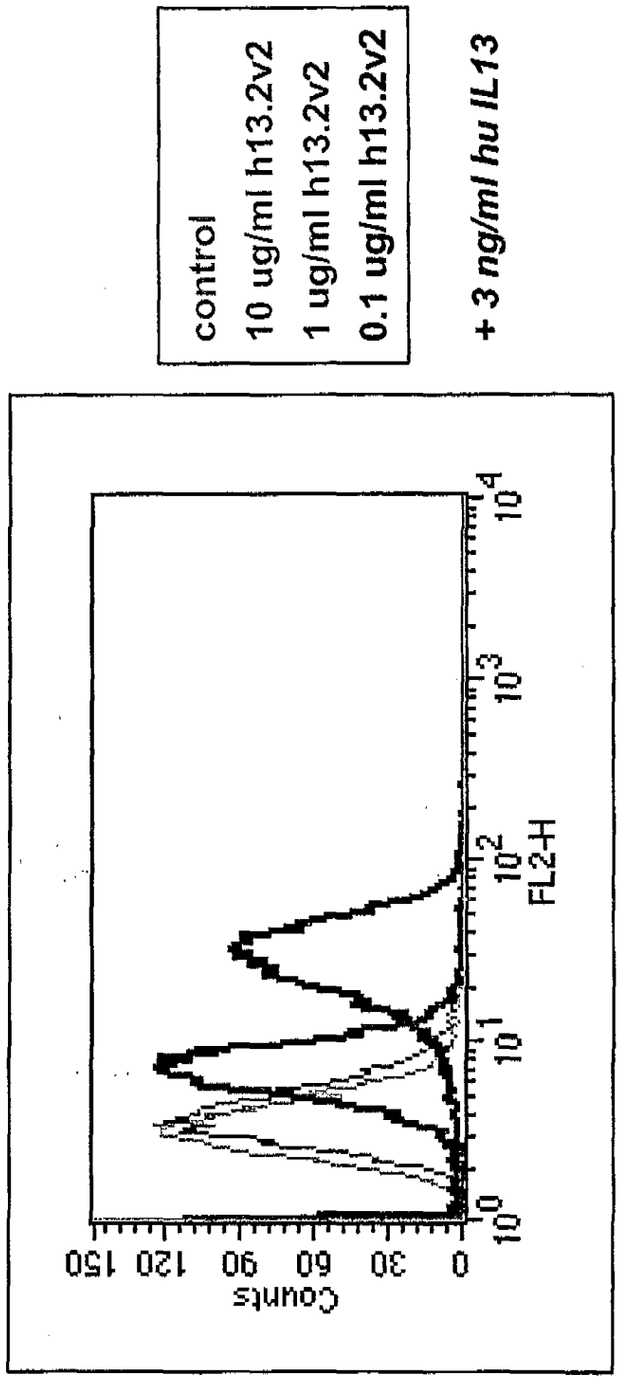

control
10 ug/ml h13.2v2
1 ug/ml h13.2v2
0.1 ug/ml h13.2v2
+ 3 ng/ml hu IL13
Counts
0
30
60
90
120
150
FL2-H
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4

Figure 33

Figure 34A

Figure 34B

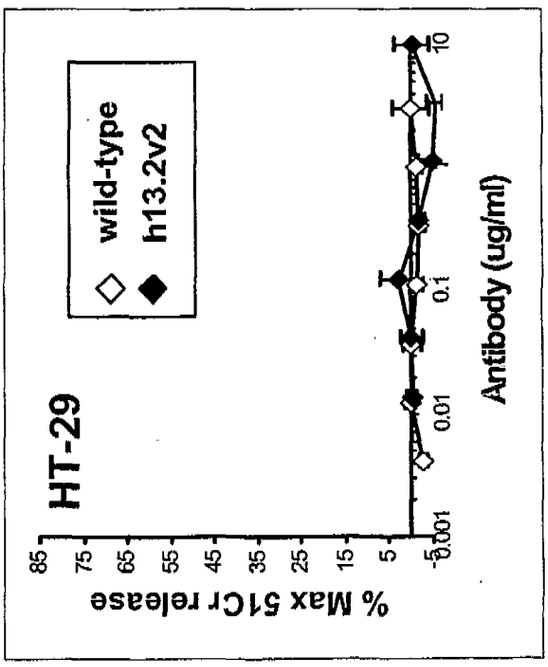


Figure 35B

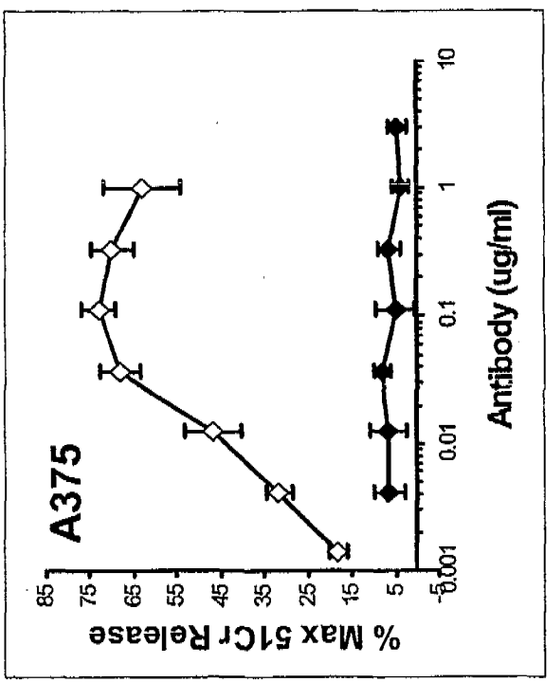


Figure 35A

SEQUENCE LISTING

<110> Wyeth

<120> Antibodies against Human Interleukin-13 and Uses Therefor

<130> 16158-048WO1 / AM101493-PCT

<150> US 60/578,473
<151> 2004-06-09

<150> US 60/581,375
<151> 2004-06-22

<150> US 60/578,736
<151> 2004-06-09

<160> 37

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 333
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 1
gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atatcctgca aagccagtga aagtgttgat aattatggca aaagtttaat gcactggtac 120

cagcagaaac caggacagtc acccaaactc ctcatctatc gtgcatccaa cctagaatct 180

gggatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattaat 240

cctgtggagg ctgatgatgt tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtgg 300

acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa 333

<210> 2
<211> 333
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 2
gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atatcctgca aagccagtga aagtgttgat aattatggca aaagtttaat gcactggtac 120

cagcagaaac caggacagtc acccaaactc ctcatctatc gtgcatccaa cctagaatct 180

gggatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattaat 240

cctgtggagg ctgatgatgt tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtgg 300

acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa 333

<210> 3
<211> 333
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> partially humanized antibody light chain

<400> 3
gacatccagc tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60

atcacttgca aagccagtga agtgttgat aattatggca aaagtctgat gcactggtat 120

cagcagaaac cagggaaagc tcctaagctc ctgatctatc gtgcatccaa cctggaatct 180

ggcgtcccat caaggttcag tggcagtgga tctcgcacag atttcactct caccatcagc 240

agtctgcaac ctgaagattt tgcaacttac tactgtcagc aaagtaatga ggatccctgg 300

accttcggcg gagggaccaa ggtagagatc aaa 333

<210> 4
<211> 333
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> fully humanized antibody light chain

<400> 4
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60

atcacttgca aagccagtga agtgttgat aattatggca aaagtctgat gcactggtat 120

cagcagaaac cagggaaagc tcctaagctc ctgatctatc gtgcatccaa cctggaatct 180

ggcgtcccat caaggttcag tggcagtgga tctggcacag atttcactct caccatcagc 240

agtctgcaac ctgaagattt tgcaacttac tactgtcagc aaagtaatga ggatccctgg 300

accttcggcg gagggaccaa ggtagagatc aaa 333

<210> 5
<211> 351
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 5
gaagtgaagc tggtggagtc tgggggaggc ttagtgaaac ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcatt agctatgcca tgtcttgggt tcgtcagact 120

ccagagaaga ggctggagtg ggtcgcatcc attagtagtg gtggtaacac ctactatcca 180

gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagataatg ccaggaacat cctatacctg 240

caaatgagca gtctgaggtc tgaggacacg gccatgtatt actgtgcacg acttgatggt 300

tactactttg gatttgctta ctggggccaa gggactctgg tcgctgtctc t 351

<210> 6
<211> 351
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 6
gaagtgaagc tggtggagtc tgggggaggc ttagtgaaac ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcatt agctatgcca tgtcttgggt tcgtcagact 120

ccagagaaga ggctggagtg ggtcgcatcc attagtagtg gtggtaacac ctactatcca 180

gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagataatg ccaggaacat cctatacctg 240

caaatgagca gtctgaggtc tgaggacacg gccatgtatt actgtgcacg acttgatggt 300

tactactttg gatttgctta ctggggccaa gggactctgg tcgctgtctc t 351

<210> 7
<211> 354
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> partially humanized antibody heavy chain

<400> 7
gaggtcaagc tggtggagtc agggggaggc ttagtgcaac ctggagggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcatt agctatgcca tgtcttgggt tcgtcaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtcgcatcc attagtagtg gtggtaacac ctactatcca 180

gacagcgtga agggccgatt caccatctcc agagataatg ccaagaacag cctatacctg 240

caaatgaaca gtctgagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcacg acttgatggt 300

tactactttg gatttgctta ctggggccaa gggaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 8
<211> 354
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> fully humanized antibody heavy chain

<400> 8
gaggtccagc tggtggagtc agggggaggc ttagtgcaac ctggagggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcatt agctatgcca tgtcttgggt tcgtcaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtcgcatcc attagtagtg gtggtaacac ctactatcca 180

gacagcgtga agggccgatt caccatctcc agagataatg ccaagaacag cctatacctg 240

caaatgaaca gtctgagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcacg acttgatggt 300

tactactttg gatttgctta ctggggccaa gggaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 9
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 9

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

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

Gly Lys Ser Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
65 70 75 80

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

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 10
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 10

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

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

Gly Lys Ser Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
65 70 75 80

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

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 11
<211> 111
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> partially humanized antibody light chain

<400> 11

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

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

Gly Lys Ser Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

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

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 12
<211> 111
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> fully humanized antibody light chain

<400> 12

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

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

Gly Lys Ser Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

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

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 13
<211> 118
<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ile Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Leu Asp Gly Tyr Tyr Phe Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 14
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 14

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ile Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Leu Asp Gly Tyr Tyr Phe Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 15
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> partially humanized antibody heavy chain

<400> 15

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ile Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Leu Asp Gly Tyr Tyr Phe Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 16
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> fully humanized antibody heavy chain

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ile Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65                  70                  75                  80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Arg Leu Asp Gly Tyr Tyr Phe Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 17
<211> 329
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> The "S" in position #1 represents amino acid residue #119 when the sequence follows residue #118 of, e.g., SEQ ID NOs:15 or 16. In this representation of the sequence, mutated amino acids are at residue #s 234 and 237 [instead of 116 and 119, respectively].

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> "S" at 1 (as shown) - L116A and G119A "S" at 119 -- L234A and G237A

<220>
<221> MUTAGEN
<222> (116)..(116)

<220>
<221> MUTAGEN
<222> (119)..(119)

<400> 17

```
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
1               5                   10                  15

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
            20                  25                  30

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
        35                  40                  45

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
    50                  55                  60
```

```
Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
65                  70                  75                  80

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
                85                  90                  95

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
            100                 105                 110

Ala Pro Glu Ala Leu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
        115                 120                 125

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
    130                 135                 140

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
145                 150                 155                 160

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
                165                 170                 175

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
            180                 185                 190

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
        195                 200                 205

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
    210                 215                 220

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
225                 230                 235                 240

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
                245                 250                 255

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
            260                 265                 270

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
        275                 280                 285

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
    290                 295                 300

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
305                 310                 315                 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325
```

<210> 18
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> The "R" in position #1 represents amino acid residue #112 when the sequence follows residue #111 of, e.g., SEQ ID NOs:11 or 12.

<400> 18

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 19
<211> 15
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> This fragment corresponds to residues 24-38 (linear) of, e.g., Figure 30.

<400> 19

Lys Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Lys Ser Leu Met His
1 5 10 15

<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE
<223> This fragment corresponds to residues 54-60 (linear) of, e.g., Figure 30.

<400> 20

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> This fragment corresponds to residues 93-101 (linear) of, e.g., Figure 30.

<400> 21

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Trp Thr
1 5

<210> 22
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> This fragment corresponds to residues 30-35 (linear) of, e.g., Figure 29.

<400> 22

Ile Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 23
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> This fragment corresponds to residues 50-65 (linear) of, e.g., Figure 29.

<400> 23

Ser Ile Ser Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> This fragment corresponds to residues 98-107 (linear) of, e.g., Figure 29.

<400> 24

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

<210> 25
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> minimum core CDR sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> This fragment corresponds to residues 24-38 (linear) of, e.g., Figure 30; also corresponds to SEQ ID NO:19.

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(7)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(15)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 25

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Tyr Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

<210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> minimum core CDR sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> This fragment corresponds to residues 54-60 (linear) of, e.g., Figure 30; also corresponds to SEQ ID NO:20.

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(7)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 26

Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> minimum core CDR sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> This fragment corresponds to residues 93-101 of, e.g., Figure 30; also corresponds to SEQ ID NO:21.

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 27

Xaa Xaa Xaa Asn Xaa Asp Xaa Trp Xaa
1 5

<210> 28
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> minimum core CDR sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> This fragment corresponds to residues 30-35 of, e.g., Figure 29; also corresponds to SEQ ID NO:22.

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(6)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 28

Ile Ser Xaa Ala Xaa Xaa
1 5

<210> 29
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> minimum core CDR sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> This fragment corresponds to residues 50-65 (linear) of, e.g., Figure 29; also corresponds to SEQ ID NO:23.

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(9)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(16)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 29

Ser Xaa Ser Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

<210> 30
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> minimum core CDR sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> This fragment corresponds to residues 98-107 (linear) of, e.g., Figure 29; also corresponds to SEQ ID NO:24.

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(10)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 30

Leu Asp Gly Tyr Tyr Phe Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 31
<211> 132
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

Met Ala Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly
1 5 10 15

Phe Ala Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu
20 25 30

Ile Glu Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys
35 40 45

Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys
50 55 60

Ala Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu
65 70 75 80

Lys Thr Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala
85 90 95

Gly Gln Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala
100 105 110

Gln Phe Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu
115 120 125

Gly Arg Phe Asn
130

<210> 32
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

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

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

Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala Leu
35 40 45

Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr Gln
50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe Val
85 90 95

Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Arg Phe
100 105 110

Asn

<210> 33
<211> 333
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> fully humanized antibody light chain

<400> 33
gacatcgtgc tcactcagtc tccagcttct ttggctgtgt ctccagggca gagggccacc 60

ataacctgca aagccagtga agtgttgat aattatggca aaagtttaat gcactggtac 120

cagcagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc gtgcatccaa cctagaatct 180

ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccattaat 240

cctgtggagg ctaatgatac tgcaaactat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtgg 300

acgttcggtg gagggaccaa ggtggaaata aaa 333

<210> 34
<211> 354
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> fully humanized antibody heavy chain

<400> 34
gaggtccagc tggtggagtc agggggaggc ttagtgaaac ctggagggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcatt agctatgcca tgtcttgggt tcgtcaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagtg gtggtaacac ctactatcca 180

gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagataatg ccaagaacag cctatacctg 240

caaatgaaca gtctgagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcacg acttgatggt 300

tactactttg gatttgctta ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 35
<211> 111
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> fully humanized antibody light chain

<400> 35

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

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

Gly Lys Ser Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
65 70 75 80

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

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 36
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> fully humanized antibody heavy chain

<400> 36

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ile Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Ser Ile Ser Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Leu Asp Gly Tyr Tyr Phe Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 37
<211> 427
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37

Met Glu Trp Pro Ala Arg Leu Cys Gly Leu Trp Ala Leu Leu Leu Cys
1 5 10 15

Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Pro Thr Glu Thr Gln
20 25 30

Pro Pro Val Thr Asn Leu Ser Val Ser Val Glu Asn Leu Cys Thr Val
35 40 45

Ile Trp Thr Trp Asn Pro Pro Glu Gly Ala Ser Ser Asn Cys Ser Leu
50 55 60

Trp Tyr Phe Ser His Phe Gly Asp Lys Gln Asp Lys Lys Ile Ala Pro
65 70 75 80

Glu Thr Arg Arg Ser Ile Glu Val Pro Leu Asn Glu Arg Ile Cys Leu
85 90 95

Gln Val Gly Ser Gln Cys Ser Thr Asn Glu Ser Glu Lys Pro Ser Ile
100 105 110

Leu Val Glu Lys Cys Ile Ser Pro Pro Glu Gly Asp Pro Glu Ser Ala
115 120 125

Val Thr Glu Leu Gln Cys Ile Trp His Asn Leu Ser Tyr Met Lys Cys
130 135 140

Ser Trp Leu Pro Gly Arg Asn Thr Ser Pro Asp Thr Asn Tyr Thr Leu
145 150 155 160

Tyr Tyr Trp His Arg Ser Leu Glu Lys Ile His Gln Cys Glu Asn Ile
165 170 175

Phe Arg Glu Gly Gln Tyr Phe Gly Cys Ser Phe Asp Leu Thr Lys Val
180 185 190

Lys Asp Ser Ser Phe Glu Gln His Ser Val Gln Ile Met Val Lys Asp
195 200 205

Asn Ala Gly Lys Ile Lys Pro Ser Phe Asn Ile Val Pro Leu Thr Ser
210 215 220

Arg Val Lys Pro Asp Pro Pro His Ile Lys Asn Leu Ser Phe His Asn
225 230 235 240

Asp Asp Leu Tyr Val Gln Trp Glu Asn Pro Gln Asn Phe Ile Ser Arg
245 250 255

Cys Leu Phe Tyr Glu Val Glu Val Asn Asn Ser Gln Thr Glu Thr His
260 265 270

Asn Val Phe Tyr Val Gln Glu Ala Lys Cys Glu Asn Pro Glu Phe Glu
275 280 285

Arg Asn Val Glu Asn Thr Ser Cys Phe Met Val Pro Gly Val Leu Pro
290 295 300

Asp Thr Leu Asn Thr Val Arg Ile Arg Val Lys Thr Asn Lys Leu Cys
305 310 315 320

Tyr Glu Asp Asp Lys Leu Trp Ser Asn Trp Ser Gln Glu Met Ser Ile
325 330 335

Gly Lys Lys Arg Asn Ser Thr Leu Tyr Ile Thr Met Leu Leu Ile Val
340 345 350

Pro Val Ile Val Ala Gly Ala Ile Ile Val Leu Leu Leu Tyr Leu Lys
355 360 365

Arg Leu Lys Ile Ile Ile Phe Pro Pro Ile Pro Asp Pro Gly Lys Ile
370 375 380

Phe Lys Glu Met Phe Gly Asp Gln Asn Asp Asp Thr Leu His Trp Lys
385 390 395 400

Lys Tyr Asp Ile Tyr Glu Lys Gln Thr Lys Glu Glu Thr Asp Ser Val
405 410 415

Val Leu Ile Glu Asn Leu Lys Lys Ala Ser Gln
420 425

ANTICUERPOS CONTRA LA INTERLEUQUINA-13 HUMANA Y USOS DE LOS MISMOS

REFERENCIAS CRUZADAS A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica la prioridad de las patentes de Estados Unidos de América Serie No. 60/578,473, presentada el 9 de junio de 2004, serie No. 60/581,375, presentada el 22 de junio de 2004, y serie No. 60/578,736, presentada el 9 de junio de 2004. El contenido total de cada una de dichas solicitudes se incorpora a la presente por referencia. La patente de utilidad de Estados Unidos de América titulada "Anticuerpos Anti-IL13 y Complejos", presentada el 9 de junio de 2005, que nombra a Parris, K.D. et al, y se designa por el expediente No. 16163-029001/ AM101750 (que también se refiere aquí como "Solicitud 16163-029001") también se incorpora por referencia.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0002] Esta solicitud se refiere a los anticuerpos, por ejemplo, los anticuerpos humanizados y los fragmentos de los mismos que se unen al antígeno, que se unen a la interleuquina -13 (IL-13), en particular, la IL-13 humana, y sus usos en la regulación de las respuestas inmunes mediadas por la IL-13. Los anticuerpos revelados en la presente invención son útiles para el diagnóstico, la prevención y / o el tratamiento de un sujeto, por ejemplo, un paciente humano, uno o más trastornos asociados con la IL-13, por ejemplo, los trastornos respiratorios (por ejemplo, el asma); los trastornos atópicos (por ejemplo, la rinitis alérgica); las condiciones inflamatorias y/o autoinmunes de la piel (por ejemplo, la dermatitis atópica), y los órganos gastrointestinales (por ejemplo, las enfermedades intestinales inflamatorias (IBD)), al igual que los trastornos fibróticos y cancerosos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0003] La interleuquina-13 (IL-13) es una citoquina segregada por los linfocitos T y los mastocitos (McKenzie et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3735-39; Bost et al. (1996) *Immunology* 87:663-41). La IL-13 comparte diversas actividades biológicas con

la IL-4. Por ejemplo, ya sea la IL-4 o bien la IL-13 pueden provocar un cambio en el isotipo de la IgE de las células B (Tomkinson et al. (2001) *J. Immunol.* 166:5792-5800). De manera adicional, se informaron niveles más altos de la superficie celular CD23 y del suero CD23 (sCD23) en los pacientes asmáticos (Sanchez-Guererro et al. (1994) *Allergy* 49:587-92; DiLorenzo et al. (1999) *Allergy Asthma Proc.* 20:119-25). Demás, ya sea la IL-4 o bien la IL-13 pueden regular regular por aumento la expresión de MHC de clase II y el receptor IgE de baja afinidad (CD23) en las células B y en los monocitos, lo cual da como resultado una mejor presentación de los antígenos y una función regulada de los macrófagos (Tomkinson et al., *supra*). Es importante que, ya sea la IL-4 o bien la IL-13 puede aumentar la expresión de VCAM-1 en las células del endotelio, lo cual facilita el reclutamiento preferencial de los eosinófilos (y de las células T) en los tejidos de las vías aéreas (Tomkinson et al., *supra*). Ya sea la IL-4 o bien la IL-13 también pueden incrementar la secreción de moco en las vías aéreas, lo cual puede exacerbar la sensibilidad de las vías aéreas (Tomkinson et al., *supra*). Estas observaciones sugieren que a pesar de que la IL-13 no es necesaria para, o inclusive capaz de, inducir el desarrollo de Th2, la IL-13 puede desempeñar un papel clave en el desarrollo de la eosinofilia en las vías aéreas y AHR (Tomkinson et al., *supra*; Wills-Karp et al. (1998) *Science* 282:2258-61).

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0004] La presente solicitud provee, entre otros, agentes aglutinantes que son antagonistas de la IL-13, incluyendo anticuerpos y los fragmentos de los mismos que se unen al antígeno, que se unen a IL-13, en particular, la IL-13 humana, con alta afinidad y especificidad. Los anticuerpos y los fragmentos de los mismos que se unen al antígeno de la presente revelación también se denominan en la presente invención como "anticuerpos anti-IL-13" y "fragmentos de los mismos," respectivamente. En una realización, el anticuerpo de anti-IL-13 o el fragmento del mismo reduce, neutraliza y/o antagoniza por lo menos una actividad asociada a la IL-13. Por ejemplo, el anticuerpo de anti-IL-13 o el fragmento del mismo se puede unir a la IL-13, por ejemplo, un

epitopo de la IL-13 e interferir con una interacción, por ejemplo, la unión, entre la IL-13 y un complejo IL-13 receptor ("IL-13R"), por ejemplo, un complejo que comprenda el receptor de la IL-13 I1 ("IL-13RI1") y la cadena alfa del receptor de la interleuquina 4 ("IL-4RI"), o una subunidad de la misma (por ejemplo, IL-13RI1 o IL-4RI, en forma individual). Por consiguiente, los anticuerpos y los fragmentos de los mismos que se describen en la presente invención se pueden utilizar para interferir con (por ejemplo, inhibir, bloquear o reducir de otra manera) una interacción, por ejemplo, la unión, entre la IL-13 y un complejo del receptor de la IL-13, o una subunidad del mismo, que por lo tanto interfiere con la formación de un complejo funcional de señalización.

[0005] Además, hemos demostrado que la administración de un anticuerpo neutralizador de anti-IL-13 mejora, entre otras, la inflamación pulmonar inducida por el antígeno, por ejemplo, la eosinofilia y la broncoconstricción en los primates no humanos y las ovejas, respectivamente. Por consiguiente, los antagonistas de la IL-13, por ejemplo, los anticuerpos neutralizadores de anti-IL-13 y los fragmentos de los mismos, se pueden utilizar para mejorar por lo menos una actividad *in vivo* asociada con la IL-13, por ejemplo, una condición inflamatoria (por ejemplo, la inflamación pulmonar). De manera adicional, los anticuerpos neutralizadores de anti-IL-13 y los fragmentos de los mismos se pueden utilizar para mejorar la sensibilidad principal de las células de pacientes atópicos a IL-13. De tal manera que los anticuerpos o sus fragmentos se pueden usar, por ejemplo, para el tratamiento de las alergias estacionales, por ejemplo, la rinitis alérgica. Los anticuerpos de anti-IL-13 o los fragmentos de los mismos (incluyendo aquellos descriptos aquí) son útiles para el diagnóstico, el tratamietno y/o la prevención, en un paciente, por ejemplo, un paciente humao, uno o más trastornos asociados con la IL-13, por ejemplo, los trastornos respiratorios (por ejemplo, el asma, incluyendo el asma alérgica y no alérgica, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD)), al igual de las condiciones que comprenden la inflamación de las vías aéreas, la eosinofilia, la fibrosis y la producción excesiva de moco (por ejemplo, la fibrosis quística y la fibrosis pulmonar); los trastornos atópicos

(por ejemplo, la rinitis alérgica); las condiciones inflamatorias y/o autoinmunes de la piel (por ejemplo, la dermatitis atópica), los órganos gastrointestinales (por ejemplo, las enfermedades intestinales inflamatorias (IBD)), el hígado (por ejemplo, la cirrosis); las infecciones virales; el escleroderma y la fibrosis de otros órganos tales como la fibrosis hepática.

[0006] Por consiguiente, en un aspecto, esta solicitud presenta un agente aglutinante a IL-13 tal como un antagonista a IL-13. Un agente aglutinante a IL-13 puede ser una proteína, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento del mismo unido al antígeno, un péptido, o un dominio de andamiaje que interactúa con, por ejemplo, se une a y/o neutraliza, IL-13, en particular, la IL-13 de mamífero, por ejemplo, la IL-13 de primate no humano, oveja, humano. El anticuerpo puede ser un anticuerpo aíslado. En una realización, el anticuerpo o los fragmentos del mismo es un anticuerpo neutralizador, por ejemplo, reduce y/o inhibe una o más actividades asociadas con la IL-13, que incluyen pero que no se limitan a, la inducción de la expresión de CD23; la producción de IgE por las células B humanas; la fosforilación de un factor de transcripción, por ejemplo, la proteína STAT (por ejemplo, la proteína STAT6); la eosinofilia *in vivo* inducida por el antígeno; la broncoconstricción *in vivo* inducida por el antígeno; o la hipersensibilidad de las vías aéreas *in vivo* inducida por la droga, entre otras.

[0007] Los antagonistas de la IL-13 que se describen en la presente invención, por ejemplo, los anticuerpos de anti-IL-13 o los fragmentos del mismo, se pueden unir a la IL-13 con alta afinidad, por ejemplo, con un Kd menor a 10^{-7} M, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}, 10^{-11} M o mejor. Por ejemplo, los anticuerpos anti IL-13 o los fragmentos del mismo se pueden unir a la IL-13 con una afinidad comprendida entre 50 y 500 pM, por ejemplo, entre 90 y 120 pM, por ejemplo, entre 95 y 105 pM. En otras realizaciones, los anticuerpos IL-13 o los fragmentos de los mismos pueden neutralizar una o más actividades asociadas con IL-13 con un IC_{50} de por lo menos alrededor de 50 nM a 5 pM, de manera típica alrededor de 100 a 250 pM o más fuerte. En otras realizaciones, los anticuerpos anti-IL-13 o los fragmentos de los mismos se asocian con IL-13 con

cinéticas comprendidas dentro del rango de 10^3 a 10^7 $M^{-1}s^{-1}$, de manera típica 10^4 a 10^6 $M^{-1}s^{-1}$. Por ejemplo, los anticuerpos anti-IL-13 o los fragmentos de los mismos se pueden asociar con IL-13 con cinéticas comprendidas dentro del rango de $5x10^4$ a $8x10^6$ $M^{-1}s^{-1}$. Aún en otra realización, los anticuerpos anti-IL-13 o los fragmentos de los mismos tienen cinéticas de disociación comprendidas dentro del rango de 10^{-2} a 10^{-6} s^{-1}, de manera típica 10^{-3} a 10^{-6} s^{-1}, por ejemplo, más lentas que $5x10^{-4}$ s^{-1}, por ejemplo, 9, 8, 6 $x10^{-5}$ s^{-1}. En una realización, los anticuerpos anti-IL-13 o los fragmentos de los mismos se unen a IL-13, por ejemplo, la IL-13 humana, con una afinidad y/o cinéticas similares al anticuerpo monoclonal 13.2 ("mAb13.2"), o las formas modificadas del mismo, por ejemplo, las formas quiméricas (por ejemplo, "ch13.2"), o las formas humanizadas de las mismas (por ejemplo, "h13.2v1," "h13.2v2" o "h13.2v3"). La afinidad y las cinéticas de union del anticuerpo anti-IL-13 o del fragmento del mismo se puede probar utilizando, por ejemplo, la tecnología de biosensor (BIACORE) (ver el Ejemplo 1.2, más abajo).

[0008] En una realización, el anticuerpo anti-IL-13 o el fragmento del mismo (por ejemplo, un Fab, $F(ab')_2$, Fv o un fragmento de Fv de cadena simple) es un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo con especificidad única. El anticuerpo o el fragmento del mismo también puede ser un anticuerpo humano, humanizado, quimérico o generado *in vitro*. En una realización, el anticuerpo anti-IL-13 o el fragmento del mismo es un anticuerpo humanizado. En una realización, el anticuerpo es efectivamente humano.

[0009] Las cadenas pesadas y livianas del anticuerpo anti-IL-13 pueden ser de longitud completa (por ejemplo, un anticuerpo puede incluir por lo menos una, y con preferencia dos, cadenas pesadas completas, y por lo menos una, y con preferencia dos, cadens livianas completas) o pueden incluir un fragmento de unión al antígeno (por ejemplo, un Fab, $F(ab')_2$, Fv o un fragmento Fv de cadena única). Aún en otras realizaciones, el anticuerpo tiene una región constante de cadena pesada elegida a partir de, por ejemplo, las regiones constantes de cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD, e IgE; en particular, elegidas a partir de, por ejemplo, las regiones constantes de

cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, más particularmente, las regiones constantes de cadena pesada de IgG1 (por ejemplo, IgG1 humano). En otra realización, el anticuerpo tiene una región constante de cadena liviana elegida a partir de, por ejemplo, las regiones constantes de cadena liviana de kappa o lambda, con preferencia, kappa (por ejemplo, kappa humana). En una realización, la región constante es alterada, por ejemplo, mutada, para modificar las propiedades del anticuerpo (por ejemplo, hasta aumentar o reducir una o más de: unión al receptor de Fc, glicosilación del anticuerpo, la cantidad de residuos de cisteína, función celular del efector, o función de complemento). Por ejemplo, la region constante IgG1 humana se puede mutar en uno o más residuos, por ejemplo, uno o más de los residuos 234 y 237 de la SEQ ID NO:17 (por ejemplo, los residuos 234 y 237 cuando la Serina en la posición no. 1 se cambia al residuo no. 119 (siguiendo, por ejemplo, 118 aminoácidos de la cadena VH); como se mostró en la SEQ ID NO:17, con la Serina en la posición no. 1, estos mismos residuos son los nos. 116 y 119). En una realización, el anticuerpo anti-IL-13 comprende la región constante IgG1 humana como la SEQ ID NO:17. En otra realización, el anticuerpo anti-IL-13 comprende la secuencia humana de kappa que se muestra como la SEQ ID NO:18.

[0010] En otra realización, el antagonista de la IL-13, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-13 o el fragmento del mismo, se une de manera específica a IL-13, en particular, mamífero, por ejemplo, IL-13 primate no humano, oveja o humano (por ejemplo, IL-13 humana que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:31 (FIG 11)), o la secuencia madura humana de IL-13 a partir de los aminoácidos de alrededor de 20-132 de la SEQ ID NO:31 (FIG 11) (ver también la SEQ ID NO:32 para la numeración de la secuencia de IL-13 humana madura), o una secuencia que es por lo menos el 85%, 90%, 95%, 99% o más idéntica a la misma). En una realización, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo se une a una variante de IL-13 humana, por ejemplo, una variante de la IL-13 humana que tenga una Glutamina (Q) en lugar de una Arginina (R) en la posición 130 de la SEQ ID NO:31 (FIG 11). En otras realizaciones, el anticuerpo o el

fragmento del mismo se une de manera específica a un fragmento de IL-13, por ejemplo, un fragmento de por lo menos 10, 20, 50, 75, 100, 120 ó 130 ácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:31, o una secuencia que es por lo menos 85%, 90%, 95%, 99% o más idéntica a la misma. En una realización, el anticuerpo anti-IL-13 o el fragmento del mismo se une de manera específica a la IL-13 humana y no reacciona en forma cruzada con la IL-13 a partir de las especies no humanas. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-IL-13 o el fragmento del mismo se une a dos o más formas de IL-13 de mamíferos, por ejemplo, IL-13 humanas, de oveja y/o de primates no humanos.

[0011] En una realización, el antagonista de IL-13, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo, se une de manera específica a un epitodo, por ejemplo, un epitopo lineal o conformacional, de IL-13, por ejemplo, en particular, mamífero, por ejemplo, IL-13 humana. En una realización, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo se une a un epitopo que comprende los residuos 81-93 y / o 114-132 de IL-13 humana (SEQ ID NO:31), o una forma modificada de los mismos (por ejemplo, un fragmento o una forma sustituta (por ejemplo, sustituido de manera conservadora) del mismo). En otra realización, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo se une de manera específica a un epitopo de IL-13 humana que comprende uno o más de los residuos de los aminoácidos siguientes: Glutamato en la posición 68 [49], Asparagina en la posición 72 [53], Glicina en la posición 88 [69], Prolina en la posición 91 [72], Histidina en la posición 92 [73], Lisina en la posición 93 [74], y Arginina en la posición 105 [86] de la SEQ ID NO:31 [posición en la secuencia madura; SEQ ID NO:32], o una sustitución de aminoácidos conservada de los mismos.

[0012] En otra realización, el antagonista de IL-13, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo, se une a un complejo elegido a partir de, por ejemplo, IL-13 e IL-13RI1 ("IL-13/IL-13RI1"); IL-13 e IL-4RI ("IL-13/IL-4RI"); e IL-13, IL-13RI1, e IL-4RI ("IL-13/IL-13RI1/IL-4RI"). En otras realizaciones, el antagonista de IL-13, por ejemplo, el anticuerpo o un fragmento del mismo, se une a IL-13 e interfiere

con (por ejemplo, inhibe, bloquea o reduce de otra manera) una interacción, por ejemplo, la unión entre IL-13 y un complejo del receptor de IL-13, por ejemplo, un complejo que comprende IL-13RI1 e IL-4RI. En otras realizaciones, el antagonista de IL-13, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo, se une a IL-13 e interfiera con (por ejemplo, inhibe, bloquea o reduce de otra manera) una interacción, por ejemplo, la unión, entre IL-13 y una subunidad del complejo del receptor de la IL-13, por ejemplo, IL-13RI1 o IL-4RI, de manera individual. Aún en otra realización, el antagonista de IL-13, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo, se une a IL-13 e interfiere con (por ejemplo, inhibe, bloquea o reduce de otra manera) una interacción, por ejemplo, la unión entre IL-13/IL-13RI1 e IL-4RI. En otra realización, el antagonista de IL-13, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo, se une a IL-13, e interfiere con (por ejemplo, inhibe, bloquea o reduce de otra manera) una interacción, por ejemplo, la unión entre IL-13/IL-4RI e IL-13RI1. De manera típica, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo interfiere con (por ejemplo, inhibe, bloquea o reduce de otra manera) una interacción, por ejemplo, la unión de IL-13/IL-13RI1 con IL-4RI. Los anticuerpos de los ejemplos inhiben o previenen la formación de complejos ternarios IL-13/IL-13RI1/IL-4RI.

[0013] Ejemplos de anticuerpos IL-13, que interfieren con la IL-13 que se une a la IL-13R (por ejemplo, un complejo del receptor de IL-13), o una subunidad del mismo, incluyen "mAb13.2" y modificados, por ejemplo, las formas quiméricas o humanizadas de los mismos. Las secuencias de aminoácidos y nucleotides para una región variable de cadena pesada de mAb13.2 se establecen en la presente invención como SEQ ID NO:13 y SEQ ID NO:5, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos y nucleotides para la región variable de cadena liviana de mAb13.2 se establecen en la presente invención como SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:1, respectivamente. Una forma quimérica (es decir, una forma que comprende la región variable de la cadena liviana de mAb13.2) se denomina en la presente invención como "ch13.2." Las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos para la región variable de cadena pesada de ch13.2 se establecen en la presente invención como SEQ ID NO:14 (por ejemplo, FIG. 15) y SEQ ID NO:6, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos para la regióin variable de la cadena liviana de ch13.2 se establecen en la presente invención como

SEQ ID NO:10 (por ejemplo, FIG. 16) y SEQ ID NO:2, respectivamente. Una forma humanizada de mAb13.2, a la cual se hace referencia en la presente invención como "h13.2v1," tiene secuencias de aminoácidos y de nucleótidos para la región variable de cadena pesada establecida en la presente invención como SEQ ID NO:15 (FIG. 15) y SEQ ID NO:7, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos para la región variable de la cadena liviana de h13.2v1 se establecen en la presente invención como SEQ ID NO:11 (FIG. 16) y SEQ ID NO:3, respectivamente. Otra forma humanizada de mAb13.2, a la cual se hace referencia en la presente invención como "h13.2v2," tiene secuencias de aminoácidos y de nucleótidos para la región variable de cadena pesada establecida en la presente invención como SEQ ID NO:16 (FIG. 17) y SEQ ID NO:8, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos para la región variable de la cadena liviana de h13.2v2 se establecen en la presente invención como SEQ ID NO:12 (FIG. 18) y SEQ ID NO:4, respectivamente. Otra forma humanizada de mAb13.2, a la cual se hace referencia en la presente invención como "h13.2v3," tiene secuencias de aminoácidos y de nucleótidos para la región variable de cadena pesada establecida en la presente invención como SEQ ID NO:36 (FIG. 27) y SEQ ID NO:34, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos para la región variable de la cadena liviana de h13.2v3 se establecen en la presente invención como SEQ ID NO:35 (FIG. 28) y SEQ ID NO:33, respectivamente.

[0014] En una realización, el antagonista de IL-13, por ejemplo, el anticuerpo o un fragmento del mismo, se une de manera específica a IL-13, por ejemplo, IL-13 humana, de primate no humano u oveja y de manera competitiva inhibe la unión de un segundo anticuerpo a IL-13, por ejemplo, a un epitopo que constituye el objetivo en IL-13 (por ejemplo, IL-13 humana, de primate no humano, de oveja). El segundo anticuerpo puede ser un anticuerpo elegido a partir de, por ejemplo, mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, y / o h13.2v3, como se describe en la presente invención.

[0015] En una realización, el anticuerpo de IL-13 o un fragmento del mismo pueden conferir un efecto protector posterior a la inyección contra la exposición al antígeno Ascaris en un modelo de oveja por lo menos seis semanas después de la inyección.

[0016] En otra realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo comprende por lo menos una región de unión al antígeno, por ejemplo, una región variable, a partir de un anticuerpo elegido a partir de, por ejemplo, mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, y / o h13.2v3. Aún en otra realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo incluye por lo menos una, dos, tres o cuatro regiones variables de un anticuerpo elegido a partir de, por ejemplo, mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, y / o h13.2v3, como se describe en la presente invención. En otra realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo incluye por lo menos una o dos regiones variables de cadena pesada de un anticuerpo elegido a partir de, por ejemplo, mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2 y / o h13.2v3, como se describe en la presente invención. En otra realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo comprende por lo menos una o dos regiones variables de cadena liviana de un anticuerpo elegido a partir de, por ejemplo, mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, y / o h13.2v3, como se describe en la presente invención. Aún en otra realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo incluye por lo menos una, dos, o tres regiones que determinan la complementariedad (CDR) de una región variable de cadena pesada de un anticuerpo elegido a partir de, por ejemplo, mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, y / o h13.2v3, como se describe en la presente invención, o al menos particularmente los amino ácidos de aquellas CDR que entran en contacto con IL-13. Aún en otra realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo comprende por lo menos una, dos o tres CDR de una región variable de cadena liviana de un anticuerpo elegido a partir de, por ejemplo, mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, y / o h13.2v3, como se describe en la presente invención, o al menos particularmente los amino ácidos de aquellas CDR que entran en contacto con IL-13. Aún en otra realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo incluye por lo menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR de las regiones variables de cadena pesada y de cadena liviana de un anticuerpo elegido a partir de, por

ejemplo, mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, y / o h13.2v3, como se describe en la presente invención.

[0017] En una realización preferida, la proteína incluye todos las seis CDR de mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, y/o h13.2v3 o CDR estrechamente relacionadas, por ejemplo CDR que son idénticas o que tienen al menos una alteración de aminoácido, pero no más de dos, tres o cuatro alteraciones (por ejemplo, sustituciones, supresiones o inserciones, por ejemplo, sustituciones conservadoras). Opcionalmente, la proteína puede incluir cualquier CDR descrita aquí.

[0018] Aún en otra realización, el anticuerpo o su fragmento incluye al menos uno, dos o tres bucles hipervariables de Chothia de una región variable de cadena pesada de un anticuerpo seleccionado de, por ejemplo, mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, y/o h13.2v3, como se describe aquí, o al menos particularmente los aminoácidos de aquellos bucles hipervariables que entran en contacto con IL-13. Aún en otra realización, el anticuerpo o su fragmento incluye al menos uno, dos o tres bucles hipervariables de una región variable de cadena liviana seleccionada de, por ejemplo, mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, y/o h13.2v3, como se describe aquí, o al menos incluye los aminoácidos de aquellos bucles hipervariables que entran en contacto con IL-13. Aún en otra realización, el anticuerpo o su fragmento incluye al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis bucles hipervariables de regiones variables de cadenas pesadas y livianas seleccionadas, por ejemplo, mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, y h13./o 2v3, como se describe aquí.

[0019] En otra realización preferida, la proteína incluye todos los seis bucles hipervariables de mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, y/o h13.2v3 o bucles hipervariables estrechamente relacionados, por ejemplo, bucles hipervariables que son idénticos o que tienen al menos una alteración de aminoácido, pero no más de dos, tres o cuatro alteraciones (por ejemplo, sustituciones, supresiones o inserciones, por

ejemplo, sustituciones conservadoras). Opcionalmente, la proteína puede incluir cualquier bucle hipervariable que se describe aquí.

[0020] Aún en otro ejemplo, la proteína incluye al menos uno, dos o tres bucles hipervariables que tienen las mismas estructuras canónicas que los bucles hipervariables correspondientes de mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, y/o h13.2v3, por ejemplo, las mismas estructuras canónicas de al menos el bucle 1 y/o el bucle 2 de los dominios de cadenas variables pesadas y/o livianas de mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, y/o h13.2v3. Véase por ejemplo, Chothia et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227:799-817; Tomlinson et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227:776-798 para descripciones de estructuras canónicas de bucles hipervariables. Estas estructuras se pueden determinar por inspección de las tablas descritas en estas referencias.

[0021] En una materialización, el marco de trabajo de cadenas variables livianas o pesadas (por ejemplo, la región que comprende al menos FR1, FR2, FR3 y opcionalmente FR4) se puede seleccionar de: (a) un marco de trabajo de cadenas variables livianas o pesadas que incluya al menos 80%, 85%, 87% 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 98%, o preferiblemente 100% de residuos del amino ácido de un marco de trabajo humano de cadenas variables livianas o pesadas, por ejemplo, el residuo de un marco de trabajo de cadenas variables livianas o pesadas de un anticuerpo humano maduro, una secuencia de línea germinal humana, una secuencia humana de consenso o un anticuerpo humano como se describe aquí; (b) un marco de trabajo de cadenas variables livianas o pesadas incluyendo de 20% a 80%, 40% a 60%, 60% a 90%, o 70% a 95% de los residuos de amino ácido de un marco de trabajo humano de cadenas variables livianas o pesadas, por ejemplo, un residuo de marco de trabajo de cadenas variables livianas o pesadas de un anticuerpo humano maduro, una secuencia de línea germinal humana, una secuencia humana de consenso; (c) un marco de trabajo no humano (por ejemplo, un marco de trabajo de roedor); o (d) un marco de trabajo no humano que ha sido modificado, por ejemplo, para remover determinantes antigénicos o citogénicos, por ejemplo, desinmunizado, o parcialmente humanizado. En una

realización, la región de marco de trabajo de cadena liviana o pesada (particularmente FR1, FR2 y/o FR3) incluye una secuencia de marco de trabajo de cadena liviana o pesada de al menos 70, 75, 80, 85, 87, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99% idéntica o idéntica a los marcos de trabajo de un segmento VH o un gen germinal humano, por ejemplo, DP-54 o DPK9. En una realización, la región variable de cadena pesada incluye residuos humanos o residuos de secuencia de consenso humano en una o más de las posiciones siguientes (preferiblemente al menos cinco, diez, doce, o todas): (en el FR del dominio variable de una cadena ligera) 4L, 35L, 36L, 38L, 43L, 44L, 58L, 46L, 62L, 63L, 64L, 65L, 66L, 67L, 68L, 69L, 70L, 71L, 73L, 85L, 87L, 98L, y/o (en el FR del dominio variable de una 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).

[0022] En una realización, la proteína incluye al menos una CDR no humana, por ejemplo, una CDR murina, por ejemplo, una CDR de mAb13.2, o su mutante, y al menos un marco de trabajo que difiere de un marco de trabajo de mAb13.2 por al menos un aminoácido, por ejemplo, al menos 5, 8, 10, 12, 15, o 18 aminoácidos. Por ejemplo, las proteínas incluyen uno, dos, tres, cuatro, cinco, o seis de tales CDR no humanas e incluye al menos una diferencia de amino ácido en al menos tres de HC FR1, HC FR2, HC FR3, LC FR1, LC FR2, y LC FR3.

[0023] En una realización, el dominio variable de cadena pesada o liviana de un anticuerpo incluye una secuencia de amino ácido, que al menos es idéntica en un 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% o más a una región variable de un anticuerpo descrito aquí, por ejemplo, mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, y/o h13.2v3; o que difiere en al menos 1 o 5 residuos, pero menos de 40, 30, 20, o 10 residuos, de una región variable de un anticuerpo que se describe aquí.

[0024] En una realización, uno o más dominios variables incluyen posiciones de amino ácidos en la región de marco de trabajo que se derivan de forma variada tanto de un anticuerpo no humano (por ejemplo, un anticuerpo murino como mAb13.2) como de uno humano o de una secuencia germinal. Por ejemplo, el dominio variable incluirá un número de posiciones en las que el residuo de amino ácido es idéntico tanto al anticuerpo no humano como al anticuerpo humano (o una secuencia humana germinal) ya que ambos son idénticos en esa posición. De las posiciones restantes del marco de trabajo donde el humano y el no humano difieren, al menos 50, 60, 70, 80, o 90% de las posiciones del dominio variable son de forma preferente idénticas al anticuerpo humano (o secuencia germinal humana) y no al no humano. Por ejemplo, ninguno, o al menos una, dos, tres o cuatro de tales posiciones remanentes del marco de trabajo pueden ser idénticas al anticuerpo no humano en vez del humano. Por ejemplo, en HC FR1, una o dos de dichas posiciones pueden ser no humanas; en HC FR2, una o dos de dichas posiciones pueden ser no humanas; en LC FR1, una, dos, tres o cuatro de dichas posiciones pueden ser no humanas; en LC FR3, una o dos de dichas posiciones pueden ser no humanas.

[0025] En una realización, la región de cadena variable pesada o liviana de la proteína incluye una secuencia de aminoácido codificada por una secuencia de ácido nucleico que se describe aquí o un ácido nucleico que se torna híbrido en una secuencia de ácido nucleico que aquí se describe (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico específica o una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de amino ácido que aquí se describe) o su complemento, por ejemplo, bajo condiciones de rigor bajo, rigor medio, rigor alto, o de rigor muy alto, u otra condición de hibridación que se describe aquí.

[0026] En otra realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo incluye por lo menos una, dos, tres o cuatro regiones de unión al antígeno, por ejemplo, regiones variables que tienen secuencias de aminoácidos como se establece en la Tabla 3 (SEQ ID NOs:13, 14, 15, 16, ó 36 para VH, y / o SEQ ID NOs: 9, 10, 11, 12, ó 35 para VL), o una secuencia esencialmente idéntica a la misma (por ejemplo, una secuencia por lo

menos de alrededor del 85%, 90%, 95%, 99% o más idéntica a la misma, o la cual difiere por no más de 1, 2, 5, 10, ó 15 residuos de aminoácidos de las SEQ ID NOs:9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 35, ó 36). En otra realización, el anticuerpo incluye un dominio VH y / o VL codificado por un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos como se establece en la Tabla 2 (SEQ ID NOs:5, 6, 7, 8, ó 34 para VH, y / o SEQ ID NOs:1, 2, 3, 4, ó 33 para VL), o una secuencia esencialmente idéntica a la misma (por ejemplo, una secuencia de por lo menos alrededor del 85%, 90%, 95%, 99% o más idéntica a la misma, o la cual difiere en no más de 3, 6, 15, 30, ó 45 nucleótidos de las SEQ ID NOs:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 33, ó 34). Aún en otra realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo comprende por lo menos una, dos o tres CDR de una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en la Tabla 1 (SEQ ID NOs:22, 23, ó 24 para VH CDRs 1-3, respectivamente), o una secuencia esencialmente homóloga a la misma (por ejemplo, una secuencia de por lo menos alrededor del 85%, 90%, 95%, 99% o más idénticos a la misma, y / o que tenga una o más sustituciones, por ejemplo, sustituciones conservadas). Aún en otra realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo comprende por lo menos una, dos o tres CDR de una región variable de cadena liviana que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en la Tabla 1 (SEQ ID NOs:19, 20, ó 21 para VL CDR 1-3, respectivamente), o una secuencia esencialmente homóloga a la misma (por ejemplo, una secuencia de por lo menos alrededor del 85%, 90%, 95%, 99% o más idéntica a la misma, y / o que tenga una o más sustituciones, por ejemplo, sustituciones conservadas). Aún en otra realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo comprende por lo menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR de las regiones variables de cadena pesada y liviana que tienen una secuencia de aminoácidos como se establece en la Tabla 1 (SEQ ID NO : 22, 23, 24 para VH CDR 1-3, respectivamente; y SEQ ID NO:19, 20, ó 21 para VL CDR 1-3, respectivamente), o una secuencia esencialmente homóloga a la misma (por ejemplo, una secuencia de por lo menos alrededor del 85%, 90%, 95%, 99% o más idéntica a la misma, y / o que tenga una o más sustituciones, por ejemplo, sustituciones conservadas).

[0027] En otra realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo comprende al menos uno, dos o tres bucles hipervariables de Chothia de una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de bucles hipervariables VH Chothia 1-3, respectivamente, o una secuencia sustancialmente homóloga (por ejemplo, una secuencia que sea idéntica aproximadamente en al menos un 85%, 90%, 95%, 99% o más, y/o que tenga una o más sustituciones, por ejemplo, sustituciones conservadas). Aún en otra realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo comprende al menos uno, dos o tres bucles hipervariables de Chothia de una región variable de cadena liviana que tiene una secuencia de aminoácidos de bucles hipervariables VH Chothia 1-3, respectivamente, o una secuencia sustancialmente homóloga (por ejemplo, una secuencia que sea idéntica aproximadamente en al menos un 85%, 90%, 95%, 99% o más, y/o que tenga una o más sustituciones, por ejemplo, sustituciones conservadas).

[0028] En otra realización, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo comprende una región humana IgG1 constante que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO:17 o una secuencia esencialmente homóloga a la misma (por ejemplo, una secuencia de por lo menos alrededor del 85%, 90%, 95%, 99% o más idéntica a la misma, o la cual difiere en no más del 1, 2, 5, 10, 50, ó 100 residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO:17), o en posiciones correspondientes. En otra realización, el anticuerpo anti-IL-13 comprende una cadena kappa humana constante que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO:18 o una secuencia esencialmente homóloga a la misma (por ejemplo, una secuencia de por lo menos alrededor del 85%, 90%, 95%, 99% o más idéntica a la misma, o la cual difiere en no más del 1, 2, 5, 10, 20, ó 50 residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO:18). Aún en otra realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo comprende una región humana IgG1 constante y una cadena kappa humana constante, por ejemplo, como se describe en la presente invención.

[0029] Aún en otra realización, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo comprende un domino variable de cadena pesada que se contacta con IL-13, de manera

típica IL-13 humana, por medio de las uniones de hidrógeno y por lo menos uno, dos, tres o cuatro residuos elegidos a partir de, por ejemplo, Serina 50 (CDR2), Serina 53 (CDR2), Tirosina 101 (CDR3), Tirosina 102 (CDR3), o una sustitución conservadora de la misma, de la región variable de cadena pesada que se muestra en la FIG. 29 de acuerdo con el esquema de numeración de secuencia lineal (véase también, por ejemplo, FIG. 17) o en posiciones que corresponden a los residuos de dichos aminoácidos en el dominio variable de cadena pesada. En una realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo comprende una región variable de cadena pesada que se pone en contacto con IL-13, de manera típica IL-13 humana, por medio de las fuerzas de van der Waals en por lo menos, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece o catorce residuos elegidos a partir de, por ejemplo, Isoleucina 30 (CDR1), Serina 31 (CDR1), Alanina 33 (CDR1), Triptofano 47, Serina 50 (CDR2), Serina 52 (CDR2), Serina 53 (CDR2), Tirosina 58 (CDR2), Leucina 98 (CDR3), Aspartato 99 (CDR3), Glicina 100 (CDR3), Tirosina 101 (CDR3), Tirosina 102 (CDR3), Fenilalanina 103 (CDR3), o una sustitución conservadora de la misma, de la región variable de cadena pesada que se muestra en la FIG. 29 de acuerdo con el esquema de numeración de secuencia lineal (véase también, por ejemplo, la FIG. 17) o en posiciones que corresponden a los residuos de dichos aminoácidos en el dominio variable de cadena pesada. En otra realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo comprende una región variable de cadena pesada que se pone en contacto con IL-13, de manera típica IL-13 humana, por medio de las uniones de hidrógeno en por lo menos uno, dos, tres o cuatro residuos elegidos a partir de, por ejemplo, Serina 50 (CDR2), Serina 53 (CDR2), Tirosina 101 (CDR3), Tirosina 102 (CDR3), o una sustitución conservadora de la misma, y por medio de las fuerzas de van der Waals siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece o catorce residuos elegidos a partir de, por ejemplo, Isoleucina 30 (CDR1), Serina 31 (CDR1), Alanina 33 (CDR1), Triptofano 47, Serina 50 (CDR2), Serina 52 (CDR2), Serina 53 (CDR2), Tirosina 58 (CDR2), Leucina 98 (CDR3), Aspartato 99 (CDR3), Glicina 100 (CDR3), Tirosina 101 (CDR3), Tirosina 102 (CDR3), Fenilalanina 103 (CDR3), o una sustitución conservadora de la misma, de la región

variable de cadena pesada que se muestra en la FIG. 29 de acuerdo con el esquema de numeración de secuencia lineal (véase también, por ejemplo, la FIG. 17) o en posiciones que corresponden a los residuos de dichos aminoácidos en el dominio variable de cadena pesada.

[0030] En otra realización, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo comprende una región variable de cadena liviana que se pone en contacto con IL-13, de manera típica IL-13 humana, por medio de las uniones de hidrógeno en por lo menos uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos elegidos a partir de, por ejemplo, Aspargina 31 (CDR1), Tirosina 32 (CDR1), Lisina 34 (CDR1), Aspargina 96 (CDR3), Aspartato 98 (CDR3), o una sustitución conservadora de la misma, de la región variable de cadena liviana que se muestra en la FIG. 30 de acuerdo con el esquema de numeración de secuencia lineal (véase también, por ejemplo, la FIG. 18). Aún en otra realización, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo comprende una región variable de cadena liviana que se pone en contacto con IL-13, de manera típica IL-13 humana, por medio de las fuerzas de van der Waals en por lo menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete residuos elegidos a partir de, por ejemplo, Aspargina 31 (CDR1), Tirosina 32 (CDR1), Lisina 34 (CDR1), Arginina 54 (CDR2), Aspargina 96 (CDR3), Aspartato 98 (CDR3), Triptofano 100 (CDR3), o una sustitución conservadora de la misma, de la región variable de cadena liviana que se muestra en la FIG. 30 de acuerdo con el esquema de numeración de secuencia lineal (véase también, por ejemplo, FIG. 18). En otra realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo comprende una región variable de cadena liviana que se pone en contacto con IL-13, de manera típica IL-13 humana, por medio de las uniones de hidrógeno en por lo menos uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos elegidos a partir de, por ejemplo, Aspargina 31 (CDR1), Tirosina 32 (CDR1), Lisina 34 (CDR1), Aspargina 96 (CDR3), Aspartato 98 (CDR3), o una sustitución conservadora de la misma, de la región variable de cadena liviana, y por medio de las fuerzas de Van der Waals en por lo menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete residuos elegidos a partir de, por ejemplo, Aspargina 31 (CDR1), Tirosina 32 (CDR1),

Lisina 34 (CDR1), Arginina 54 (CDR2), Aspargina 96 (CDR3), Aspartato 98 (CDR3), Triptofano 100 (CDR3), o una sustitución conservadora de la misma, de la región variable de cadena liviana que se muestra en la FIG. 30 de acuerdo con el esquema de numeración de secuencia lineal (véase también, por ejemplo, la FIG. 18).

[0031] En otra realización, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo comprende las regiones variables de cadena pesada y liviana que entran en contacto con IL-13, de manera típica, por ejemplo, IL-13 humana, por medio de las uniones de hidrógeno como se describe en la presente invención. Aún en otra realización, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo comprende las regiones variables de cadena pesada y liviana que entran en contacto con IL-13, de manera típica, por ejemplo, IL-13 humana, por medio de las fuerzas de van der Waals como se describe en la presente invención. En una realización, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo comprende las regiones variables de cadena pesada y liviana que entran en contacto con IL-13, de manera típica, por ejemplo, IL-13 humana, por medio de las uniones de hidrógeno y de las fuerzas de van der Waals como se describe en la presente invención.

[0032] Aún en otra realización, el antagonista de IL-13, por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo, comprende una región variable de cadena pesada que tenga una o más mutaciones en la posiciones 13, 19, 40, 42, 44, 75, 77, 83, 87, 92, ó 113 de la SEQ ID NO:14. En otra realización, la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo comprende además una mutación en la posición 3 de la SEQ ID NO:14. En una realización, la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo comprende una o más de las siguientes sustituciones: Lisina reemplazada por Glutamina en la posición 3, Lisina reemplazada por Glutamina en la posición 13, Lisina reemplazada por Arginina en la posición 19, Treonina reemplazada por Alanina en la posición 40, Glutamato reemplazado por Glicina en la posición 42, Arginina reemplazada por Glicina en la posición 44, Arginina reemplazada por Lisina en la posición 75, Isoleucina reemplazada

por Serina en la posición 77, Serina reemplazada por Aspargina en la posición 83, Serina reemplazada por Alanina en la posición 87, Metionina reemplazada por Valina en la posición 92, o Treonina reemplazada por Leucina en la posición 113 de la SEQ ID NO:14.

[0033] En otra realización, el antagonista de la IL-13, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo, comprende una región variable de cadena liviana que tenga una o más mutaciones en las posiciones 3, 9, 12, 13, 15, 17, 19, 22, 46, 47, 62, 64, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 87, ó 108 de la SEQ ID NO:10. En otra realización, la región variable de cadena liviana del anticuerpo anti-IL-13, o un fragmento del mismo, comprende además una o más mutaciones en las posiciones 4 ó 72 de la SEQ ID NO:10. En una realización, la región variable de cadena liviana del anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo comprende una o más de las siguientes sustituciones: Valina reemplazada por Glutamina en la posición 3, Leucina reemplazada por Metionina en la posición 4, Alanina reemplazada por Serina en la posición 9, Alanina reemplazada por Serina en la posición12, Valina reemplazada por Alanina en la posición 13, Leucina reemplazada por Valina en la posición 15, Glutamina reemplazada por Aspartato en la posición 17, Alanina reemplazada por Valina en la posición 19, Serina reemplazada por Treonina en la posición 22, Glutamina reemplazada por Lisina en la posición 46, Serina reemplazada por Alanina en la posición 47, Isoleucina reemplazada por Valina en la posición 62, Alanina reemplazada por Serina en la posición 64, Arginina reemplazada por Glicina en la posición 72, Aspargina reemplazada por Serina en la posición 80, Prolina reemplazada por Serina en la posición 81, Valina reemplazada por Leucina en la posición 82, Glutamato reemplazado por Glutamina en la posición 83, Alanina reemplazada por Prolina en la posición 84, Aspartato reemplazado por Glutamato en la posición 85, Valina reemplazada por Fenilalanina en la posición 87, o Leucina reemplazada por Valina en la posición 108 de la SEQ ID NO:10.

[0034] En otra realización, el fragmento aglutinante del anticuerpo o antígeno incluye una o más CDR que tienen la estructura de conformación de una CDR descrita en la

Tabla 10 (de la solicitud 16163-029001) ± una desviación media cuadrática (RMSD) de no más de 1.5, 1.2, 1.1, o 1.0 Angstroms, la Tabla 11 (de la solicitud 16163-029001) ± una RMSD de no más de 1.5, 1.2, 1.1, o 1.0 Angstroms, o la Tabla 12 (de la solicitud 16163-029001) ± una RMSD de no más de 1.5, 1.2, 1.1, o 1.0 Angstroms. Por ejemplo, uno, dos, o tres de las CDR del dominio variable de cadena pesada (por ejemplo, particularmente en CDR3, o en al menos dos CDRs, por ejemplo, CDR1 y CDR3, CDR2 y CDR3, o en todas las tres CDR) tienen una RMSD de no más de 1.5, 1.2, 1.1, o 1.0 Angstroms relativos a esas estructuras. En la realización, su fragmento aglutinante del anticuerpo o antígeno incluye un dominio variable que, como un todo, tiene una conformación central de una CDR descrita en la Tabla 10 (de la solicitud 16163-029001) ± una desviación media cuadrática (RMSD) de no más de 1.5, 1.2, 1.1, o 1.0 Angstroms, la Tabla 11 (de la solicitud 16163-029001) ± una RMSD de no más de 1.5, 1.2, 1.1, o 1.0 Angstroms, o la Tabla 12 (de la solicitud 16163-029001) ± una RMSD de no más de 1.5, 1.2, 1.1, o 1.0 Angstroms. El dominio variable también puede ser idéntico en un 70%, 80%, 85%, 87%, 90%, 92%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% al anticuerpo que se describe aquí, por ejemplo, en la región CDR y/o en las regiones del marco de trabajo.

[0035] Aún en otra realización, el antagonista de IL-13, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo, comprende una región variable de cadena pesada que tenga una o más mutaciones en las posiciones 3, 13, 19, 40, 42, 44, 75, 77, 83, 87, 92, or 113 de la SEQ ID NO:14 (por ejemplo, las mutaciones como se describen en la presente invención), y una región variable de cadena liviana que tenga una o más mutaciones en las posiciones 3, 4, 9, 12, 13, 15, 17, 19, 22, 46, 47, 62, 64, 72, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 87, o 108 de la SEQ ID NO:10 (por ejemplo, las mutaciones como se describen en la presente invención).

[0036] El antagonista de IL-13, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo descripto en la presente invención, puede ser derivado o vinculado con otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, un fragmento

Fab). Por ejemplo, la proteína de fusión o un anticuerpo, o la porción de unión al antígeno, se pueden unir funcionalmente (por ejemplo, por medio de acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares tales como un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o multiespecífico), toxinas, radioisótopos, agentes citotóxicos o citostáticos, entre otros.

[0037] Aún en otra realización, el antagonista de IL-13, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo que se describen en la presente invención, o una composición farmacéutica de los mismos, se administra solo o en terapia combinada, es decir, combinado con otros agentes, por ejemplo, agentes terapéuticos, los cuales son útiles para tratar los trastornos asociados con la IL-13. Los ejemplos de trastornos asociados con la IL-13 incluyen, pero no se limitan a, los trastornos elegidos a partir de uno o más de: trastornos respiratorios, por ejemplo, asma (por ejemplo, asma alérgica y no alérgica (por ejemplo, asma debida a la infección con, por ejemplo, el virus sincitial respiratorio (RSV), por ejemplo, en los niños de más corta edad)), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), y otras condiciones que implican inflamación de las vías aéreas, eosinofilia, fibrosis y producción excesiva de moco, por ejemplo, fibrosis quística y fibrosis pulmonar; trastornos atópicos, por ejemplo, que resultan de una mayor sensibilidad a la 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), los órganos gastrointestinales (por ejemplo, las enfermedades intestinales inflamatorias (IBD), tales como la colitis ulcerosa y / o la enfermedad de Crohn), el hígado (por ejemplo, la cirrosis, el carcinoma hepatocelular), y el escleroderma; los tumores o los cánceres (por ejemplo, los tumores de tejido blando), como la leucemia, el glioblastoma, y el linfoma, por ejemplo, el linfoma de Hodgkin; las infecciones virales (por ejemplo, de HTLV-1); la fibrosis de otros órganos, por ejemplo, la fibrosis hepática, (por ejemplo, la fibrosis provocada por una hepatitis B

y / o el virus C); y la supresión de la expresión de las respuestas inmunes protectoras tipo 1, (por ejemplo, durante la vacunación), como se describe en la presente invención.

[0038] La terapia combinada puede incluir uno o más antagonistas de la IL-13, por ejemplo, los anticuerpos anti-IL-13 o los fragmentos de los mismos, formulados en forma conjunta con, y / o administrados en forma conjunta con, uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, uno o más inhibidores de la citoquina y del factor de crecimiento, inmunosupresores, agentes antiinflamatorios (por ejemplo, los agentes sistémicos antiinflamatorios), los inhibidores metabólicos, los inhibidores de las enzimas, y / o los agentes citotóxicos o citostáticos, según se describe con mayor detalle en la presente invención.

[0039] Los ejemplos de los agentes terapéuticos adicionales preferidos que se pueden administrar en forma conjunta y / o formular en forma conjunta con uno o más antagonistas de la IL-13, por ejemplo, los anticuerpos anti-IL-13 o los fragmentos de los mismos, incluyen pero no se limitan a, uno o más de: los esteroides inhalados; los agonistas beta, por ejemplo, los agonistas beta de corta duración o de acción prolongada; los antagonistas de los leucotrienos o los receptores de los leucotrienos; las drogas combinadas tales como ADVAIR®; Los inhibidores de IgE, por ejemplo, los anticuerpos anti-IgE (por ejemplo, XOLAIR®); los inhibidores de la fosfodiesterasa (por ejemplo, Los inhibidores de PDE4); las xantinas; las drogas anticolinérgicas; los agentes estabilizadores de los mastocitos tales como el cromolin; los inhibidores de la IL-4; los inhibidores de la IL-5; los inhibidores de la eotaxina / CCR3; y los antihistamínicos. Las combinaciones mencionadas se pueden utilizar para tratar el asma y otros trastornos respiratorios. Los ejemplos adicionales de los agentes terapéuticos que se pueden administrar en forma conjunta y / o formular en forma conjunta con uno o más de los anticuerpos anti-IL-13 o los fragmentos de los mismos incluyen uno o más de: Los antagonistas de TNF (por ejemplo, un fragmento soluble de un receptor de TNF, por ejemplo, el receptor p55 o p75 humano de TNF o los derivados del mismo, por ejemplo, 75 kd TNFR-IgG (proteína de fusión receptor-IgG TNF de 75 kD,

ENBREL™)); los antagonistas de la enzima del TNF, por ejemplo, los inhibidores de la enzima convertidora del TNFa (TACE)); los antagonistas de los receptores muscarínicos; los antagonistas TGF-J; el interferón gamma; la perfenidona; los agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, el metotrexato, la leflunomida, o un sirolimus (rapamicina) o un análogo del mismo, por ejemplo, CCI-779; COX2 y los inhibidores de cPLA2; las NSAID; los inmunomoduladores; los inhibidores de p38, TPL-2, los inhibidores de Mk-2 y NFRB, entre otros.

[0040] En otro aspecto, esta solicitud suministra composiciones, por ejemplo, las composiciones farmacéuticas que incluyen un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico y por lo menos un antagonista de la IL-13, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo que se describen en la presente invención. En una realización, las composiciones, por ejemplo, las composiciones farmacéuticas, comprenden una combinación de dos o más de uno de los antagonistas de la IL-13 mencionada con anterioridad, por ejemplo, los anticuerpos anti-IL-13 o los fragmentos de los mismos. Las combinaciones del antagonista de IL-13, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo, y una droga, por ejemplo, un agente terapéutico (por ejemplo, uno o más inhibidores de la citoquina y del factor de crecimiento, los inmunosupresores, los agentes antiinflamatorios (por ejemplo, los agentes antiinflamatorios sistémicos), los inhibidores metabólicos, los inhibidores de las enzimas, y / o los agentes citotóxicos o citostáticos, como se describe en la presente invención) están comprendidos dentro del alcance de la invención.

[0041] Esta solicitud también presenta los ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos, que codifican las regiones variables de cadena pesada y liviana de los anticuerpos anti-IL-13, y los fragmentos de los mismos, como se describe en la presente invención. Por ejemplo, la solicitud presenta, una primer y segundo ácido nucleico que codifica las regiones variables de cadena pesada y liviana, respectivamente, de un anticuerpo anti-IL-13 elegido a partir de uno o más de, por ejemplo, mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, y / o h13.2v3, como se describe en la presente invención.

[0042] En otro aspecto, la solicitud presenta las células huesped y los vectores que contienen los ácidos nucleicos que se describen en la presente invención.

[0043] La solicitud también presenta el epitoto de la IL-13, por ejemplo, la IL-13 humana, reconocida por uno o más de, por ejemplo, mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, y / o h13.2v3. En una realización, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo se une a un epitopo que comprende los residuos 81-93 y / o 114-132 de IL-13 humana (SEQ ID NO:31), o una forma modificada de los mismos (por ejemplo, un fragmento o una forma sustituída (por ejemplo, sustituída de manera conservadora) del mismo). En una realización, el epitopo de la IL-13 humana comprende uno o más de: Glutamato en la posición 49, Aspargina en la posición 53, Glicina en la posición 69, Prolina en la posición 72, Histidina en la posición 73, Lisina en la posición 74, y Arginina en la posición 86 de la SEQ ID NO:32, o una sustitución de aminoácidos conservada de los mismos.

[0044] En otro aspecto, esta solicitud presenta un método de modulación, por ejemplo, de interferencia con (por ejemplo, inhibir, bloquear o reducir de otra manera), una interacción, por ejemplo, la unión, entre IL-13 y un cognado de proteína aglutinante IL-13, por ejemplo, un complejo receptor de la IL-13, por ejemplo, un complejo que comprenda la IL-13RI1 y la IL-4RI, o su subunidad. La modulación puede ser efectuada *in vivo* o *in vitro*. En otras realizaciones, el antagonista de la IL-13, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo, se une a la IL-13, e interfiere con (por ejemplo, inhibe, bloquea o reduce de otra manera) una interacción, por ejemplo, la unión entre la IL-13 y una subunidad del complejo receptor de la IL-13, por ejemplo, la IL-13RI1 o la IL-4RI, en forma individual. Aún en otra realización, el antagonista de la IL-13, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo, se une a la IL-13, e interfiere con (por ejemplo, inhibe, bloquea o reduce de otra manera) una interacción, por ejemplo, la unión entre la IL-13/IL-13RI1 y la IL-4RI. En otra realización, el antagonista de la IL-13, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo, se une a la IL-13, e interfiere con (por ejemplo, inhibe, bloquea o

reduce de otra manera) una interacción, por ejemplo, la unión entre la IL-13/IL-4RI y la IL-13RI1. De manera típica, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo interfiere con (por ejemplo, inhibe, bloquea o reduce de otra manera) una interacción, por ejemplo, la unión de IL-13/IL-13RI1 con la IL-4RI.

[0045] El método de referencia se puede utilizar en células *in vitro* (por ejemplo, en un sistema libre de células), en cultivos, por ejemplo *in vitro* o *ex vivo*. Por ejemplo, las células que expresan los receptores de la IL-13 se pueden cultivar *in vitro* en el medio de cultivo y el paso de contacto se puede realizar por medio del agregado e uno o más de los anticuerpos anti-IL-13 o los fragmentos de los mismos, por ejemplo, los anticuerpos anti-IL-13 o los fragmentos de los mismos como se describe en la presente invención, al medio de cultivo. De manera alternativa, el método se puede realizar sobre las células presentes en un paciente, por ejemplo, como parte de un protocolo *in vivo* (por ejemplo, terapéutico o profiláctico).

[0046] En otro aspecto, esta solicitud presenta un método para tratar (por ejemplo, curar, suprimir, mejorar, demorar o evitar el inicio de, la recurrencia o la recidiva de) o prevenir un trastorno asociado con la IL-13, en un paciente. El método incluye: el hecho de administrar al paciente un agente aglutinante IL-13, (particularmente un antagonista), por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo como se describe en la presente invención, en una cantidad suficiente para tratar o prevenir el trastorno asociado con la IL-13. El antagonista de la IL-13, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo, se puede administrar al paciente, solo o en combinación con otras modalidades terapéuticas como se describe en la presente invención. En una realización, el paciente es mamífero, por ejemplo, un humano que sufre de uno o más trastornos asociados con la IL-13, que incluyan, por ejemplo, los trastornos respiratorios (por ejemplo, el asma (por ejemplo, el asma alérgica y no alérgica), la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), y otras condiciones que implican la inflamación de las vías aéreas, la eosinofilia, la fibrosis y la producción excesiva de moco; los trastornos atópicos (por ejemplo, la dermatitis atópica y la rinitis alérgica); las

condiciones inflamatorias y / o autoinmunes de la piel, de órganos gastrointestinales (por ejemplo, las enfermedades intestinales inflamatorias (IBD), tales como la colitis ulcerosa y / o la enfermedad de Crohn), y el hígado (por ejemplo, la cirrosis, la fibrosis); el escleroderma; los tumores y los cánceres, por ejemplo, el linfoma de Hodgkin como se describe en la presente invención. De tal manera que la revelación incluye el uso de un agente aglutinante IL-13 (como un anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo como se describe en la presente invención) para el tratamiento que se describe en la presente invención y el uso de un agente aglutinante IL-14 (como un anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo como se describe en la presente invención) para la preparación de un medicamento para un tratamiento descrito en la presente invención.

[0047] Los ejemplos de trastornos asociados con la IL-13 incluyen, pero no se limitan a un trastorno elegido a partir de uno o más de: los trastornos respiratorios, por ejemplo, el asma (por ejemplo, el asma alérgica y no alérgica (por ejemplo, el asma debida a la infección con, por ejemplo, el virus sincitial respiratorio (RSV), por ejemplo, en los niños de más corta edad)), la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), y otras condiciones que implican la inflamación de las vías aéreas, la eosinofilia, la fibrosis y la producción excesiva de moco, por ejemplo, la fibrosis quística y la fibrosis pulmonar; los trastornos atópicos, por ejemplo, que resultan de una mayor sensibilidad a la IL-13 (por ejemplo, la dermatitis atópica, la urticaria, el eczema, la rinitis alérgica, y la enterogastritis alérgica); las condiciones inflamatorias y / o autoinmunes de la piel (por ejemplo, la dermatitis atópica), de los órganos gastrointestinales (por ejemplo, las enfermedades intestinales inflamatorias (IBD), tales como la colitis ulcerosa y / o la enfermedad de Crohn), del hígado (por ejemplo, la cirrosis, el carcinoma hepatocelular), y el escleroderma; los tumores y los cánceres (por ejemplo, los tumores de tejido blando y sólido), como la leucemia, el glioblastoma, y el linfoma, por ejemplo, el linfoma de Hodgkin; las infecciones virales (por ejemplo, de HTLV-1); la fibrosis de otros órganos, por ejemplo, la fibrosis hepática, (por ejemplo, la fibrosis provocada por una hepatitis B

y / o el virus C); y la supresión de la expresión de las respuestas inmunes protectoras tipo 1, (por ejemplo, durante la vacunación), como se describe en la presente invención.

[0048] En otras realizaciones, esta solicitud suministra un método para tratar (por ejemplo, reducir, mejorar) o evitar uno o más síntomas asociados con un trastorno respiratorio, por ejemplo, el asma (por ejemplo, el asma alérgica y no alérgica); las alergias; la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD); una condición que involucra la inflamación de las vías aéreas, la eosinofilia, la fibrosis y la producción excesiva de moco, por ejemplo, la fibrosis quística y la fibrosis pulmonar. Por ejemplo, los síntomas del asma incluyen, pero no se limitan a, la respiración con dificultad, falta de aliento, broncoconstricción, hipersensibilidad de las vías respiratorias, disminución de la capacidad respiratoria, fibrosis, inflamación de las vías respiratorias y producción de moco. El método comprende la administración al paciente de un antagonista de la IL-13, por ejemplo, un anticuerpo de la IL-13 o un fragmento del mismo, en una cantidad suficiente para tratar (por ejemplo, reducir, mejorar) o prevenir uno o más síntomas. El anticuerpo de la IL-13 se puede administrar con fines terapéuticos o profilácticos o ambos. El antagonista de la IL-13, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-13, o un fragmento del mismo, se puede administrar al paciente, solo o combinado con otras modalidades terapéuticas como se describe en la presente invención. Con 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 invención.

[0049] En otro aspecto, esta solicitud suministra un método para detectar la presencia de la IL-13 en una muestra *in vitro* (por ejemplo, una muestra biológica, como por ejemplo suero, plasma, tejido, biopsia). El método de referencia se puede utilizar para diagnosticar un trastorno, por ejemplo, un trastorno inmune asociado con las células. El método incluye: (i) poner en contacto la muestra o una muestra de control con el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo como se describe en la presente invención; y (ii) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo, y la muestra o la muestra de control, en la cual un cambio

significativo desde el punto de vista estadístico en la formación del complejo en la muestra relativa a la muestra de control es indicativo de la presencia de la IL-13 en la muestra.

[0050] Aún en otro aspecto, esta solicitud suministra un método para detectar la presencia de la IL-13 *in vivo* (por ejemplo, imágenes *in vivo* en un paciente). El método de referencia se puede utilizar para diagnosticar un trastorno, por ejemplo, un trastorno asociado con la IL-13. El método incluye: (i) administrar el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo como se describe en la presente invención a un paciente o a un paciente de control en condiciones que permiten la unión del anticuerpo o de un fragmento a la IL-13; y (ii) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo o un fragmento y la IL-13, en la cual un cambio significativo desde el punto de vista estadístico en la formación del complejo en el paciente relativo al paciente de control es indicativo de la presencia de IL-13.

[0051] Con preferencia, el anticuerpo o un fragmento del mismo es directa o indirectamente rotulado con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o no unido. Las substancias detectables adecuadas incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radioactivos.

[0052] También se revelan los métodos para liberar o apuntar a un agente, por ejemplo, un agente terapéutico o citotóxico, a una célula *in vivo* que expresa la IL-13.

[0053] Los kits que comprenden el antagonista de IL-13s que se describen en la presente invención, por ejemplo, los anticuerpos anti-IL-13 o un fragmento de los mismos, para usos terapéuticos y diagnósticos también se encuentran dentro del alcance de la solicitud.

[0054] En otro aspecto, la solicitud brinda métodos para proveer un anticuerpo que incluye un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena liviana.

Los métodos incluyen la preparación de un anticuerpo (o un ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo) por medio del uso de una o más regiones del marco de trabajo de DP-54 y DPK-9 o regiones del marco de trabajo que son idénticas al menos en un 75, 80, 82, 85, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, o 98% a una o más regiones del marco de trabajo de DP-54 y DPK-9. En una realización, el método incluye la ingeniería de CDR o porciones de CDR de un anticuerpo no humano en el contexto de un dominio variable que incluye marcos de trabajo DP-54 y DPK-9 en el dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de cadena liviana, respectivamente, o un dominio variable que incluye regiones de marco de trabajo idénticas en al menos un 75, 80, 82, 85, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, o 98% o más regiones de marco de trabajo de DP-54 y DPK-9. Los ácidos nucleicos que incluyen secuencias de codificación de cadenas de proteína que incluye tales dominios variables que pueden ser expresados en células de mamíferos, por ejemplo, culturas de células de tejido.

[0055] En un aspecto relacionado, la solicitud presenta un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo artificial, que incluye un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena liviana, donde el dominio variable de cadena pesada incluye el uso de una o más regiones de marco de trabajo de DP-54 o regiones de marco de trabajo idénticas en al menos un 75, 80, 82, 85, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, o 98% o más regiones de marco de trabajo de DP-54, y el dominio variable de cadena liviana incluye el uso de una o más regiones de marco de trabajo de DPK-9 o regiones de marco de trabajo idénticas en al menos un 75, 80, 82, 85, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, o 98% o más regiones de marco de trabajo de DPK-9. Una o más de las CDR y/o bucles hipervariables generalmente no son humanos, por ejemplo, de un anticuerpo no humano tales como anticuerpos murinos. En una realización, el anticuerpo se une a un antígeno humano, por ejemplo, IL-13 o un antígeno que no sea IL-13.

[0056] Otras características y ventajas se harán evidentes a partir de la descripción y de las reivindicaciones siguientes que se detallan.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0057] FIG. 1: Parámetros cinéticos de la unión de mAb13.2 con la IL 13 humana. Interacciones de unión entre la IL-13 botinilada inmovilizada hasta un chip de estreptavidina 69 RU y el anticuerpo monoclonal mAb13.2, el anticuerpo monoclonal mAb13.4, o el anticuerpo monoclonal mAb13.9 están representadas como unidades de resonancia (RU; eje y) en el tiempo (eje x). También se muestran las constantes cinéticas para mAb13.2.

[0058] FIG. 2: Parámetros cinéticos de la unión de mAb13.2 a la IL-13. La interacción de la unión entre varias dosis de IL-13 humana y el anticuerpo monoclonal mAb13.2 inmovilizado hasta un chip de BIACORE^3 se representa como la diferencia de resonancia (RU; eje y) en el tiempo (eje x). También se muestran las constantes cinéticas para mAb13.2.

[0059] FIG. 3: Unión del anticuerpo monoclonal mAb13.2 a la IL-13 nativa humana. La FIG. muestra el valor promedio de absorbencia (A_{450}; eje y) de la unión de mAb13.2 biotilizada a FLAG-IL-13 humana en presencia de mayores concentraciones (eje x) de la IL-13 recombinante humana (♦), la IL-13 recombinante de murino(●), o de la IL-13 nativa humana (Δ) aislada a partir de células mononucleares de sangre medular activada por mitógenos, Th2 distorsionada.

[0060] FIG. 4: El anticuerpo monoclonal mAb13.2 se une a y neutraliza la forma de variante de ARG de la IL-13 humana. **(A)** La respuesta (eje y) de la IL-13 humana o una variante de ARG de la IL-13 expresada en forma recombinante pasada sobre mAb13.2 biotilinada inmovilizada hasta un chip BIACORE^3 se muestra como una función de tiempo (eje x). **(B)** Se muestra la proliferación de las células TF1 (eje y) incubadas con mayores concentraciones de mAb13.2 (eje x) y ya sea IL-13 recombinante humana o bien una variante de ARG de la IL-13 expresada en forma recombinante.

[0061] FIG. 5: El anticuerpo monoclonal mAb13.2 inhibe la bioactividad de la IL-13 humana con un IC50 comparable al de un receptor soluble de la IL-13. La proliferación de la línea celular TF1 dependiente de la IL-13, según se determinó por medio de la incorporación de ^{3}H-timidina, se mide como cpm (eje y) después de 3 días de incubación con IL-13 y mayores concentraciones (eje x) ya sea de mAb13.2 o el receptor soluble de IL-13 (rhuIL-13Ra2).

[0062] FIG. 6: El anticuerpo monoclonal mAb13.2 inhibe la expresión de CD23 mediada por la IL 13, pero no la expresión de la CD23 mediada por la IL 4, en los monocitos humanos normales. **(A)** Se muestra el porcentaje de monocitos que expresaron CD23 de superficie celular (eje y) después de que las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) aisladas a partir del donante sano fueron tratadas durante toda la noche con la concentración indicada (eje x) de la IL-13 recombinante humana (•) o la IL-4 (o). **(B)** Se muestra el porcentaje de monocitos que expresaron la superficie celular CD23 (eje y) después de que se aislaron PBMC de un donante sano se trataron con IL-13 y concentraciones indicadas de mAb13.2 purificado de ratón (eje x). **(C)** Se muestra el porcentaje de monocitos que expresaron la superficie celular CD23 (eje y) después de PBMC aislados a partir de un donante sano se trataron durante toda la nochce con IL-4 y las concentraciones indicadas de mAb13.2 purificado de ratón (eje x).

[0063] FIG. 7: El anticuerpo monoclonal mAb13.2 inhibe la producción de IgE dependiente de la IL 13 por parte de las células B humanas. La concentración de IgE en el sobrenadante aislado a partir de las PBMC cultivadas en el medio solas o en varias combinaciones de PHA, IL-13, anticuerpo de control (ms IgG), mAb13.2, y mAb13.8 (eje x) se muestra como la absorbencia a 450 nm (IgE (O.D.450); eje y).

[0064] FIG. 8: El anticuerpo monoclonal mAb13.2 inhibe la fosforilación de STAT6 mediada por la IL 13 por parte de las células epiteliales humanas. **(A)** Se muestra el análisis de mancha de Western para STAT6 en los lisatos celulares aislados a partir de

las células HT-29 tratadas con la concentración indicada de IL-13. **(B)** Tel gráfico demuestra la cantidad de células HT-29 según lo determinado por medio del análisis citométrico de flujo (recuentos; eje y), que demostraron fluorescencia (fosfo-STAT6; eje x) después de que las células no recibieron tratamiento (histograma completo) o fueron tratadas (histograma incompleto) con IL-13 y manchadas con el anticuerpo monoclonal rotulado con Fluor 488 Alexa^3 para obtener STAT6 fosforilado. **(C)** Los gráficos demuestran la cantidad de células HT-29 según lo determinado por medio del análisis citométrico de flujo (recuentos; eje y), que demostraron fluorescencia (fosfo-STAT6) después de que las células permanecieron sin tratamiento (histogramas completos); o fueron tratadas (histogramas incompletos) con IL-13 (gráfico superior de la derecha), IL-13 y mAb13.8 (gráfico inferior a la izquierda), IL-13 y mAb13.2 (gráfico superior a la derecha), o IL-13 y el anticuerpo de control (msG1) (gráfico inferior a la derecha) y que se mancharon con Fluor 488 ALEXA^3.

[0065] FIG. 9: El anticuerpo monoclonal mAb13.2 evita la eosinofilia *in vivo* pulmonar inducida por *Ascaris*. La FIG. demuestra el porcentaje de eosinófilos hallados en las muestras de lavado broncoalveolar (BAL) (eje y) tomadas de monos cynomolgus no tratados (ascaris/PBS) (●,◉), monos cynomolgus previamente tratados con mAb13.2 (ascaris/mAb13.2) (◆,◈) o monos cynomolgus previamente tratados con mAb13.2 y sometidos a prueba con el antígeno de *Ascaris suum* (ascaris/nueva prueba ~3 meses post-Ab) (□,), antes de la prueba (símbolos oscuros) o 24 horas después de la prueba o de la nueva prueba (símbolos claros) con el antígeno de *Ascaris suum*.

[0066] FIG. 10: Estructura cocristal del fragmento de mAb13.2 Fab con la IL-13 humana. La cristalografía de rayos X del fragmento mAb13.2 Fab revela la cadena liviana con sombreado oscuro y la cadena pesada en un sombreado más claro. También se muestra la estructura de la IL-13 (a la derecha). La FIG. también representa la interacción de la hélice alfa C de la IL-13 con los bucles de CDR del anticuerpo.

[0067] FIG. 11: Análisis de la secuencia de la IL-13 humana que muestra los sitios de contacto con mAb13.2. El panel muestra la secuencia de aminoácidos de la IL-13 humana, en la cual la flecha indica el sitio de division del péptido señal, las cuatro hélices alfa están subrayadas, los sitios de contacto con el anticuerpo de la estructura de cocristal mAb13.2 Fab – IL-13 están resaltados con cuadrados claros, y el residuo de variante de ARG está resaltado en un cuadrado oscuro.

[0068] FIG. 12: Los fragmentos Fab de mAb13.2 se unen a la IL-13 humana. La FIG. muestra el valor promedio de absorbencia (450 nm; eje y) de mAb13.2 biotinilada unida a FLAG-IL-13 humana en presencia de mAb13.2 competidora no rotulada ((♦), los fragmentos de mAb13.2 Fab (●), o el anticuerpo irrelevanta (*) a concentraciones mayores (eje x) expresadas como **(A)** anticuerpo pM o **(B)** sitios de unión pM.

[0069] FIG. 13: Los fragmentos Fab de mAb13.2 neutralizan la proliferación de TF1 mediada por la IL-13 y de la expresión CD23 mediada por la IL-13 por medio de los monocitos humanos. **(A)** El gráfico muestra el porcentaje el porcentaje de proliferación máxima por la línea celular TF1 dependiente de IL-13 (eje y) logrado después de 3 días de incubación con IL-13 y concentraciones mayores de sitios de unión del competidor (eje x) provistos ya sea por fragmentos Fab de mAb13.2 (♦) o bien de mAb13.2 (●). **(B)** La FIG. muestra el porcentaje de la cantidad máxima de monocitos que expresaron la superficie celular CD23 (eje y) según lo determinado por el análisis citométrico de flujo después de que las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) aisladas de un donante sano fueron tratadas durante toda la noche con 1 ng/ml IL-13 y las concentraciones indicadas de los sitios de unión del competidor (eje x) provistas por los fragmentos Fab de ya sea mAb13.2 (♦) o bien de mAb13.2 (●).

[0070] FIG. 14: La versión quimérica (ch13.2) del anticuerpo monoclonal de ratón mAb13.2 se une y neutraliza a IL-13. **(A)** Se muestra la absorbencia a 450 nm (A_{450}; eje y) de las muestras que contienen IL-13-FLAG y mAb13.2 biotinilada solamente (- -) y las muestras que contienen IL-13-FLAG, mAB13.2 biotinilada y mayores

concentraciones (eje x) de mAb13.8 (•), mAb13.2 (o), o mAb13.2 quimérico (ch13.2; •) según se determinó por medio de ELISA. **(B)** Se muestra el porcentaje de monocitos que extresaron la superficie celular CD23 (eje y) después de que las PBMC aisladas de un donante sano fueron tratadas durante toda la noche con 1 ng/ml IL-13 y las concentraciones indicadas (eje x) de mAb13.2 purificado de ratón (*) o mAb13.2 quimérico (ch13.2; *).

[0071] FIG. 15: Comparación del gen humano DP-54 de las líneas germinales con las secuencias variables de cadenas pesadas (VH) de aminoácidos de una versión quimérica de mAb13.2 y una versión parcialmente humanizada de mAb13.2 (h13.2v1). La FIG. muestra las regions que determinan la complementariedad (CDR) (regions recuadradas) y las secuencias de aminoácidos de DP-54, la región pesada variable de una version quimérica de mAb13.2 (13.2 quimérico), y la región pesada variable de una versión parcialmente humanizada de mAb13.2 (h13.2v1) como alineada y comparada con SEQWEB™, en la cual las sustituciones de aminoácidos realizadas para la versión parcialmente humanizada de mAb13.2 (h13.2v1) se indican con cuadrados sombreados y los residuos que se dejan sin modificar son subrayados.

[0072] FIG. 16: Comparación del gen humano DPK9 de las líneas germinales con las secuencias variables de aminoácidos de cadena liviana (VL) de una versión quimérica de mAb13.2 y una versión parcialmente humanizada de mAb13.2 (h13.2v1). La FIG. muestra las regions que determinan la complementariedad (CDR) (regions recuadradas) y las secuencias de aminoácidos de DPK-9, la region variable liviana de una version quimérica de mAb13.2 (13.2 quimérica), y la region liviana variable de una versión parcialmente humanizada de mAb13.2 (h13.2v1) según se alineó y se comparó con SEQWEB™, en donde las sustituciones de aminoácidos realizadas para la versión parcialmente humanizada de mAb13.2 (h13.2v1) se indican con cuadrados sombreados y los residuos que se dejaron sin modificar están subrayados.

[0073] FIG. 17: Comparación del gen humano DP-54 de las líneas germinales con las secuencias de aminoácidos de cadena pesada variable (VH) de una versión quimérica de mAb13.2 y una versión completamente humanizada de mAb13.2 (h13.2v2). La FIG. muestra las regiones que determinan la complementariedad (CDR) (regiones recuadradas) y las secuencias de aminoácidos de DP-54, la región variable pesada de una versión quimérica de mAb13.2 (13.2 quimérica), y la región pesada variable de una versión completamente humanizada de mAb13.2 (h13.2v2) según se alineó y se comparó con SEQWEB™, en la cual las sustituciones de aminoácidos realizadas para la versión completamente humanizada de mAb13.2 (h13.2v2) están indicadas con casilleros sombreados y los residuos que quedaron sin modificar están subrayados.

[0074] FIG. 18: Comparacíon del gen DPK9 humano de las líneas germinales con las secuencias de aminoácidos de cadena liviana variable (VL) de una versión quimérica de mAb13.2 y una versión completamente humanizada de mAb13.2 (h13.2v2). La FIG. muestra las regiones que determinan la complementariedad (CDR) (regiones recuadradas) y las secuencias de aminoácidos de DPK-9, la región variable liviana de una versión quimérica de mAb13.2 (13.2 quimérica), y la región variable liviana de una versión completamente humanizada de mAb13.2 (h13.2v2) según se alineó y se comparó con SEQWEB™, en donde las sustituciones de aminoácidos realizadas para la versión completamente humanizada de mAb13.2 (h13.2v2) están indicadas con casilleros sombreados y los residuos que quedaron sin modificar están subrayados.

[0075] FIG. 19: El mAb13.2 (h13.2v2) completamente humanizado conserva la actividad de unión completa a la IL-13. **(A)** Se muestra la absorbencia en 450 nm (A_{450}; eje y), según se determinó por medio de ELISA, de las muestras que contienen IL-13-FLAG y mAb13.2 biotinilado solo (- -) y las muestras que contienen IL-13-FLAG, mAB13.2 biotinilado y las concentraciones mayores (eje x) de mAb13.2 (•) , mAb13.2 quimérico (ch13.2; ▫), mAb13.2 parcialmente humanizado (h13.2v1; □) o mAB13.2 completamente humanizado (h13.2v2; r). **(B)** La interacción de unión entre la IL-13 humana en diferentes rangos de dosis y mAb13.2 completamente humanizada (h13.2v2)

inmovilizada hasta un chip Biacore[3] se representa como la diferencia de resonancia (RU; eje y) en el tiempo (eje x). También se muestran las constantes cinéticas para h13.2v2.

[0076] FIG. 20: mAb13.2 quimérica (ch13.2), mAB13.2 (h13.2v1) parcialmente humanizada y mAb13.2 completamente humanizada (h13.2v2) pueden neutralizar La expresión CD23 mediada por la IL-13 y La fosforilación de STAT6 mediada por IL-13. **(A)** Se muestra el porcentaje de monocitos que expresaron la superficie celular CD23 (eje y) después de que PBMC aisladas de un donante sano fueron tratadas durante toda la noche con 1 ng/ml IL-13 y las concentraciones indicadas (eje x) de mAb13.2 quimérica (ch13.2; ♦), mAb13.2 parcialmente humanizada (h13.2v1; □), o mAb13.2 completamente humanizada (h13.2v2; *). **(B)** Está representado el porcentaje de células HT-29 que expresaron STAT6 fosforilado (eje y) después de la incubación con IL-13 y la concentración indicada (eje x) de mAb13.2 quimérica (ch13.2; ♦), mAb13.2 parcialmente humanizada (h13.2v1; □), o mAb13.2 completamente humanizada (h13.2v2; *) según se determinó por medio del análisis citométrico de flujo.

[0077] FIG. 21: La capacidad de mAb13.2 completamente humanizada (h13.2v2) para neutralizar La expresión CD23 mediada por la IL-13 humana es comparable con la capacidad de mAb13.2 para hacer lo mismo. La cantidad de monocitos encerrados que expresa la superficie celular CD23 después de la incubación con **(A)** IL-13 recombinante humana o **(B)** IL-13 nativa humana y las concentraciones mayores (eje x) de mAb13.2 (•) o mAb13.2 completamente humanizada (h13.2v2; *) se presenta como un porcentaje de la cantidad máxima de monocitos que expresan la superficie celular CD23 después de la incubación con IL-13 solamente (% de Respuesta Max.; eje y).

[0078] FIG. 22: La capacidad de mAb13.2 completamente humanizada (h13.2v2) para neutralizar la expresión de CD23 mediada por la IL-13 en primates no humanos u ovejas es comparable con la capacidad de mAb13.2 para hacer lo mismo. La cantidad de monocitos encerrados que expresan CD23 en la superficie celular CD23 después de la

incubación con **(A)** IL-13 recombinante de primates no humanos (rec NHP IL-13) o **(B)** IL-13 recombinante de oveja (IL-13 rec de Oveja) y las concentraciones mayores (eje x) de mAb13.2 (•) o mAb13.2 completamente humanizada (h13.2v2; ◆) se presenta como un porcentaje de la cantidad máxima de monocitos que expresan el CD23 de la superficie celular después de la incubación con IL-13 solamente (% de Respuesta Max.; eje y).

[0079] FIG. 23: MAb13.2 completamente humanizada (h13.2v2) reduce la broncoconstricción en su fase tardía en las ovejas. El porcentaje de resistencia de las vías aéreas (eje y) según la medición 24 hours antes de la prueba de *Ascaris suum* (nivel basal), durante la prueba (ascaris), y durante muchas horas después del cambio (eje x) se muestra para las ovejas que no fueron sometidas a tratamiento (control; □) o que fueron tratadas en forma profiláctica con mAb13.2 completamente humanizada (h13.2v2; ▬) a una dosis de **(A)** 20 mg/kg ó **(B)** una dosis de 5 mg/kg. Los datos que se muestran son la media □ s.d. para un tamaño de muestra de tres ovejas por grupo.

[0080] FIG. 24: La MAb13.2 completamente humanizada (h13.2v2) evita la hipersensibilidad de las vías aéreas en las ovejas. El porcentaje de dosis de carbcol que se requiere para elicitar una magnitud dada de respuesta (PC400; eje y) se muestra para las ovejas profilácticamente tratadas con **(A)** 20 mg/kg o **(B)** 5 mg/kg mAb13.2 completamente humanizada (h13.2v2; ▬) o las ovejas que permanecieron sin recibir tratamiento (control; □) pre- y post prueba *Ascaris suum* (eje x). Los datos que se muestran son la media □ s.d. para una muestra de tres ovejas por grupo.

[0081] FIG. 25: MAb13.2 completamente humanizada (h13.2v2) evita la inflamación pulmonar inducida por antígenos en primates no humanos. La FIG. muestra la cantidad total de células encontradas en las muestras de lavado broncoalveolar (BAL) (eje y) obtenidas antes de la prueba (0) o 24 horas posteriores a la prueba (24) con el antígeno de *Ascaris suum* a partir de monos cynomolgus de control tratados por vía endovenosa con solución salina (•), monos cynomolgus de control positivo tratados por vía

intramuscular con 2 mg/kg dexametasona (*), monos cynomolgus de control negativo previamente tratados con 8 mg/kg de IgG humano irrelevant (IVIG) ( ), o monos cynomolgus previamente tratados por vía endovenosa con mAb13.2 completamente humanizada (h13.2v2) (▼). Una barra también representa la cantidad media de células encontradas en las muestras BAL de cada grupo. También se muestran los valores p obtenidos utilizando pruebas T impares.

[0082] FIG. 26: La humanización de mAb13.2 se puede basar sobre la homología de la secuencia hasta otros genes de líneas germinales humanas en el Grupo VH 3 de la BASE V. Se muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de mAb13.2 hasta las secuencias de aminoácidos de líneas celulares humanas dentro del grupo VH 3 de la base de datos, base V. Las secuencias que figuran en negrita se proponen como aquéllas en las cuales se puede basar la humanización de mAb13.2 .

[0083] FIG. 27: La comparación del gen de las líneas germinales humanas DP-77 con las secuencias variables de aminoácidos de cadena pesada (VH) de una versión quimérica de mAb13.2 y una versión completamente humanizada de mAb13.2 (h13.2v3). La FIG. muestra las regiones que determinan la complementariedad (CDR) (regiones recuadradas) y las secuencias de aminoácidos de DP-77, la región variable pesada de una versión quimérica de mAb13.2 (13.2 quimérica), y la región pesada variable de una versión completamente humanizada de mAb13.2 (h13.2v3) según se alineó y se comparó con SEQWEB™, donde las sustituciones de aminoácidos realizadas para la versión completamente humanizada de mAb13.2 (h13.2v3) están indicadas con casilleros sombreados y los residuos que quedaron sin modificar están subrayados.

[0084] FIG. 28: Comparación del gen de las líneas germinales humanas B1 con las secuencias variables de aminoácidos de cadena liviana (VL) de una versión quimérica de mAb13.2 y una versión completamente humanizada de mAb13.2 (h13.2v3). La FIG. muestra las regiones que determinan la complementariedad (CDR) (regiones recuadradas) y las secuencias de aminoácidos de B1, la región variable liviana de una

versión quimérica de mAb13.2 (13.2 quimérica), y la región variable liviana de una versión completamente humanizada de mAb13.2 (h13.2v3) según se alineó y se comparó con SEQWEB™, donde las sustituciones de aminoácidos realizadas para la versión completamente humanizada de mAb13.2 (h13.2v3) están indicadas con casilleros sombreados y los residuos que quedaron sin modificar están subrayados.

[0085] FIG. 29: Designación del número para cada residuo en la secuncia variable de aminoácidos de cadena pesada del anticuerpo monoclonal mAb13.2 de acuerdo con varios esquemas. Se muestra la designación del número para cada residuo en la secuencia de aminoácidos de la región variable pesada de mAb13.2 de acuerdo con un esquema de numeración de secuencia lineal, el esquema de numeración de la estructura de Chothia y el esquema de numeración de la secuencia de Kabat.

[0086] FIG. 30: La designación del número para cada residuo en la secuencia variable de aminoácidos de cadena liviana del anticuerpo monoclonal mAb13.2 de acuerdo con varios esquemas. Se muestra la designación del número para cada residuo en la secuencia de aminoácidos de la región variable liviana de mAb13.2 de acuerdo con un esquema de numeración de secuencia lineal, el esquema de numeración de la estructura Clothia, y el esquema de numeración de la secuencia de Kabat.

[0087] FIG. 31: Los titers de IgE específicos de Ascaris a las 8 semanas posteriors a la prueba de Ascaris disminuyeron en los monos cynomolgus tratados con el anticuerpo anti-IL-13 humano (h13.2v2). Los gráficos representan los titers relativos de IgE específicos de *Ascaris* en monos cynomolgus (eje y) antes y 8 semanas después de la prueba con el antígeno de *Ascaris suum*. Los valores previos a la prueba se normalizaron hasta "100." **(A)** Los animals se trataron por vía endovenosa con el anticuerpo anti-IL-13 humanizado (h13.2v2). **(B)** A los animales de control se les administró solución salina o igG humano irrelevanta (IVIG) por vía endovenosa.

[0088] FIG. 32: El anticuerpo anti-IL-13 (h13.2v2) impidió el aumento de la sensibilidad basófila que siegue a la prueba *in vivo* del alergeno. **(A)** La liberación de

histamina dependiente de la dosis como un porcentaje del máximo (eje y) de sangre de los animals representatives de control y tratados con el anticuerpo se representa para los animales antes del tratamiento y 24 horas y 8 semanas después de la prueba con el antígeno de Ascaris. **(B)** La liberación total de histamina sobre el rango de dosis que se muestra en (a) se determinó para cada animal en cada punto de tiempo. La FIG. muestra la media y el error standard de la liberación normalizada de histamina en cada punto de tiempo para los grupos de control y tratados con anti-IL-13. Pre = previamente tratados con el anticuerpo. Tiempo 0 = 24 hr posteriores al anticuerpo, previamente a la prueba pulmonar con *Ascaris*. Los puntos de tiempo de 24 horas, 8 semanas y 4 meses se refieren al tiempo posterior a la prueba de *Ascaris*.

[0089] FIG. 33: Unión de h13.2v2 biotinilada a las células A375 cargadas con IL-13. Los histogramas representan la cantidad de células de melanoma humano A375 (recuentos; eje y) que demostraron la unión (fluorescencia; eje x) de h13.2v2 biotinilado (0.1 Tg/ml, 1 Tg/ml, o 10 Tg/ml) después de la incubación previa con 3 ng/ml IL-13 humana, según lo determinado por medio del análisis citométrico de flujo.

[0090] FIG. 34: El reversor de Fc de tipo silvestre de h13.2v2 media ADCC en presencia de la IL-13. **(A)** Se muestra el porcentaje de liberación de Cromo-51 (eje y) de células A375 de melanoma humano tratadas con la concentración indicada (eje x) de h13.2v2 (L234A / G237A; ♦) o su reversor de Fc de tipo silvestre (◊). **(B)** Se muestra el porcentaje de Cromo-51 liberado (eje y) para las células A375 cargadas con IL-13 tratadas con el reversor de Fc de tipo silvestre de h13.2v2 en presencia o en ausencia de la IL-13.

[0091] FIG. 35: El reversor de Fc de tipo silvestre de h13.2v2 media ADCC de las células A375 que expresan la IL-13RI2, pero no las células HT-29 que expresan la IL-13RI1. **(A)** Se muestra el porcentaje de liberación de Cromo-51 (eje y) de ls células de melanoma humano A375 cargadas con IL-13 tratadas con la concentración indicada (eje x) de h13.2v2 (L234A / G237A; ♦) o su reversor Fc de tipo silvestre (◊). **(B)** Se

muestra el porcentaje de liberación de Cromo-51 (eje y) de células epiteliales humanas HT-29 cargadas con IL-13 tratadas con la concentración indicada (eje x) de h13.2v2 (L234A / G237A; ♦) o su reversor Fc de tipo silvestre (◊).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0092] Se revelan los agentes de unión a la IL-13, por ejemplo, los anticuerpos anti-IL13 y los fragmentos de unión al antígeno de los mismos, las composiciones farmacéuticas de los mismos, los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos anteriormente mencionados, al igual que los vectores y las células huésped que contienen las secuencias de ácidos nucleicos anteriormente mencionadas. También se revelan los métodos para producir los anticuerpos mencionados anteriormente, al igual que los métodos para modular una o más actividades asociadas con la IL-13 que utilizan anticuerpos que se unen a la IL-13, por ejemplo, la IL-13 humana, y reducir y evitar su unión a su receptor. Los anticuerpos anti-IL-13 se pueden utilizar para mitigar los trastornos mediados por la IL-13, por ejemplo, para tratar los trastornos respiratorios (por ejemplo, el asma); los trastornos atópicos (por ejemplo, la rinitis alérgica); las condiciones inflamatorias y / o autoinmunes de la piel (por ejemplo, la dermatitis atópica), de los órganos gastrointestinales (por ejemplo, las enfermedades intestinales inflamatorias (IBD)), al igual que los trastornos fibróticos y cancerosos. Los anticuerpos anti-IL-13 se pueden utilizar solos o combinados con otras terapias utilizadas para tartar la misma u otra enfermedad, por ejemplo, una respuesta alérgica.

[0093] Se halló, entre otras cosas, que una reducción de la actividad de la IL-13 utilizando los anticuerpos que se describen en la presente invención, la cual interfiere con la formación de un complejo de señalización funcional de IL-13, reduce la inflamación de las vías aéreas en los monos cynomolgus naturalmente alérgicos a Ascaris suum (Ejemplos 1.4 y 3.5, a continuación). De manera adicional, los anticuerpos anti-IL-13 humanos que se describen en la presente invención evitan la fase

tardía de la broncoconstricción en ovejas naturalmente alérgicas a Ascaris suum, y evitan la hipersensibilidad de las vías aéreas inducida por carbacol en las ovejas (Ejemplo 3.5, a continuación). Por consiguiente, los anticuerpos anti-IL-13 que neutralizan una o más actividades asociadas con la IL-13 se pueden utilizar para reducir una o más actividades in vivo asociadas con la IL-13, por ejemplo, para tratar o prevenir los trastornos mediados por la IL-13 (por ejemplo, el asma, la inflamación de las vías aéreas, la eosinofilia, la fibrosis y la producción excesiva de moco).

[0094] Anticuerpos anti-IL-13 humanos

[0095] Los anticuerpos que son capaces de unirse, de neutralizar y/o inhibir una o más actividades asociadas con la IL-13, en particular la actividad scñalizadora de la IL-13, son útiles para tratar Las enfermedades mediadas por la IL-13, como el asma alérgica, el asma no alérgica, y las patologías relacionadas con el asma, tales como la fibrosis, la eosinofilia y la producción de moco.

[0096] En una realización, los anticuerpos anti-IL13 que se revelan en la presente invención son aislados o purificados. Un polipéptido o una proteína "aislada" o "purificada", por ejemplo, un "anticuerpo aislado," se purifica hasta un estado más allá de aquél en el cual existe en la naturaleza. Por ejemplo, el polipéptido o la proteína "aislada" o "purificada", por ejemplo, un "anticuerpo aislado," se refiere a una proteína que está separada de al menos un componente de material celular u otras proteínas contaminantes de la fuente celular o tisular a partir de la cual se deriva la proteína, o esencialmente libre de precursores químicos o de otros químicos cuando se sintetiza desde el punto de vista químico. Por ejemplo, una proteína aislada puede estar sustancialmente libre de otras proteínas, otro material celular, o de precursores químicos. En otras realizaciones, la preparación de la proteína del anticuerpo que tiene menos de alrededor del 50% de la proteína no anticuerpo (a la cual también se hace referencia en la presente invención como una "proteína contaminante "), o de los precursores químicos, se considera que está "sustancialmente libre." En otras

realizaciones, 40%, 30%, 20%, 10% y con mayor preferencia 5% (por peso seco), de la proteína no anticuerpo, o de los precursores químicos se considera que es sustancialmente libre. Cuando se produce en forma recombinante la proteína del anticuerpo o la porción biológicamente activa de la misma, también está con preferencia esencialmente libre del medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de alrededor del 30%, 20%, más preferentemente menos de alrededor del 10%, y con mayor preferencia menos de alrededor del 5% del volumen o la masa de la preparación proteica. Las proteínas o los polipéptidos a los cuales se hace referencia en la presente invención como "recombinantes" son proteínas o polipéptidos producidos por medio de la expresión de ácidos nucleicos recombinantes. Las proteínas se pueden purificar por métodos convencionales (incluyendo, por ejemplo, intercambio de iónes y afinidad cromatográfica) para brindar preparaciones en las que una proteína en particular es al menos pura en un 5, 10, 20, 25, 50, 75, 80, 90, 95, 98, 99% en relación con otros componentes biológicamente activos.

[0097] El término "anticuerpo" tal como se utiliza en la presente invención incluye los anticuerpos intactos, los fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, los fragmentos Fab, $F(ab')_2$ Fd, dAb y scFv y los anticuerpos intactos y los fragmentos que han sido mutados ya sea en su región constante y/o variable (por ejemplo, las mutaciones para producir anticuerpos quiméricos, parcial o completamente humanizados, aligual que para producir anticuerpos con un rasgo deseado, por ejemplo, unión realzada a la IL-13 y / o unión reducida a FcR). Ejemplos de anticuerpos que se unen una de manera específica a la IL-13, y pueden por ejemplo, interferir con la formación de un complejo de señalización funcional de la IL-13 y/o neutralizar o inhibir una o más actividades asociadas con la IL-13.

[0098] Los anticuerpos que se describen en la presente invención pueden ser "efectivamente humanos". Un anticuerpo efectivamente humano es un anticuerpo que incluye un número suficiente de posiciones de aminoácidos humanos de tal forma que el anticuerpo no provoque una respuesta inmunogénica en un humano normal. Preferiblemente la proteína no debe evocar una respuesta neutralizante al anticuerpo,

por ejemplo, una respuesta al anticuerpo humano anti-murino (HAMA). La HAMA puede ser problemática en un número de circunstancias, por ejemplo, si se desean administrar los anticuerpos de forma reiterada, por ejemplo, en el tratamiento de una enfermedad crónica o recurrente. Una respuesta HAMA puede hacer que la administración repetida de un anticuerpo sea potencialmente inefectiva, debido al aumento de aclaramiento del anticuerpo en el suero (véase, por ejemplo, Saleh et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 32:180-190 (1990)) y también debido a las reacciones alérgicas potenciales (véase, por ejemplo, LoBuglio et al., *Hybridoma*, 5:5117-5123 (1986)).

[0100] Las sustituciones conservadoras típicamente incluyen la sustitución de un aminoácido por otro con características similares, por ejemplo, sustituciones dentro de los grupos siguientes: valina, glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparragina, glutamina; seina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina.

[0101] Los anticuerpos, que también se conocen como inmunoglobulinas, son de manera típica proteínas tetraméricas glicosiladas compuestas por dos cadenas livianas (L) de aproximadamente 25 kDa cada una y dos cadenas pesadas (H) de aproximadamente 50 kDa cada una. Dos tipos de cadena liviana, denominadas lambda y kappa, se pueden encontrar en los anticuerpos. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de las cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a cinco clases principales: A, D, E, G, y M, y muchas de éstas se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1, y IgA_2. Cada cadena liviana incluye un dominio variable N-terminal (V) (VL) y un dominio constante (C) (CL). Cada cadena pesada incluye un dominio V N-terminal (VH), tres o cuatro dominios C (CHs), y una región bisagra. El dominio CH más proximal a VH se designa como CH1. Los dominios VH y VL consisten en cuatro regions de secuencias relativamente conservadas denominadas regions de marco de trabajo (FR1, FR2, FR3, y FR4), las cuales forman un andamiaje para tres regiones de secuencias hipervariables (regiones que determinan la complementariedad, CDR). Las

CDR contienen la mayoría de los residuos responsables de las interacciones específicas del anticuerpo con el antígeno. Las CDR son denominadas como CDR1, CDR2, y CDR3. Por consiguiente, las CDR constituyentes en la vadena pesada se denominan H1, H2, y H3, mientras que las CDR en la cadena liviana son denominadas L1, L2, y L3. La CDR3 es de forma típica la mayor fuente de diversidad molecular dentro del sitio de unión al anticuerpo. H3, por ejemplo, puede ser tan corto como dos residuos de aminoácidos o mayor de 26 aminoácidos. Las estructuras de subunidad y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son conocidas por las personas especializadas en el arte previo. Para una revision de la estructura del anticuerpo, véase Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow et al., 1988. Una persona especializad en el arte precio reconocerá que la estructura de cada subunidad, por ejemplo, una estructura CH, VH, CL, VL, CDR, FR, comprende fragmentos activos, por ejemplo, la porción de la subunidad VH, VL, o CDR la unión al antígeno, es decir, el fragmento de unión al antígeno, o, por ejemplo, la porción de la subunidad CH que se une a y / o activa, por ejemplo, un receptor de Fc y / o el complemento. Las CDR de forma típica se refieren a CDR Kabat, como se describe en Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos (1991), eds. Kabat et al. Otro estándar para la caracterización del sitio de unión del antígeno consiste en referirse a los bucles hipervariables como los describe Chothia. Véase, por ejemplo, Chothia, D. et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227:799-817; y Tomlinson et al. (1995) *EMBO J.* 14:4628-4638. Aún otro estándar es la definición AbM usada por el software AbM de modelación de anticuerpos de Oxford Molecular. Véase, de forma general, *Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains*. En: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). Las realizaciones descritas con respecto de las CDR Kabat se pueden implementar, de forma alterna, utilizando relaciones descritas con respecto de bucles hipervariables de Chothia o de bucles definidos por AbM.

[0102] Los Ejemplos de fragmentos de unión comprendidos dentro del término "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por medio de un puente disulfido a la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un brazo único de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al. (1989) *Nature* 341:544-46), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región de determinación de complementariedad (CDR). También se pueden utilizar anticuerpos camélidos y anticuerpos camelizados. Dichos anticuerpos, por ejemplo, pueden incluir CDR de solo uno de los dominios variables que se describen en la presente invención. Además, a pesar de que los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por medio de genes separados, se pueden unir, utilizando los métodos recombinantes, por medio de un enlace sintético que permite hacerlos como una cadena de proteína única en la cual las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como la cadena única Fv (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-26; Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:5879-83). Tales anticuerpos de cadena única también están destinados a estar comprendidos dentro del término "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos del anticuerpo se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por las personas especializadas en el arte previo y los fragmentos se evalúan para determinar su función de la misma manera que se hace con los anticuerpos intactos.

[0103] La diversidad de anticuerpos, en un sistema natural, se crea por medio del uso de multiples genes de las líneas germinales que codifican las regions variables y una variedad de eventos somáticos. Los eventos somáticos incluyen la recombinación de segmentos genéticos variables con diversidad (D) y segmentos genéticos de unión (J) para hacer una región VH completa y la recombinación de los segmentos genéticos variables y de unión para hacer una región VL completa. El proceso de recombinación

puede ser impreciso, lo cual da como resultado la pérdida o la adición de aminoácidos en las uniones V(D)J. Estos mecanismos de diversidad ocurren en la célula B en desarrollo ante de la exposición. Después de la estimulación antigénica, los genes del anticuerpo expresados en las células B atraviesan una mutación somática. Sobre la base de la cantidad estimada de segmentos genéticos de las líneas germinales, la recombinación randomizada de estos segmentos y el apareamiento aleatorio VH-VL, se podrían producir hasta 1.6 x 10^7 anticuerpos diferentes (Fundamental Immunology, 3rd ed. (1993), ed. Paul, Raven Press, New York, NY). Cuando se tienen en cuenta otros procesos que contribuyen a la diversidad de los anticuerpos (tales como la mutación somática), se piensa que más de $1x10^{10}$ se podrían generar los diferentes anticuerpos (Immunoglobulin Genes, 2nd ed. (1995), eds. Jonio et al., Academic Press, San Diego, CA). En función de los diversos procesos involucrados en generar la diversidad del anticuerpo, no es probable que los anticuerpos monoclonales derivados en forma independiente con la misma especificidad del antígeno tengan secuencias idénticas de aminoácidos.

[0104] Por consiguiente, esta revelación provee, entre otros, anticuerpos y fragmentos de los mismos que se unen al antígeno, que se unen a IL-13 y, por ejemplo, interfieren con la formación de un complejo funcional de señalización de IL-13. Los fragmentos que se unen al antígeno que se describen en la presente invención, por ejemplo, las estructuras que contienen un CDR, serán por lo general una secuencia de cadena pesada o liviana de un anticuerpo o un fragmento activo del mismo, en el cual está ubicada la CDR en una ubicación correspondiente a la CDR de VH y VL que ocurren de manera natural. Las estructuras y las ubicaciones de los dominios variables de inmunoglobulina se pueden determinar de la manera como se describe en las Secuencias de Proteínas de Interés Inmunobiológico, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos (1991), eds. Kabat et al.

[0105] Las moléculas del anticuerpo (que incluyen los fragmentos que se unen al antígeno) se revelan en la presente invención, es decir, las moléculas del anticuerpo que

se unen a IL-13 e interfieren con la formación de un complejo funcional de señalización de IL-13, incluyen, pero no se limitan al anticuerpo monoclonal de murinos, mAb13.2, y sus variantes, específicamente la variante quimérica ch13.2, la variante parcialmente humanizada h13.2v1, y las variantes completamente humanizadas h13.2v2 y h13.2v3. Estas moléculas del anticuerpo pueden ser útiles para prevenir o tartar el asma (tanto alérgica como no alérgica), al igual que las patologías relacionadas con el asma. La secuencia de aminoácidoss de la región variable de cadenas livianas de mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, y h13.2v3 se establecen en la SEQ ID NOs:9, 10, 11, 12, y 35, respectivamente. La secuencia de aminoácidoss de la región variable de cadenas pesadas de mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, y h13.2v3 se establecen en la SEQ ID NOs:13, 14, 15, 16, y 36, respectivamente. La secuencia de aminoácidoss de las tres regiones que determinan la complementariedad (CDRs) en las cadenas livianas variables de mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, y h13.2v3 se establecen en las SEQ ID NOs:19, 20, y 21. La secuencia de aminoácidoss de las tres CDRs en las cadenas pesadas variables de mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, y h13.2v3 se establecen en las SEQ ID NOs:22, 23, y 24.

[0106] Tal como se describió con anterioridad, las CDR contienen la mayoría de los residuos responsables de las interacciones específicas con el antígeno y están contenidas dentro de los dominios VH y VL, es decir, la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena liviana, respectivamente. Los anticuerpos ejemplares incluyen por lo menos una CDR que comprenda una secuencia de aminoácidos seleccionados a partir de la secuencia de aminoácidoss establecida en las SEQ ID NO:19-24, o residuos seleccionados, particularmente residuos de contacto IL-13 de dichas CDR. Dichos anticuerpos también se pueden unir a IL-13 y, por ejemplo, interferir con la formación de un complejo funcional de señalización de IL 13. La secuencia de aminoácidos de los fragmentos activos de las CDR, es decir, las secuencias nucleares mínimas de CDR, que se describen en la presente invención se establecen en las SEQ ID NO:25-30, y se revelan en la Tabla 1. Un anticuerpo pueden incluir una o más CDR de la cadena de VL

como se establece en las SEQ ID NO:19-21 o las SEQ ID NO: 25-27. Un anticuerpo incluir una o más CDR de la cadena VH como se establece en las SEQ ID NO:22-24 o las SEQ ID NO: 28-30. De una manera adicional, un anticuerpo puede incluir uno o más de las CDR de la cadena VL y VH tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID Nos:19-30. Como se muestra, X puede ser cualquier aminoácido, por ejemplo, un aminoácido que no sea cisteíno, o un aminoácido que tenga una carga similar, hidrofobicidad, y/o longitud de cadena lateral, como un aminoácido en la posición correspondiente en el lado izquierdo de la columna de la Tabla 1.

Tabla 1. CDR Ejemplares

Secuencia de CDR	Secuencia mínima central de CDR
Cadena liviana CDR1 (L1)SEQ ID NO:1924-KASESVDNYGKSLMH-381	SEQ ID NO:25 24-xxxxxxx**NY**x**K**xxxx-38
Light chain CDR2 (L2)SEQ ID NO:2054-RASNLES-60	SEQ ID NO:26 54-**R**xxxxxx-60
Cadena liviana CDR3 (L3)SEQ ID NO:2193-QQSNEDPWT-101	SEQ ID NO:27 93-xxx**N**x**D**x**W**x-101
Cadena pesada CDR1 (H1)SEQ ID NO:2230-ISYAMS-352	SEQ ID NO:28 30-**IS**x**A**xx-35
Cadena pesada CDR2 (H2)SEQ ID NO:2350-SISSGGNTYYPDSVKG-65	SEQ ID NO:29 50-**S**x**SS**xxxxx**Y**xxxxxx-65
Cadena pesada CDR3 (H3)SEQ ID NO:2498-LDGYYFGFAY-107	SEQ ID NO:30 98-**LDGYYF**xxxx-107

1 La numeración para las CDR VL está de acuerdo con un esquema de numeración de secuencia lineal como en la FIG. 30.

2 La numeración para las CDR VH está de acuerdo con un esquema de numeración de secuencia lineal como en la FIG. 29.

[0107] También se describió con anterioridad, un fragmento de unión al antígeno puede ser un fragmento Fv, el cual incluye los dominios VH y VL. Por consiguiente, un fragmento Fv de mAb13.3, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2 o h13.2v3 puede constituir un anticuerpo que se describe en la presente invención. Dicho anticuerpo se pueden unir con IL-13 e interferir con la formación de un complejo funcional de señalización de la IL-13. Otros fragmentos incluyen el fragmento Fv, por ejemplo, los fragmentos scFv, los fragmentos Fab y los fragmentos $F(ab')_2$ de los anticuerpos mAb13.3, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, o h13.2v3 o un anticuerpo que incluye una o más CDR que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NOs: 19-30.

[0108] Tales moléculas del anticuerpo se pueden producir por medio de los métodos conocidos por aquellas personas especializadas en el arte previo. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir por medio de la generación de hibridomas de acuerdo con los métodos conocidos. Los hibridomas formados de esta manera luego se evalúan utilizando los métodos convencionales, como el ensayo inmunosorbente unido a la enzima (ELISA) y el análisis de resonancia de plasmon de superficie (Biacore™), para identificar uno o más hibridomas que producen un anticuerpo que se une de manera específica a la IL-13, interfiere con la formación de un complejo funcional de señalización de la Il-13, y neutraliza una o más actividades asociadas con la IL-13. La IL-13 recombinante, la IL-13 que se produce de manera natural (es decir, la forma procesada madura de IL-13), cualquiera de las variantes de los mismos, y los fragmentos peptídicos antigénicos de la IL-13 se pueden utilizar como el inmunógeno.

[0109] Un fragmento peptídico antigénico de la IL-13 puede comprender por lo menos 7 residuos continuos de aminoácidos y abarca un epitopo tal que un anticuerpo que se forma contra el péptido forma un complejo inmune específico con la IL-13. Con preferencia, el péptido antigénico comprende por lo menos 10 residuos de aminoácidos, con mayor preferencia por lo menos 15 residuos de aminoácidos, aún con mayor preferencia por lo menos 20 residuos de aminoácidos, y con mayor preferencia por lo

menos 30 residuos de aminoácidos. De una manera adicional, es preferable que el fragmento peptídico antigénico de la IL-13 comprende el sitio de unión al receptor de la IL-13 o el sitio de unión al receptor de la IL-4.

[0110] Como una alternativa para preparar los hibridomas que secretan el anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal se puede identificar y aislar por medio de la selección de una biblioteca de inmunoglobulina recombinante combinatoria (por ejemplo, una biblioteca de exhibición de fagos) con la IL-13, que incluye las variantes y/o las porciones de la misma, para aislar por lo tante los miembros de la biblioteca de inmunoglobulina que se unen a la IL-13. Las técnicas y los kits que están disponibles desde el punto de vista comercial para generar y evaluar las bibliotecas que exhiben fagos son conocidas por aquellas personas especializadas en el arte previo. De una manera adicional, los ejemplos de los métodos y de los reactivos en particular convenientes para utilizar en la generación y la evaluación de los exhibidores de anticuerpos incluyen los que se describen en US 5.658.727, US 5.667.988, y US 5.885.793.

[0111] Los sueros policlonales y los anticuerpos que se describen en la presente invención se pueden producir por medio de la inmunización de un paciente adecuado con la IL-13, sus variantes y/o las porciones de la misma. El anticuerpo titer en el paciente inmunizado puede ser monitoreado a través del tiempo por medio de las técnicas convencionales, tales como un Ensayo Inmunoabsorbente Enlazado con la Enzima (ELISA), utilizando la IL-13 inmovilizada u otros proteínas marcadoras (por ejemplo, FLAG). Los anticuerpos se pueden aislar a partir de un animal o del medio de cultivo. Se puede un utilizar una variedad de métodos para purificar los anticuerpos incluyendo las técnicas bien conocidas, tales como el uso de una gromatografía por proteína A; hasta obtener una fracción de IgG.

[0112] Ciertas realizaciones comprenden el dominio VH y / o VL del fragmento Fv de mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2 o h13.2v3. Los fragmentos de los anticuerpos, por

ejemplo, Fab, $F(ab')_2$, Fd, y los fragmentos dAb, se pueden producir por medio del clivaje de los anticuerpos o por ingeniería recombinante. Por ejemplo, los fragmentos Fab y $F(ab')_2$ inmunológicamente activos se pueden generar por medio del tratamiento de los anticuerpos con una enzima tal como la pepsina.

[0113] Otras realizaciones comprenden una o más regiones que determinan la complementariedad (CDR) de cualquiera de estos dominios VH y VL, como se establece en las SEQ ID NO:19-30. Una realización comprende un fragmento de H3 del dominio VH de mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, o h13.2v3.

[0114] Los dominios de VH y VL que se describen en la presente invención, en ciertas realizaciones, pueden ser dispuestas según la línea germinal, es decir, las regiones del marco de trabajo (FR) de estos dominios se pueden modificar utilizando las técnicas convencionales de biología molecular para coincidir con los genes humanos de la línea de germinación o con las secuencias de aminoácidos de consenso de los productos genéticos humanos de la línea de germinación, en una o más posiciones (por ejemplo, al menos en un 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, o 99% del marco de trabajo). En otras realizaciones, las secuencias del marco de trabajo permanecen con divergencias a partir de la línea germinal.

[0115] Las secuencias de la línea germinal humana, por ejemplo, se revelan en Tomlinson, I.A. 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; y Tomlinson et al. (1995) *EMBO J.* 14:4628-4638. El directorio V BASE brinda un directorio integral de regiones de secuencia variable de inmunoglobulina humana (compilado por Tomlinson, I.A. et al. MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK). Estas secuencias se pueden usar como fuente de una secuencia humana, por ejemplo, para regiones del marco de trabajo y la CDR. También se pueden usar regiones del marco de trabajo humano de consenso, por ejemplo, como se describen en US 6,300,064.

[0116] De una manera adicional, los anticuerpos de cadena única quiméricos, humanizados que se describen en la presente invención, que comprenden tanto las porciones humanas como las no humanas se pueden producir utilizando las técnicas convencionales de ADN recombinante, tal como se describe con mayor detalle en los Ejemplos. También se pueden producir los anticuerpos humanizados utilizando ratones transgénicos que expresan los genes de cadena pesada y liviana, pero son incapaces de expresar los genes de cadena liviana y pesada de la inmunoglobulina endógnena en el ratón.

[0117] De una manera adicional, los anticuerpos que se describen en la presente invención también incluyen los que se unen a la IL-13, interfieren con la formación de un complejo funcional de señalización de la Il-13, y tienen mutaciones en las cadenas pesadas y livianas de las regiones constantes. A veces es deseable mutar e inactivar ciertos fragmentos de la región constante. Por ejemplo, se puede hacer que las mutaciones en la region pesada constante produzcan anticuerpos con union reducida al receptor de Fc (FcR) y / o complemento; tales mutaciones son bien conocidas por las personas idóneas en el arte previo. Un Ejemplo de tal mutación a la secuencia de amino de la región constante de la cadena pesada de IgG se proporciona en la SEQ ID NO:17. Algunos fragmentos activos de las subunidades CL y CH (por ejemplo, CH1) se unen entre sí de forma covalente. Otro aspecto adicional proporciona un método para obtener el dominio de un anticuerpo de unión al antígeno específico para el dominio de IL-13 que colabora en la formación de un complejo funcional de señalización de la Il-13.

[0118] Los anticuerpos ejemplares pueden incluir secuencias de las cadenas VL como se establece en las SEQ ID NO:9, 10, 11, 12, ó 35, y / o de las cadenas VH como se establece en las SEQ ID NOs: 13. 14, 15, 16, ó 36, pero también pueden incluir variantes de estas secuencias que conservan la capacidad de unión al antígeno. Tales variantes se pueden derivar de las secuencias proporcionadas utilizando las técnicas bien conocidas en el arte previo. Se pueden efectuar sustituciones, eliminaciones o agregados de aminoácidos ya se aen las FR o bien en las CDR. Mientras que las

modificaciones en las regines del marco de tiempo por lo general están diseñadas para mejorar la estabilidad y reducir la inmunogenicidad del anticuerpo, los cambios en las CDR por lo general se diseñan para aumentar la afinidad del anticuerpo para su blanco. Tales cambios que aumentan la afinidad son de manera típica determinados en forma empírica mediante la alteración de la región CDR y la prueba del anticuerpo. Tales alteraciones se pueden realizar de acuerdo con los métodos que se describen en Antibody Engineering, 2nd. ed. (1995), ed. Borrebaeck, Oxford University Press.

[0119] Un método ejemplar para hacer un dominio VH, que es una variante de la secuencia de aminoácidos de un dominio VH que se establece en la presente invención, comprende un paso de adición, eliminación, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del dominio VH que se revela en la presente invención, que combina de manera opcional el dominio VH así provisto con uno o más dominios VL, y prueba el dominio VH o la combinación de VH/VL o las combinaciones para la unión específica con la IL-13, y (con preferencia) probar la capacidad de tal dominio con unión al antígeno para modular una o más actividades asociadas a la IL-13. El dominio VL puede tener una secuencia aminoácidos que es esencialmente como se establece en la presente invención. Se puede emplear un método análogo en el cual una o más variants de la secuencia de un dominio VL revelado en la presente invención se combinan con uno o más dominios VH.

[0120] Otro aspecto de la invención proporciona un método para preparar un fragmento de unión al antígeno que se une de manera específica a la IL-13. El método comprende: (a) proporcionar un repertorio de inicio de ácidos nucleicos que codifican un dominio VH que ya sea que incluya una CDR3 para ser reemplazado o no tiene una región de CDR3; b) combinar el repertorio con un ácido nucleico donante codificador de una CDR donante que comprende un fragmento activo de la SEQ ID NO:24, por ejemplo, un ácido nucleico donante que codifica la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:30, de manera tal que el ácido nucleico donante inserto dentro de la región CDR3 en el repertorio de manera tal de proporcionar un repertorio de productos de

ácidos nucleicos que codifican un dominio VH; (c) expresar los ácidos nucleicos del repertorio del producto; (d) seleccionar de un anticuerpo específico o fragmento de antígeno de unión específico para IL-13; y (e) recuperar del anticuerpo específico o un fragmento de antígeno de unión o un ácido nucleico que lo codifique.

[0121] En otra realización, se puede emplear un método análogo en el cual una CDR3 VL (es decir, L3) que aquí se describe se combina con un repertorio de ácidos nucleicos que codifican undominio VL, que ya sea incluye una CDR3 que se debe reemplazar o pierde una región codificadora de CDR3. Una secuencia codificadora de una CDR que aquí se describe (por ejemplo, CDR3) se puede introducir dentro de un repertorio de variables dominios que pierden una CDR (por ejemplo, CDR3), utilizand la tecnología del ADN recombinante. Por ejemplo, Marks et al. (*Bio/Technology* (1992) 10:779-83) describe los métodos de producción de los repertorios de los dominios variables de anticuerpos en los cuales los cebadores de consenso direccionados a o adyacentea al extremo 5' del áre variable del dominio se utilizan en conjunción con los cebadores de consenso hasta la tercera región de marco de tiempo de los genes VH para proporcionar un repertorio de dominios variables de VH que pierden una CDR3. El repertorio se puede combinar con una CDR3 de un anticuerpo particular. Utilizando técnicas análogas, las secuencias derivadas de la CDR3 pueden ser arrastrados con repertorios de dominios VH o VL que pierden una CDR3, y los dominios completos VH o VL arrastrados combinados con un dominio conocido VL o VH para proporcional los fragmentos específicos de unión al antígeno. El repertorio se puede entonces desplegar en un sistema huésped adecuado como el sistema de exhibición de fagos de WO 92/01047, de manera que los fragmentos de unión al antígeno adecuados se puedan seleccionar. Los arrstres análogos o las técnicas de combinación también se revelan por parte de Stemmer (*Nature* (1994) 370:389-91). Otra alternativa es generar regiones alternas de VH o VL utilizando mutagénesis aleatoria de uno o más genes seleccionados de VH y/o VL para generar mutaciones dentro de la totalidad del dominio variable. Véase, por ejemplo, Gram et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* (1992) 89:3576-80.

[0122] Otro método que puede ser utilizado consiste en direccionar la mutagénesis hacia las regions CDR de los genes VH o VL. Tales técnicas son reveladas por, por ejemplo, Barbas et al. (*Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* (1994) 91:3809-13) and Schier et al. (*J. Mol. Biol.* (1996) 263:551-67). De forma similar una o más, de todas las tres CDR se pueden insertar en un repertorio de dominios de VH o VL, o aún en otro andamiaje (como un dominio fibronectino). La proteína resultante se evalúa por su capacidad de unirse a IL-13.

[0123] En una realización, una proteína de unión que se une a un blanco se modifica, por ejemplo, por medio de mutagénesis, para suministrar un conjunto de proteínas de unión modificadas. Las proteíans de unión modificadas luego se evalúan para identificar a una o más proteínas de unión alteradas las cuales han alterado las propiedades funcionales (por ejemplo, unión mejorada, estabilidad mejorada, estabilidad in vivo prolongada). En una implementación, la tecnología de exhibición de la biblioteca se utiliza para seleccionar o evaluar el grupo de proteínas de unión modificadas. Las proteínas de unión de mayor afinidad son luego identificadas desde la segunda biblioteca, por ejemplo, por medio del uso de condicionnes más estrictas o condiciones de lavado y unión más competitivas. También se pueden utilizar las técnicas de evaluación.

[0124] En otras realizaciones, la mutagénesis se dirige a las regions conocidas o probablemente que están en la interface de unión. Si, por ejemplo, las proteínas de unión identificadas son los anticuerpos, la mutagénesis se puede dirigir hacia las regiones CDR de las cadenas livianas o pesadas como se describe en la presente invención. Además, la mutagénesis se puede direccionar hacia las regiones del marco de trabajo cercanas o adyacentes a las CDR, por ejemplo, las regiones del marco de tiempo, en particular dentro de 10, 5, ó 3 aminoácidos de una unión CDR. En el caso de los anticuerpos, la mutagénesis también se puede limitar a una o varias de las CDR, por ejemplo, para hacer mejoras de manera escalonada.

[0125] En una realización, la mutagénesis se utiliza para hacer un anticuerpo más similar a una o más secuencias de la línea germinal. Un método de disposición en líneas germinales a modo de ejemplo puede incluir: identificar a una o más secuencias de la línea germinal que son similares (por ejemplo, más similares en una base de datos particular) a la secuencia del anticuerpo aislado. Luego las mutaciones (en el nivel de los aminoácidos) se pueden efectuar en el anticuerpo aislado, ya sea mediante el incremento, en forma combinada, o ambas. Por ejemplo, se realiza una biblioteca de ácidos nucleicos que incluye las secuencias que codifican algunas o todas las mutaciones posibles de la línea germinal. Los anticuerpos mutados son luego evaluados, por ejemplo, para identificar un anticuerpo que tiene uno o más residuos de la línea germinal adicionales relativos al anticuerpo aislado y que aún sigue siendo útil (por ejemplo, tiene una actividad funcional). En una realización, se introducen tantos residuos en la línea germinal en la medida de lo posible.

[0126] En una realización, la mutagénesis se utiliza para sustituir o insertar uno o más residuos de la línea germinal dentro de una región de CDR. Por ejemplo, el residuo de la línea germinal de CDR pueden ser de una secuencia de la línea germinal que sea similar (por ejemplo, la más similar) a la región variable que está siendo modificada. Después de la mutagénesis, la actividad (por ejemplo, la unión u otra actividad funcional) del anticuerpo se puede evaluar para determinar si el residuo o los residuos de la línea germinal son tolerados. Se pueden efectuar mutagénesis similares en las regiones de marco de trabajos.

[0127] La selección de una secuencia de líneas germinales se puede efectuar de diferentes maneras. Por ejemplo, una secuencia de la línea germinal se puede seleccionar si satisface los criterios previamente determinados para la selectividad o la semejanza, por ejemplo, por lo menos un cierto porcentaje de identidad, por ejemplo, por lo menos 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, ó 99.5% de identidad. La selección se puede llevar a cabo utilizando por lo menos 2, 3, 5, ó 10 secuencias de líneas germinales. En el caso de CDR1 y CDR2, la identificación de la secuencia de la

línea germinal similar se puede incluir seleccionando una secuencia de esa naturaleza. En el caso de CDR3, la identificación de una secuencia similar de la línea germinal puede incluir la selección de una secuencia tal, pero puede incluir la utilización de dos secuencias de la línea terminal que contribuyen en forma separada a la porción amino terminal y la porción carboxi terminal. En otras implementaciones se utilizan más de una o dos secuencias de la línea terminal, por ejemplo, para formar una secuencia de consenso.

[0128] En una realización, un anticuerpo o un fragmento del mismo tiene secuencias de CDR que difieren solamente de manera no sustancial de aquéllas de los anticuerpos que se describen en la presente invención. Las diferencias no sustanciales incluyen los cambios menores de los aminoácidos, tales como las sustituciones d 1 o 2 de cualquiera de manera típica 5-7 aminoácidos en la secuencia de un CDR, por ejemplo, un CDR de Chothia o de Kabat. De manera típica un aminoácido es sustituido por un aminoácido relacionado que tenga una carga similar, características hidrofóbicas o estereoquímicas. Tales sustituciones estarían dentro de las capacidades habituales de una persona idónea en el arte previo. A diferencia de lo que sucede en las CDR, los cambios más sustanciales en las regiones del marco de trabajo de la estructura (FRs) se pueden realizar sin afectar de manera adversa las propiedades de unión de un anticuerpo. Los cambios de las FR incluyen, pero no se limitan a, humanizar un marco de trabajo derivado de no humano o construir ciertos residuos del marco de tiempo que son importantes para contactar al antígeno o para estabilizar el sitio de unión, por ejemplo, cambiar la clase o la subclase de la región constante, cambiar los residuos específicos de aminoácidos que podrían 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 cambiar la especie de la cual deriva la región constante. Los anticuerpos pueden tener mutaciones en la región CH2 de la cadena pesada que reduce o altera la función efectora, por ejemplo, la unión al receptor de Fc y la activación del complemento. Por ejemplo, los anticuerpos pueden tener mutaciones tales como las que

se describen en las Patentes de los Estados Unidos de América Nos. 5.624.821 y 5.648.260. En la cadena pesada de IgG1 o IgG2, por ejemplo, tales mutaciones se pueden efectuar para parecerse a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:17. Los anticuerpos también pueden tener mutaciones que estabilizan la unión de disulfido entre las dos cadenas pesadas de una inmunoglobulina, tales como las mutaciones en la región bisagra de IgG4, como se revela en el arte previo (por ejemplo, Angal et al. (1993) *Mol. Immunol.* 30:105-08).

[0129] Las proteínas de unión a la IL-13 pueden estar en forma de anticuerpos intactos, fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, fragmentos Fab, F(ab')2, Fd, dAb, y scFv y de anticuerpos intactos y fragmentos que han sido mutados ya sea en su región constante y/o variable (por ejemplo, mutaciones para producir anticuerpos quiméricos, parcialmente humanizados o completamente humanizados, al igual que para producir anticuerpos con un rasgo deseado, por ejemplo, unión mejorada a la IL 13 y / o unión reducida a FcR).

[0130] En algunas realizaciones, una porción sustancial de un dominio variable de inmunoglobulina puede comprender por lo menos una de las regiones de la CDR y, de manera opcional, sus regiones de marco de tiempo intervinientes de las regiones variables según se establecen en la presente invención. La porción incluirá también por lo menos alrededor de 50, 60, 70, 80, 85, 87, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98% de cada una o de ambas de FR1 y FR4. Por ejemplo, la porción que puede ser continua o no continua puede incluir el 50% de C-terminal de FR1 y el 50% de N-terminal de FR4. Los residuos en el extremo N-terminal o C-terminal de la parte esencial del dominio variable pueden ser aquéllos que normalmente no están asociados con las regiones variables de dominio que se producen en forma natural. Por ejemplo, la construcción de los fragmentos de unión específica al antígeno de la presente invención realiza por medio de las técnicas de ADN recombínate puede dar como resultado la introducción de los residuos de N o de C terminal codificados por los enlaces introducidos para facilitar los pasos de clonación u otra manipulación. Otros pasos de manipulación incluyen la

introducción de enlaces para unir los dominios variables que se describen aquí para promover secuencias de proteínas, que incluyen las cadenas pesadas de inmunoglobulina, otros dominios variables (por ejemplo, en la producción de anticuerpos) o los rótulos de proteínas tal como se analiza con mayor detalle a continuación.

[0131] A pesar de que las realizaciones ilustradas en los Ejemplos comprenden un par de "combinaciones" de los dominios VH y VL, la invención también abarca los fragmentos de unión que contienen un dominio de variable única derivado ya se a de las secuencias de dominio VH o VL, especialmente los dominios VH. En el caso de cualquiera de los dominios específicos de unión a la cadena única, estos dominios se pueden utilizar para evaluar los dominios complementarios capaces de formar un dominio de unión específica al antígeno de dos dominios capaz de unirse a IL-13. Esto se puede lograr por medio de los métodos de evaluación de exhibición de fagos utilizando el enfoque denominado de combinatoria dual jerárquico (como se revela en la presente invención, por ejemplo, WO 92/01047) en la cual una colonia individual que contenga ya sea un clon H o L de la cadena se utiliza para infectar una biblioteca completa de clones que codifican la otra cadena (L o H) y el dominio específico resultante de unión al antígeno de dos cadenas es seleccionado de acuerdo con las técnicas de exhibición de fagos tales como las que se describen en la referencia. Esta técnica se revela también en Marks et al., *supra*. Los anticuerpos se pueden conjugar por métodos químicos con radionúclidos, drogas, macromoléculas u otros agentes, o se puede lograr como fusión de proteínas que comprenden uno o más de las CDR que se describen aquí.

[0132] Una proteína de fusión del anticuerpo contiene un par VH-VL donde una de esas cadenas (por lo general VH) y otra proteína son sintetizadas como una cadena polipeptídica única. Estos tipos de productos difieren de los anticuerpos en que por lo general tienen un elemento funcional adicional: por ejemplo, la mitad activa de una

molécula pequeña o la característica estructural molecular principal de la macromolécula conjugada o fusionada.

[0133] De manera adicional a los cambios a la secuencia de aminoácidos que se señaló con anterioridad, los anticuerpos pueden ser glicosilados, pegilados o unidos a la albúmina o a un polímero no proteináceo. Por ejemplo, los anticuerpos revelados en la presente invención se pueden unir a uo de una variedad de polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, o polioxialquilenos, de la manera que se establece en las Patentes de los Estados Unidos de América Nos. 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192; o 4.179.337. Los anticuerpos son modificados químicamente por medio de la conjugación covalente a un polímero hasta incrementar su vida media circulante, por ejemplo. Los polímeros que se ofrecen a modo de ejemplo y los métodos para unirlos a los polipéptidos también se muestran en las Patentes de los Estados Unidos de América Nos. 4.766.106; 4.179.337; 4.495.285; y 4.609.546.

[0134] En otras realizaciones, el anticuerpo puede ser modificado para tener un patrón de glicosilación alterado (por ejemplo, la forma alterada del modelo original de glicosilación original o nativo). Como se utiliza dentro de este contexto, "alterado" significa que tiene una o más mitades de carbohidratos eliminadas, y / o que tiene uno o más sitios de glicosilación agregados al anticuerpo original. El agregado de sitios de glicosilación a los anticuerpos que se revelan en la presente invención se puede llevar a cabo por medio de la alteración de la secuencia de aminoácidos hasta contener las secuencias de consenso del sitio de glicosilación; tales técnicas son bien conocidas en el arte previo. Otro medio de aumentar la cantidad de mitades de carbohidratos en los anticuerpos es por medio de acoplamiento químico o enzimático de los glicosidos a los residuos de aminoácidos del anticuerpo. Estos métodos se describen, por ejemplo, en WO 87/05330, y Aplin and Wriston ((1981) *CRC Crit. Rev. Biochem.* 22:259-306). La eliminación de cualquiera de las mitades de carbohidratos presentes en los anticuerpos se puede llevar a cabo química o enzimáticamente tal como se describe en el arte previo

(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). Véase, por ejemplo, U.S. 5.869.046 para una modificación que aumenta la vida media in vivo que proporciona un epitopo de unión al receptor de salvataje.

[0135] Los anticuerpos que se describen en la presente invención también pueden ser etiquetado con un rótulo detectable o funcional. Los rótulos detectables incluyen los radiorótulos tales como ^{131}I o ^{99}Tc, los cuales se pueden unir a los anticuerpos que se describen aquí utilizando la química convencional conocida en el arte previo. Los de rótulos también incluyen los rótulos de las enzimas tales como la peroxidasa rábano picante o la fosfatasa alcalina. Los rótulos además incluyen las mitades químicas tales como la biotina, que se pueden detectar por medio de la unión a una mitad detectable conocida, por ejemplo, la avidina rotulada.

[0136] Las características de unión de un anticuerpo revelado en la presente invención se puede medir por cualquier método apropiado, incluyendo los métodos siguientes: el análisis de Biacore, el Ensayo Enzimático Inmunoabsorbente (ELISA), la cristalografía por rayos x, el análisis de la secuencia y la mutagénesis por barrido como se describe en los Ejemplos que figuran más abajo, y otros métodos que son bien conocidos en el arte previo. La capacidad de un anticuerpo que se describe aquí de neutralizar y / o inhibir una o más actividades asociadas con la IL-13 se puede medir por medio de los métodos siguientes: los ensayos para medir la proliferación de una línea celular dependiente de la IL-13, por ejemplo TFI; los ensayos para medir la expresión de los polipéptidos mediados por la IL-13, por ejemplo, el análisis citométrico de flujo de la expresión de CD23; los ensayos que miden la actividad de las moléculas de señalización corriente abajo, por ejemplo, STAT6; los ensayos que prueban la eficiencia de un anticuerpo que se describe aquí de evitar el asma en un modelo animal, por ejemplo, el mono cynomolgus; tal como se describe en los Ejemplos que figuran más abajo, y otros ensayos que son bien conocidos en el arte previo.

[0137] La interacción de la unión de una proteína de interés y un blanco (por ejemplo, IL-13) se pueden analizar utilizando SPR. SPR o el Análisis de Interacción Biomolecular (BIA) detecta las interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin rotular ninguno de los interactuantes. Los cambios de la masa en la superficie de unión (indicativos de un evento de unión) del chip BIA dan como resultado alteraciones del índicce de refracción de luz cerca de la superficie (el fenómeno óptico de la resonancia de plasmones superficiales (SPR)). Los cambios en la refractividad general una señal detectable, los cuales se miden como una indicación de las reacciones en tiempo real entre las moléculas biológicas. Se describen los métodos para utilizar SPR, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos de América 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 y los recursos en línea proporcionados por BIAcore International AB (Uppsala, Suecia).

[0138] La información de SPR se puede utilizar para proporcionar una medición previsa y cuantitativa de la constante de disociación de equilibrio (Kd), y los parámetros cinéticos, que incluyen Kon y Koff, para la unión de una biomolécula a un blanco. Tales datos se pueden utilizar para comparar diferentes biomoléculas. Por ejemplo, las proteínas codificadas por medio de ácido nucleico seleccionadas a partir de una biblioteca de diversidad de cepas se puede comparar hasta identificar individuos que tienen alta afinidad para el blanco o que tienen un COF bajo. Esta información también se puede utilizar para desarrollar las relaciones actividad-estructura (SAR). Por ejemplo, los parámetros de unión cinéticos y de equilibrio de las versiones maduras de una proteína madre se pueden comparar con los parámetros de la proteína madre. Se pueden identificar las variantes de aminoácidos en posiciones determinadas que correlacionan con parámetros de unión particulares, por ejemplo, alta afinidad y bajo Koff. Esta información se puede combinar con el modelado estructural (por ejemplo, utilizando el modelado de homología, la minimización de energía, o la determinación de estructura

por medio de la cristalografía por rayos x o NMR). Como resultado de ello, una comprensión de la interacción física entre la proteína y su blanco se puede formular y utilizar para guir otros procesos de diseño.

[0139] En otro aspecto, esta revelación proporciona un método para seleccionar anticuerpos capaces de unirse a la IL-13 y neutralizar y/o inhibir una o más actividades asociadas a la IL-13. El método comprende: a) la contracción de una pluralidad de anticuerpos o de fragmentos de unión al antígeno con IL-13; b) la selección de los anticuerpos o los fragmentos de unión al antígeno que se unen a la IL-13;c) la prueba de la capacidad de los anticuerpos elegidos o de los fragmentos de unión al antígeno para evitar la unión de la IL-13 al receptor de la IL-13; y d) la selección de los anticuerpos o los fragmentos de unión al antígeno capaces de evitar la unión de IL-13 a su receptor. Uno o más de los anticuerpos se puede modificar aún más si se desea. Uno o más de dichos anticuerpos se puede formular, por ejemplo, como una composición farmacéutica.

[0140] Los anticuerpos anti-IL-13 que se revelan en la presente invención también resultan útiles para aislar, purificar y/o detectar la IL-13 en el sobrenadante, el lisato celular o en la superficie celular. Los anticuerpos que se revelan en la presente invención se pueden utilizar en forma dignóstica para monitorear los niveles proteicos de IL-13 como parte de un procedimiento de pruebas clínicas. De una manera adicional, los anticuerpos revelados en la presente invención se pueden utilizar en los tratamientos que requieren la neutralización y/o la inhibición de una o más Actividades asociadas con la IL-13, por ejemplo el asma alérgica o no alérgica, y las patologías relacionadas. La presente revelación también proporciona polinucleótidos y polipéptidos aislados y purificados nuevos relacionados con los anticuerpos nuevos direccionados contra la IL-13 humana. Los genes, polinucleótidos, proteínas y polipéptidos revelados en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo murino a IL-13 (mAb13.2) y las variantes del mismo.

[0141] Polinucleótidos y Polipéptidos del anticuerpo anti-IL-13

[0142] Por ejemplo, la revelación proporciona polinucleótidos purificados y aislados que codifican la región variable de un anticuerpo murino a IL-13 que modula una o más actividades asociadas con la IL-13 (por ejemplo, neutraliza la bioactividad de la IL-13) (mAb13.2), una versión quimérica de mAb13.2 (ch13.2), una versión parcialmente humanizada de mAb13.2 (h13.2v1) y dos versiones completamente humanizadas de mAb13.2 (h13.2v2 y h13.2v3).

[0143] Las secuencias de nucleótidos pueden incluir las que codifican las regiones variables de cadena liviana de mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, y h13.2v3 y se establecen en la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, y SEQ ID NO:33, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos también incluyen las que codifican las regiones variables de cadena pesada de mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, y h13.3v3 se establecen en la SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, y SEQ ID NO:34, respectivamente. Los polinucleótidos también pueden incluir los polinucleótidos que hibridizan bajo condiciones muy estrictas a cualquiera de las secuencias establecidas en las SEQ ID NOs:1-8, 33, y 34, o los complementos de las mismas, y / o que codifican polipéptidos que conservan la actividad biológica sustancial (es decir, los fragmentos activos) de las regiones variables codificadas por estas secuencias. Los polinucleótidos tambiénpueden incluir porciones continuas de cualquiera de las seucencias establecidas en las SEQ ID NOs:1-8, 33, y 34, que comprenden por lo menos 21 nucleótidos consecutivos. La Tabla 2 sintetiza los Nos de ID de las SEQ para las secuencias de nucleótidos de muchos de los nucleótidos ejemplares.

Tabla 2: Números de Identificación de Secuencia (Nos de ID de la SEQ) de los Polinucleótidos de la invención

	mAB13.2	ch13.2	h13.2v1	h13.2v2	h13.2v3
Región VL	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:33
Región VH	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:34

[0144] La secuencia de aminoácidoss de la región variable de cadenas livianas de mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, y h13.2v3 se establecen en las SEQ ID NOs:9, 10, 11, 12, y 35, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadenas pesadas de mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, y h13.2v3 se establecen en las SEQ ID NOs:13, 14, 15, 16, y 36, respectivamente. Los polipéptidos revelados en la presente invención también incluyen las porciones continuas de cualquiera de las secuencias establecidas en las SEQ ID NOs:9-16, 35, y 36 que comprenden por lo menos 4 aminoácidos consecutivos y que conservan la actividad biológica esencial (es decir, los fragmentos activos) de estas regiones variables. Con preferencia, los polipéptidos de la presente solicitud incluyen las porciones continuas de cualquiera de las secuencias establecidas en las SEQ ID NOs:9-16, 35, y 36 que comprenden 5-7 aminoácidos. Los polipéptidos que tienen mayor preferencia de la presente solicitud incluyen cualquiera de las porciones continuas de cualquiera de las secuencias establecidas en las SEQ ID NOs:9 y 13, SEQ ID NOs:10 y 14, SEQ ID NOs:11 y 15, SEQ ID NOs:12 y 16, y SEQ ID NOs:35 y 36 que conservan la actividad biológica esencial de mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, y h13.2v3, respectivamente. Los polinucleótidos que se revelan en la presente invención también incluyen, de manera adicional a aquellos polinucleótidos que se describieron con anterioridad, los polinucleótidos que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos establecidos en las SEQ ID NOs:9-16, 35 y 36, o una porción continua de los mismos y que difieren de los polinucleótidos que se describieron con anterioridad sólo debido a la degeneración bien conocida del código genético. La Tabla 3 resume las SEQ ID NOs para la secuencia de aminoácidos de muchos de los polipéptidos que se revelan en la

presente invención. Por ejemplo, la Tabla 3 resume los NOS de ID de la SEQ ID para la secuencia de aminoácidos para las cadenas variables livianas (VL), las cadenas variables pesadas (VH), las cadenas pesadas constantes (CH), las cadenas livianas constantes (CL), las CDR1 de las cadenas variables livianas (L1), las CDR2 de las cadenas variables livianas (L2), las CDR3 de las cadenas variables livianas (L3), las CDR1 de las cadenas variables pesadas (H1), las CDR2 de las cadenas variables pesadas (H2), y las CDR3 de las cadenas variables pesadas (H3) de los anticuerpos mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2 y h13.2v3.

Tabla 3: Números de ID de la Secuencia (SEQ ID NOs) de los polipéptidos ejemplares.

	mAb13.2	ch13.2	h13.2v1	h13.2v2	h13.2v3
VL	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:35
VH	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:36
CH		SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:17
CL		SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:18
L1	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:19
L2	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:20
L3	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:21
H1	SEQ ID	SEQ ID NO:22	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID

	NO:22		NO:22	NO:22	NO:22
H2	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:23
H3	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:24

[0145] Los polinucleótidos aislados que se revelan en la presente invención pueden ser utilizados como sondas de hibridación y cebadores para identificar y aislar los ácidos nucleicos que tienen secuencias idénticas a o similares a las que codifican a los polinucleótidos revelados. Los métodos de hibridación para identificar y aislar los ácidos nucleicos incluyen la reacción de la cadena de polimerasa (PCR), la hibridización del Sur, la hibridización *in situ* y la hibridización del Norte, y son bien conocidos por las personas idóneas en el arte previo.

[0146] Las reacciones de hibridización se pueden realizar bajo condiciones diferentes de exigencia. El carácter estricto de una reacción de hibridización incluye la dificultad con la cual cualquiera de las moléculas de ácido nucleico hibridizará a una de las otras. Con preferencia, cada polinucleótido hibridizante hibridiza a su polinucleótido correspondiente bajo condiciones reducidas de estrictez, con mayor preferencia con condiciones de estrictez y con mayor preferencia con altas condiciones de estrictez. Los ejemplos de las condiciones de estrictez se muestran en la Tabla 4 que figura a continuación: las condiciones de alta exigencia son aquéllas que son por lo menos tan estrictas como, por ejemplo, las condiciones A-F; las condiciones de estrictez son por lo menos tan estrictas como, por ejemplo, las condiciones G-L; y las condiciones de exigencia reducida son por lo menos tan estrictas como, por ejemplo, las condiciones M-R.

TABLA 4

Condición de estrictez	Híbrido Polinucleótido	Longitud del híbrido (bp)[1]	Temperatura de Hibridización y Solución amortiguadora[2]	Temperatura de Lavado y Solución Amortiguadora[2]
A	DNA:DNA	> 50	65ºC; 1X SSC -or- 42ºC; 1X SSC, 50% formamida	65ºC; 0.3X SSC
B	ADN:AND	<50	T_B*; 1X SSC	T_B*; 1X SSC
C	ADN:ARN	> 50	67ºC; 1X SSC -or- 45ºC; 1X SSC, 50% formamida	67ºC; 0.3X SSC
D	ADN:ARN	<50	T_D*; 1X SSC	T_D*; 1X SSC
E	ARN:ARN	>50	70ºC; 1X SSC -or- 50ºC; 1X SSC, 50% formamida	70ºC; 0.3X SSC
F	ARN:ARN	<50	T_F*; 1X SSC	T_F*; 1X SSC
G	AND:ADN	>50	65ºC; 4X SSC -or- 42ºC; 4X SSC, 50% formamida	65ºC; 1X SSC
H	ADN:AND	<50	T_H*; 4X SSC	T_H*; 4X SSC
I	AND:ARN	>50	67ºC; 4X SSC -or- 45ºC; 4X SSC, 50% formamida	67ºC; 1X SSC
J	ADN:ARN	<50	T_J*; 4X SSC	T_J*; 4X SSC
K	ARA:ARN	>50	70ºC; 4X SSC -or- 50ºC; 4X SSC, 50% formamida	67ºC; 1X SSC
L	ARN:ARN	<50	T_L*; 2X SSC	T_L*; 2X SSC
M	ADN:ADN	>50	50ºC; 4X SSC -or- 40ºC; 6X SSC, 50% formamida	50ºC; 2X SSC
N	ADN:ADN	<50	T_N*; 6X SSC	T_N*; 6X SSC
O	ADN:ARN	>50	55ºC; 4X SSC -or- 42ºC; 6X SSC, 50% formamida	55ºC; 2X SSC
P	ADN:ARN	<50	T_P*; 6X SSC	T_P*; 6X SSC
Q	ARN: ARN	>50	60ºC; 4X SSC -or- 45ºC; 6X SSC, 50% formamida	60ºC; 2X SSC
R	ARN : ARN	<50	T_R*; 4X SSC	T_R*; 4X SSC

1La longitud de los híbridos es la que se anticipó para la(s) región(es) hibridizadas de los polinucleótidos. Cuando se hibridiza a un polinucleótido hasta un polinucleótido blanco de secuencia desconocida, la longitud del híbrido se supone que es la del polinucleótido hibridizante. Cuando los polinucleótidos de la secuencia conocida se hibridizan, la longitud del híbrido se puede determinar por medio del alineamiento de las secuencias de los polinucleótidos y de la identificación de la región o las regiones de complementariedad óptima de la secuencia.

2SSPE (1xSSPE es 0.15 M NaCl, 10 mM NaH_2PO_4, y 1.25 mM EDTA, pH 7.4) se puede sustituir por SSC (1xSSC es 0.15 M NaCl y 15 mM de citrato de sodio) en la hibridización y las soluciones amortiguadoras de lavado se realizan durante 15 min después de haber completado la hibridización.

T_B* - T_R*: La temperatura de hibridación para los híbridos que se anticipó que sería menor de 50 pares de base de longitud debe ser 5-10ºC menor de la temperatura de fusión (T_m) del híbrido, donde T_m se determina de acuerdo con las ecuaciones siguientes. Para los híbridos de menos de 18 pares de bases de longitud, T_m(ºC) = 2(# of A + T bases) + 4(# of G + C bases). Para los híbridos de entre 18 y 49 pares de bases de longitud, T_m(ºC) = 81.5 + 16.6($\log_{10}Na^+$) + 0.41(%G + C) - (600/N), donde N es la cantidad de bases en el híbrido, y Na^+ es la concentración de iones de sodio en la solución amortiguadora de hibridización (Na^+ para 1X SSC = 0.165 M).

Los ejemplos adicionales de las condiciones de estrictez para la hibridización de los polinucleótidos se proporcionan en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Chs. 9 & 11, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989), and Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Sects. 2.10 & 6.3-6.4, John Wiley & Sons, Inc. (1995), que se incorporan en la presente invención a título de referencia.

[0147] Los polinucleótidos que se revelan en la presente invención se pueden utilizar como sondas de hibridización y sebadores para identificar y aislar el ADN que tenga secuencias que codifican las variantes alélicas de los polinucleótidos revelados. Las variantes alélicas son formas alternativas que se producen de manera natural de los polinucleótidos revelados que codifican a los polipéptidos que son idénticos a o tienen una semejanza significativa a los polipéptidos codificados por los polinucleótidos revelados. Con preferencia, las variantes alélicas tienen por lo menos una identidad de secuencia del 90% (con mayor preferencia, por lo menos una identidad del 95%; con mayor preferencia, por lo menos una identidad del 99%) con los polinucleótidos revelados.

[0148] Los polinucleótidos aislados revelados en la presente invención también se pueden utilizar como sondas de hibridización y cebadores para identificar y aislar los ADN que tienen secuencias que codifican polipéptidos homólogos a los polinucleótidos revelados. Estos homólogos son polinucleótidos y polipéptidos aislados de una especie diferente de la de los polipéptidos y los polinucleótidos aislados, o dentro de la misma especia, pero con una semejanza significativa de la secuencia a la de los polinucleótidos y los polipéptidos revelados. Con preferencia, los homólogos de los polinucleótidos tienen por lo menos 50%, 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97&, 98%, ó 99%, secuencia con los polinucleótidos revelados.

[0149] Los polinucleótidos aislados revelados en la presente invención también se pueden utilizar como sondas de hibridación y cebadores para identificar las células y los tejidos que expresan los anticuerpos y las condiciones bajo las cuales se expresan.

[0150] Los polinucleótidos aislados que se revelan en la presente invención pueden estar operativamente unidos a una secuencia de control de expresión para la producción recombinante de los polipéptidos que se describen en la presente invención. Un polinucleótido se puede unir de manera operativa a un nucleótido que codifica una región constante, por ej., la región constante de uno de los varios isotipos del anticuerpo. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica una región variable de cadena liviana que se revela en la presente invención (por ejemplo, cualquiera de los que se establecen en las SEQ ID NOs:1-4, y 33) pueden unirse de manera operativa a una secuencia de nucleótidos que codifica a la región constante (o a los derivados de la misma) o ya sea una cadena liviana de kappa (por ejemplo, como se establece en la SEQ ID NO:18) o la cadena liviana de lambda, de manera tal que la expresión de los nucleótidos unidos dará como resultado una cadena completa kappa o lambda liviana con una región variable que se une de manera específica a la IL-13, interfiere con la formación de un complejo funcional de señalización de la Il-13, y neutraliza una o más de las actividades asociadas con la IL-13. De una manera similar, un polinucleótido que codifica una región variable de cadena pesada que se revela en la presente invención (por ejemplo, cualquiera de las que se establecen en las SEQ ID NOs:5-8, y 34) se pueden unir operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de un isotipo de cadena pesada (o los derivados de la msima), por ejemplo, IgM, IgD, IgE, IgG e IgA. Los métodos generales de expresión de las proteínas recombinantes son bien conocidos en el arte previo. Tales proteínas recombinantes se pueden expresar en forma soluble para utilizarse en el tratamiento de los trastornos que resultan de la señalización mediada por la IL-13- (por ejemplo, el asma alérgica y no alérgica).

[0151] Los vectores de expresión recombinante que se revelan en la presente invención pueden portar secuencias adicionales, tales como las secuencias que regulan la replicación del vector en las células huéspedes (por ejemplo, los orígenes de la replicación) y los marcadors genéticos seleccionables. El marcador genético seleccionable facilita la selección de las células huéspedes dentro de las cuales el vector ha sido introducido (véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos de América Nos. 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017). Por ejemplo, de manera típica el marcador genético seleccionable confiere resistencia al a droga, tal como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped dentro de la cual el vector ha sido introducido. Los marcadores genéticos seleccionables preferidos incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para utilizar en las células huéspedes dhfr$^-$ con selección / amplificación de metotrexato) y el gen *neo* (para la selección de G418).

[0152] Una cantidad de líneas celulares son células huéspedes adecuadas para la expresión recombinante. Las líneas celulares de céluls huéspedes de mamíferos incluyen, por ejemplo, las células COS, las células CHO, las células 293T, las células A431, las células 3T3, las células CV-1, las células HeLa, las céluls L, las células BHK21, las células HL-60, las células U937, las células HaK, las células Jurkat, al igual que las cepas celulares derivadas del cultivo *in vitro* del tejido primario y de los explantes primarios.

[0153] Alternativamente, puede ser posible producir polipéptidos de manera recombinante en los eucariotas menores tales como la levadura (por ejemplo, las cepas *Saccharomyces*, *Pichia, Kluyveromyces*, y *Candida*) o en las procariotas (por ejemplo, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, y *Salmonella typhimurium*). Los polipéptidos efectuados en las levaduras o en las bacterias se pueden modificar, por ejemplo, la glicosilación de los sitios adecuados.

[0154] Los polipéptidos también se pueden producir en las células de animales, por ejemplo, las células de insectos o de mamíferos. Por ejemplo, una secuencia que

codifica al polipéptido se pueden insertar dentro de un vector de expresión de un insecto, tal como el vector del baculovirus, y se puede utilizar en el sistema de expresión celular de un insecto (por ejemplo, el kit MAXBAC, Invitrogen, Carlsbad, CA).

[0155] Los polipéptidos que se revelan en la presente invención pueden ser purificados a partir del medio de cultivo o de los extractos celulares utilizando los procesos conocidos de purificación, tales como el gel de filtración y la cromatografía de intercambio de iones. La purificación también puede incluir la cromatografía por afinidad con los agentes conocidos para unirse a los polipéptidos que se revelan en la presente invención.

[0156] De manera alternativa, los polipéptidos que se revelan en la presente invención también se pueden expresar de manera recombinante en una forma que facilita la purificación. Por ejemplo, los polipéptidos se pueden expresar como las fusiones con las proteínas tale scomo la proteína que se une a la maltosa (MBP), glutatión-S-transferasa (GST), o la tioredoxina (TRX) o como las fusiones con hexa-histidina, penta-histidina, o los pequeños rótulos de epitodo, por ejemplo, el epitodo de FLAG.

[0157] Los polipéptidos que se revelan en la presente invención también abarcan las moléculas que son estructuralmente diferentes de los polipéptidos revelados (por ejemplo, que tienen una secuencia ligeramente alterada), pero que tienen esencialmente las mismas propiedades bioquímicas que los polipéptidos revelados (por ejemplo, son modificadas sólo en los residuos de aminoácidos funcionalmente no esenciales). Tales moléculas incluyen las variantes alélicas que se producen naturalmente y las variantes construidas deliberadamente que contienen alteraciones, sustituciones, reemplazos, inserciones o eliminaciones. Las técnicas para tales alteraciones, sustituciones, reemplazos, inserciones o eliminaciones son bien conocidas para las personas idóneas en el arte previo.

[0158] Agentes Aglutinantes de IL-13

[0159] También se brindan agentes aglutinantes, que no sean agentes aglutinantes consistentes en anticuerpos y sus fragmentos, que se unen a IL-13, particularmente agentes aglutinantes que compiten con mAb13.2 y otros anticuerpos que se describen aquí para unirse con IL-13. Por ejemplo, los agentes aglutinantes se pueden unir al mismo epitopo o un epitopo superpuesto, tal como mAb13.2 sobre IL-13. Los agentes aglutinantes preferiblemente inhiben o neutralizan la actividad de IL-13. Por ejemplo, los agentes aglutinantes inhiben la unión de IL-13 a IL-4Rα, y, por ejemplo, no previenen la unión de IL-13 a IL-13RI1. Dichos agentes aglutinantes se pueden utilizar en los métodos que se describen aquí, por ejemplo, los métodos para el tratamiento y prevención de desórdenes. Todas las realizaciones que se describen aquí se pueden adaptar para su uso con agentes aglutinantes de IL-13.

[0160] Los agentes aglutinantes se pueden identificar por un número de medios, incluyendo la modificación de un dominio variable que se describe aquí o la inserción de uno o más CDR de un dominio variable que se describe aquí sobre otro andamiaje. Los agentes aglutinantes también se pueden identificar a partir de diversas bibliotecas, es decir, por despistaje. Un método para el despistaje de bibliotecas de proteínas utiliza la exposición de fagos. Se varían algunas regiones en particular de proteínas y se identifican las proteínas que interactúan con IL-13, por ej., por retensión sobre un soporte sólido y por otra asociación física. Para identificar los agentes aglutinantes particulares que se unen al mismo epitopo o a un epitopo superpuesto como mAb13.2 sobre IL-13, los agentes aglutinantes se eluyen con la adición de mAb13.2 (o un anticuerpo relacionado), o los agentes aglutinantes se pueden evaluar en experimentos de competencia con mAb13.2 (o un anticuerpo relacionado). También se puede agotar la biblioteca de agentes que se unen a otros epitopos al poner en contacto la biblioteca con un complejo que contiene IL-13 y mAb13.2 (o un anticuerpo relacionado). La biblioteca agotada se puede poner en contacto con IL-13 para obtener un agente aglutinante que se une a IL-13 pero no a IL-13 cuando está unido por mAb13.2.

También es posible usar péptidos de IL-13 que contienen el péptido de mAb13.2 como objetivo.

[0161] La exposición de fagos se describe por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos de América 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 Barbas et al. (1991) *PNAS* 88:7978-7982. La exposición del sustrato de levadura se describe, por ej., en Boder and Wittrup (1997) *Nat. Biotechnol.* 15:553-557. Otra forma de exposición es la exposición de ribosama. Véase, por ej., a Mattheakis et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 91:9022 y 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.

[0162] Los agentes aglutinantes que unen al IL-13 pueden tener características estructurales de un andamiaje de proteínas, por ej., un dominio doblado. Un dominio de andamiaje ejemplar, basado en un anticuerpo, es un andamiaje "minicuerpo" que se diseña por la supresión de tres cadenas beta de un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo monoclónico (Tramontano et al., 1994, J. *Mol. Recognit.* 7:9; y Martin et al., 1994, The EMBO Journal 13, pp. 5303-5309). Estos dominios incluyen 61 residuos y se pueden usar para presentar dos bucles hipervariables, por ej., uno o más bucles hipervariables de un dominio variable que se describe aquí o una variante que se describe aquí. En otro enfoque, el agente aglutinante incluye un dominio de andamiaje que es un dominio V-like (Coia et al. WO 99/45110). Los dominios V-like se refieren a un dominio que presenta características estructurales similares a dominios de anticuerpos variables pesados (VH) o livianos (VL). Otro dominio de andamiaje se

deriva de tendamistatina, un residuo 74, una hoja beta tipo sándwich de seis hebras que se mantiene unida por dos uniones de disulfidos (McConnell y Hoess, 1995, J. Mol. Biol. 250:460). Las proteínas padre incluyen tres bucles. Los bucles se pueden modificar (por ej., utilizado los CDR o los bucles hipervariables que se describen aquí) o se pueden variar, por ej., para seleccionar dominios que se unen a IL-13. WO 00/60070 describe una estructura sándwich tipo β derivada del dominio extracelular de CTLA-4 que ocurre en forma natural que se utiliza como andamiaje.

[0163] Aún otro dominio de andamiaje para un agente aglutinante IL-13 es un dominio basado en un dominio de fibronectina tipo III o proteínas relacionadas similares a la fibronectina. El doblez global del dominio de la fibronectina tipo III (Fn3) está estrechamente relacionado con el de los fragmentos de los anticuerpos funcionales más pequeños, la región variable o el anticuerpo de cadena pesada. El Fn3 es un sándwich tipo β similar al del anticuerpo del dominio VH, excepto que el Fn3 tiene siete hebras β en vez de nueve. Hay tres bucles en la terminación del Fn3; las posiciones de los bucles BC, DE y FG aproximadamente corresponden a las de CDR1, 2 y 3 del dominio VH del anticuerpo. El Fn3 es muy ventajoso porque no tiene uniones de disulfidos. Por tanto, el Fn3 es estable bajo condiciones reducidas, al contrario de los anticuerpos y sus fragmentos (véase WO 98/56915; WO 01/64942; WO 00/34784). Un dominio Fn3 se puede modificar (por ej., utilizando las CDR o bucles hipervariables que se describen aquí) o se puede variar, por ej., para seleccionar dominios que se unen a IL-13.

[0164] Aún otro andamiaje ejemplar incluye: receptores de células T; proteínas MHC; dominios extracelulares (por ej., repeticiones de fibronectina Tipo III, repeticiones de EGF); inhibidores de la proteasa (por ej., dominios Kunitz, ecotin, PBTI y similares); repeticiones de TPR; estructuras trifoil; dominios de dedos de zinc; proteínas que se unen al ADN; particularmente proteínas que se unen al ADN monomérico; proteínas que se unen al ARN; chaperones, por ej., tioredoxina y proteínas de choque térmico; y dominios de señalización intracelular (tales como los dominios SH2 y SH3). La patente

Estados Unidos de América No. 20040009530 describe ejemplos de andamiajes alternos.

[0165] Algunos ejemplos de dominios de andamiajes pequeños incluyen: dominios Kunitz (58 aminoácidos, 3 uniones de disulfidos), dominios inhibidores de tripsina máxima cucurbida (31 aminoácidos, 3 uniones de disulfidos), dominios relacionados a la guanilia (14 aminoácidos, 2 uniones de disulfidos), dominios relacionados a la enterotoxina IA con estabilidad térmica de la bacteria gram negativa (18 aminoácidos, 3 uniones de disulfidos), dominios fúngicos que se unen a los carbohidratos (35 aminoácidos, 2 uniones de disulfidos), dominios de endotelina (18 aminoácidos, 2 uniones de disulfidos) y dominios de estreptococos G que se unen a IgG (35 aminoácidos, sin uniones de disulfidos). Algunos ejemplos de dominios de andamiajes intracelulares pequeños incluyen SH2, SH3 y dominios EVH. De forma general se puede utilizar cualquier dominio intracelular o extracelular.

[0166] Algunos ejemplos de criterios para evaluar un dominio de andamiaje pueden incluir: (1) secuencia de aminoácidos, (2) secuencias de varios dominios homólogos, (3) estructuras tridimensionales y/o (4) datos de estabilidad sobre un rango de pH, temperatura, salinidad, solvente orgánico, concentración de oxidantes. En una realización, el dominio de andamiaje es un dominio estable de proteínas, por ej., una proteína de menos de 100, 70, 50, 40 o 30 aminoácidos. El dominio puede incluir una o más uniones de disulfidos o puede ser un quelado de un metal, por ej., zinc.

[0167] Aún otros agentes aglutinantes se basan en los péptidos, por ej., proteínas con una secuencia de aminoácidos que es menor a 30, 25, 24, 20, 18, 15 o 12 aminoácidos. Los péptidos se pueden incorporar en una proteína más grande, pero de forma típica a una región que se puede unir de forma independiente a IL-13, por ej., a un epítopo que se describe aquí. Los péptidos pueden identificarse por medio de exhibición de fagos.

[0168] Un agente aglutinante de IL-13 puede incluir uniones que no sean péptidas y otras modificaciones químicas. Por ejemplo, el agente aglutinante se puede sintetizar en

todo o en parte como un peptidomimético, por ej., un peptoide (véase, por ej., Simon et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9367-71 y Horwell (1995) Trends Biotechnol.13:132-4). Un agente aglutinante puede incluir una o más (por ej., todas) uniones no hidrolizables. En la ciencia se conocen muchas uniones de péptidos no hidrolizables, junto con los procedimientos para la síntesis de péptidos que contienen dichas uniones. Ejemplos de uniones no hidrolizables incluyen uniones bajas en amidas – $[CH_2NH]$--péptidas, uniones quetometilenas $[COCH_2]$--péptidas, uniones --[CH(CN)NH]--(cianometileno)amino péptidas, uniones hidroxietilena –$[CH_2CH(OH)]$--péptidas, uniones --$[CH_2O]$--péptidas y uniones tiometilena --$[CH_2S]$--péptidas (véase por ej., la patente de Estados Unidos de América No. 6,172,043).

[0169] Composición Farmacéutica, Dosificaciones y Modos de Administración

[0170] Los anticuerpos anti-IL-13 (u otros agentes aglutinantes de IL-13) se pueden incorporar en una composición farmacéutica, por ej., por combinación con un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Una composición tal puede contener, por ej., los diversos diluyentes, rellenos cargadores, sales, estabilizadores, solubilizantes y otros materiales bien conocidos en el arte previo. La denominación "aceptable desde el punto de vista farmacéutico" significa que no interfiere con la efectividad de la actividad biológica de los ingredientes activos. Las características del portador pueden depender de la vía de administración.

[0171] Las composiciones farmacéuticas también pueden contener otros factores, tales como, pero que no se limitan a, otros anticuerpos de anticitoquinas u otros agentes antiinflamatorios tal como se describe con mayor detalle más abajo. Tales factores adicionales y / o agentes pueden ser incluidos en la composición farmacéutica para producir un efecto sinergístico con un anticuerpo que se describe aquí. Por ejemplo, en el tratamiento del asma alérgico, una composición farmacéutica puede también incluir los anticuerpos anti-IL-4 o las drogas conocidas par reducir una respuesta alérgica.

[0172] En una realización, la composición farmacéutica incluye al anticuerpo IL-13 como el único ingrediente biológico (por ej., el único componente proteínico) o el único ingrediente biológicamente activo. Por ejemplo, la composición puede incluir menos de 25, 20, 15, 10, 5, 3, 2, 1, 0.4, o 0.1% de otros componentes proteínicos pero por peso respectivo.

[0173] Las composiciones farmacéuticas pueden estar bajo la forma de un liposome en el cual se combina un anticuerpo de la invención, de manera adicional con otros portadores aceptables desde el punto de vista farmacéutico, con agentes amfipáticos tales como los lípidos que existen en la forma agregada como las micelas, las monocapas insolubles, los cristales líquidos, o las capas lamelares mientras que están en solución acuosa. Los lípidos adecuados para la formulación liposomal incluyen, sin limitaciones, los monoglicéridos, los diglicéridos, los sulfátidos, la lisolecitina, los fosfolípidos, la panonina, los ácidos biliares y otros similares. La preparación de tales formulaciones liposomales está dentro del nivel de idoneidad en el arte previo, según se reveló, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos de América Nos. 4.235.871; 4.501.728; 4.837.028; y 4.737.323, todas las cuales se incorporan a la presente invención a modo de referencia.

[0174] Tal como se utiliza en la presente invención, la denominación "cantidad efectiva desde el punto de vista terapéutico" significa la cantidad total de cada componente activo de la composición farmacéutica o del método que es suficiente para mostrar un beneficio significativo para el paciente, por ejemplo, la mejoría de los síntomas de, la sanación de, o el aumento de la velocidad de sanación de tales condiciones. Cuando se aqplica a un ingrediente activo individual, administrado solo, el término se refiere a ese ingrediente sólo. Cuando se aplica a una combinación, el término se refiere a las cantidades combinadas de los ingredientes activos que dan como resultado un efecto terapéutico, ya sea que se administre en forma combinada, en forma serial o simultánea.

[0175] En la práctica de un método ejemplar de tratamiento o de uso que se describe en la presente invención, una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo que se une a la IL-13 e interfiere con la formación de un complejo funcional de señalización de la Il-13 (y, por ejemplo, neutraliza o inhibe una o más actividades asociadas con la IL-13),

se puede administrar a un sujeto, por ejemplo, mamífero (por ejemplo, un humano). Un anticuerpo puede ser administrado de acuerdo con los métodos que se describen ya sea solos o en combinación con otras terapias tales como los tratamientos que emplean las citoquinas, las linfoquinas u otros factores hematopoyéticos, o los angentes antiinflamatorios. Cuando se administran en forma conjunta con uno o más agentes, el anticuerpo se puede adminsitrar ya sea de manera simultánea con el segundo agente, o separadamente, por ej., en forma secuencial. En caso de administrarse separadamente, por ej., en forma secuencial, el médico responsible decidirá sobre la secuencia adecuada de administración del anticuerpo combinado con los otros agentes.

[0176] La administración de una composición farmacéutica (por ejemplo, una composición farmacéutica que contenga un anticuerpo que se una a la a IL-13) se puede llevar a cabo en una variedad de maneras convencionales, tales como la ingesta oral, la inhalación o la inyección cutánea, subcutánea, o endovenosa. Se prefiere la administración subcutánea al paciente.

[0177] Cuando una cantidad efectiva desde el punto de vista terapéutico de un anticuerpo que se une a la IL-13 e interfiere con la formación de un complejo funcional de señalización de la Il-13 se administra por vía oral, el agente de unión estará en la forma de un comprimido, cápsula, polvo, solución o elixir. Cuando se administra en forma de comprimidos, una composición farmacéutica puede contener de manera adicional un portador sólido como por ejemplo una gelatina o un adyuvante. El comprimido, la cápsula y el polvo contienen desde alrededor del 5 hasta el 95% del agente de unión y con preferencia desde alrededor del 25 hasta el 90% del agente de unión. Cuando se administra en forma líquida, se puede agregar un portador líquido tal como el agua, el petróleo, los aceites de origen animal o de una planta tales como el aceite de maní, el aceite mineral, el aceite de soja o el aceite de sésamo, o los aceites sintéticos. La forma líquida de la composición farmacéutica puede contener además solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos, o glicoles tales com el etilenglicol, el propilenglicol o el polietilenglicol. Cuando se administra en forma líquida, la composición farmacéutica contiene desde alrededor de 0.5 hasta 90% por peso del agente de unión y con preferencia desde alrededor de 1 a 50% del agente de unión.

[0178] Cuando una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que se une a la IL-13 se administra por medio de inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, el agente de unión estará en la forma de una solución acuosa, libre de pirógenos, aceptable desde el punto de vista parenteral. La preparación de tales soluciones proteicas aceptables desde el punto de vista parenteral, que tienen debida consideración del pH, la isotonicidad, la estabilidad y otros similares, está dentro de la idoneidad del arte previo. Una composición farmacéutica preferida para las inyeccions endovenosas, cutáneas o subcutáneas deben contener, de manera adicional al agente de unión un vehículo isotónico tal como la Inyección de Cloruro de Sodio, la Inyección de Ringer, la Inyección de Dextrosa, la Dextrosa y la Inyección de Cloruro de Sodio, la Inyección de Lactato de Ringer u otro vehículo como los que se conocen en el arte previo. Una composición farmacéutica también puede contener estabilizadores, conservantes, soluciones amortiguadoras, antioxidants u otros aditivos conocidos por aquellas personas idóneas en el arte previo.

[0179] La cantidad de un anticuerpo (u otro agente aglutinante de IL-13) en la composición farmacéutica puede depender de la naturaleza y la severidad de la condición que está siendo tratada, y de la naturaleza de los tratamientos previos a los cuales se sometió el paciente. En último término, el médico a cargo decidirá la cantidad de anticuerpo con el cual tratar a cada paciente individual. Inicialmente, el médico a cargo administrará dosis bajas del anticuerpo y observará la respuesta del paciente. Las dosis más altas del anticuerpo se pueden adminsitrar hasta obtener el efecto terapéutico óptimo para el paciente y en ese punto la dosificación por lo general no aumenta más. Por ejemplo, se pueden adminsitrar dosis comprendidas dentro del rango de 0.1-50 mg/kg, 0.5-50 mg/kg, 1 –100 mg/kg, 0.5-25 mg/kg, 0.1-15 mg/kg, o 1-8 mg/kg de peso corporal. La composición farmacéutica se puede administrar a pacientes normales o a pacientes que no muestran síntomas, por ej., de modo profiláctico.

[0180] Inhalación

[0181] Una composición que incluye un anticuerpo de IL-13 o un fragmento del mismo se pueden formular para la inhalación u otro modo de liberación pulmonar. Por consiguiente, los compuestos que se describen en la presente invención se pueden administrar por medio de inhalación hacia el tejido pulmonar. La denominación "tejido

pulmonar" tal como se utiliza en la presente invención se refiere a cualquier tejido del tracto respiratorio e incluye tanto el tracto respiratorio superior como el inferior, excepto cuando se indica de otra manera. Un anticuerpo de la IL-13 o un fragmento del mismo se puede administrar en combinación con una o más de las modalidades existentes para tratar las enfermedades pulmonares.

[0182] En un Ejemplo, el compuesto es formulado para un nebulizador. En una realización, el compuesto se puede almacenar en una forma liofilizada (por ejemplo, a temperatura ambiente) y reconstituirse en la solución antes de la inhalación.

[0183] También es posible formular el compuesto para la inhalación utilizando un dispositivo médico, por ejemplo, un inhalador (véanse. por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos de América Nos. 6.102.035 (un inhalador en polvo) y 6.012.454 (un inhalador en polvo seco). Elinhalador puede incluir compartimientos separados para el compuesto activo a un pH adecuado para el almacenamiento y otro compartimiento para una solución amortiguadora neutralizadora y un mecanismo para combinar el compuesto con una solución amortiguadora neutralizadora inmediatamente antes de la atomización. En una realización, el inhalador es un inhalador dosificador.

[0184] Los tres sistemas comunes utilizados para liberar drogas en forma local hacia los pasajes de aire pulmonar incluyen los inhaladores de polvo seco (DPIs), los inhaladores dosificadores (MDI) y los nebulizadores. Los MDI, utilizados en el modo de administración por inhalación más popular, pueden utilizarse para liberar medicamentos en una forma solubilizada o como una dispersión. De manera típica los MDI comprenden un Feón u otro propelente de presión con vapor relativamente alto que fuerza la medicación en forma de aerosol dentro del tracto respiratorio ante la activación del dispositivo, a diferencia de los MDI, los DPI por lo general confían completamente en los esfuerzos respiratorios del paciente para introducir un medicamento en forma de un polvo seco hacia los pulmones. Los nebulizadores forman un aerosol del medicamento para ser inhalados impartiendo energía a una solución líquida. La liberación pulmonar directa de las drogas durante la ventilación del líquido o el lavado pulmonar utilizando el medio fluoroquímico también se ha explorado. Estos y otros

métodos se pueden utilizar para liberar un anticuerpo IL-13 o un fragmento del mismo. En una realización, el anticuerpo de IL-13 o un fragmento del mismo se asocial con un polímero, por ejemplo, un polímero que estabiliza o aumenta la vida media del compuesto.

[0185] Por ejemplo, para la adminsitración por inhalación, un anticuerpo de IL-13 o un fragmento del mismo se libera en forma de spray en aerosol desde un recipiente presurizado que contiene un propelente adecuado o un nebulizador. El compuesto puede estar en la forma de una partícula seca o un líquido. Las partículas que incluyen al compuesto se pueden preparar, por ejemplo, por secado con spray, por secado de una solución acuosa del anticuerpo de la IL-13 o un fragmento del mismo con un agente neutralizante de carga y luego creando partículas del polvo seco, o secando una solución acuosa en un modificador orgánico y luego creando partículas del polvo seco.

[0186] El compuesto se puede liberar de manera conveniente en una forma de presentación de spray en aerosol desde envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otros gases adecuados. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede ser determinada proporcinando una válvula para liberar una cantidad dosificada. Se pueden formular cápsulas y cartuchos para utilizar en un inhalador o insuflador que contengan una mezcla de polvo de un anticuerpo de la IL-13 o un fragmento del mismo y una base de polvo adecuada tal como la lactosa o el almidón, si la partícula es una partícula formulada. De manera adicional al compuesto formulado o no formulado, otros materiales tales como el DPPC al 100% u otros surfactantes se pueden mezclar con el anticuerpo de IL-13 o un fragmento del mismo para promover la liberación del compuesto formulado o no formulado. Los métodos para preparar partículas secas se describen, por ejemplo, en la Publicación PCT WO 02/32406.

[0187] Un anticuerpo de IL-13 o un fragmento del mismo se pueden formular para la liberación en aerosol, por ejemplo, como partículas secas en aerosol, de manera tal que cuando se andministra puede ser rápidamente absorbido y puede producir un resultado terapéutico local o sistémico rápido. La adminsitración se puede ajustar a medida para proporcionar una actividad detectable a los 2 minutos, 5 minutos, 1 hora, o 3 horas de administración. En otras realizaciones, la actividad pico se puede lograr aún más

rápidamente, por ejemplo, dentro de los 30 minutos o aún dentro de los 10 minutos. Un anticuerpo de la IL-13 o un fragmento del mismo se pueden formular para una vida media biológica más prolongada (por ejemplo, por asociación con un polímero tal como PEG) y se puede utilizar como una alternativa para otros modos de administración, por ejemplo, de manera tal que el compuesto ingrese a la circulación desde los pulmones y se distribuya a otros órganos o aun órgano blanco en particular.

[0188] En una realización, el anticuerpo de IL-13 o un fragmento del mismo se libera en una cantidad tal que por lo menos un 5% de la masa de los polipéptidos se libere al tracto respiratorio inferior o el pulmón profundo. El pulmón profundo tiene una red de capilares extremadamente rica. La membrana respiratoria que separa el lumen capilar del espacio de aire alveolar es muy delgada y extremadamente permeable. De manera adicional, la capa líquida que reviste la superficie alveolar es rica en surfactantes pulmonares. En otras realizaciones, por lo menos 2%, 3%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, ó 80% de la composición de un anticuerpo de IL-13 o un fragmento del mismo se libera hacia el tracto respiratorio inferior o el pulmón profundo. La liberación hacia cualquiera o ambos de estos tejidos da como resultado la absorción eficiente del compuesto y una alta biodisponibilidad. En una realización, el compuesto se proporciona en una dosis regulada utilizando, por ejemplo, un inhalador o un nebulizador. Por ejemplo, el compuesto se libera en una forma de unidad de dosificación de por lo menos alrededor de 0.02, 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 5, 10, 20, 40, ó 50 mg/puff o más. El porcentaje de biodisponibilidad se puede calcular de la manera siguiente: el porcentaje de biodisponibilidad = (AUCnoinvasivo/AUCi.v. o s.c.) x (dosisi.v. o s.c./dosisnoinvasiva) x 100.

[0189] A pesar de no ser necesario, los realzadores de la liberación tales como los surfactantes se pueden utilizar además para mejorar la liberación en el pulmón. Un "surfactante" como se utiliza en la presente invención se refiere a un compuesto que tenga mitades hidrofílicas y lipofílicas que promuevan la absorción de una droga por interactuación con una interface entre dos fases que no se pueden mezclar. Los surfactantes son útiles con partículas secas por muchas razones, por ejemplo, la reducción de la aglomeración de partículas, la reducción de fagocitosis de los macrófagos, etc. Cuando se acopla con el surfactante pulmonar, se puede lograr una absorción más eficiente del compuesto debido a los surfactantes, tales como DPPC,

facilitarán en gran medida la difusión del compuesto. Los surfactantes son bien conocidos en el arte previo e incluyen, pero no se limitan a, los fosfoglicéridos, por ejemplo, las fosfatidilcolinas, el L-alfa-fosfatidilcolina dipalmitoilo (DPPC) y el difosfatidil glicerol (DPPG); el hexadecanol; los ácidos grasos, el polietilenglicol (PEG); el poloxietileno-9-; el éter de aurilo; el ácido palmítico; el ácido oleico; el sorbitan triolato (SPAN™ 85); el glicolato; el surfactin; el poloxómero; el éster de ácido graso sorbitano; el trioleato de sorbitano; el tiloxapol y los fosfolípidos.

[0190] Estabilización y Retención

[0191] En una realización, un anticuerpo de la IL-13 o un fragmento del mismo se asocia físicamente con una mitad que mejora su estabilización y / o retención en la circulación, por ejemplo, en la sangre, el suero, la linfa, el lavado broncopulmonar o broncoalveolar u otros tejidos, por ejemplo, mediante por lo menos 1.5, 2, 5, 10, ó 50 veces. Por ejemplo, un anticuerpo de la IL-13 o un fragmento del mismo se puede asociar con un polímero, por ejemplo, un polímero esencialmente no antigénico, tal como los óxidos de polialquileno o los óxidos de polietileno. Los polímeros adecuados variarán de manera sustancial por el peso. Se pueden utilizar polímeros que tienen pesos moleculares de un número promedio comprendido desde alrededor de 200 hasta alrededor de 35.000 (o alrededor de 1.000 a alrededor de 15.000, o alrededor de 2.000 a alrededor de 12.500). Por ejemplo, un anticuerpo de la IL-13 o un fragmento del mismo se pueden conjugar con un polímero soluble en agua, por ejemplo, los polímeros de polivinilo hidrofílicos, por ejemplo el polivinilalcohol y la polivinilpirrolidona. Una lista no limitante de tales polímeros incluye los homopolímeros de óxido de polialquileno tales como el polietilenglicol (PEG) o los propilenglicoles, los polioles polioxietilenados, los polioles, los copolímeros de los mismos y lso copolímeros de los mismos en bloque , con tal que la solubilidad en agua de los copolímeros en bloque se mantenga.

[0192] El peso molecular del polímero puede oscilar hasta alrededor de 500.000 Da, y con preferencia es por lo menos de alrededor de 20.000 Da, o por lo menos de alrededor de 30.000 Da, o por lo menos de alrededor de 40.000 Da. El peso molecular elegido puede depender del tamaño efectivo del conjugado que se debe lograr, la naturaleza (por ejemplo, la estructura, como lineal o ramificada) del polímero y el grado de derivación.

Una unión covalente se puede utilizar para unir un anticuerpo de la IL-13 o un fragmento del mismo con un polímero, por ejemplo, la unión cruzada con el grupo amino N-terminal del anticuerpo y los grupos amino epsilon hallados en los residuos de Lisina del anticuerpo, al igual que otros grupos amino, imino, carboxilo, sulfhidrilo, hidroxilo u otros grupos hidrofílicos. Los polímeros funcionalizados PEG que se pueden unir a un anticuerpo de la IL-13 o un fragmento del mismo están disponibles, por ejemplo, en Shearwater Polymers, Inc. (Huntsville, AL). Las condiciones de reacción para el acomplamiento de PEG y otros polímeros puede variar en función del anticuerpo de IL-13 o un fragmento del mismo, el grado deseado de PEGilación y el polímero utilizado. Algunos factores involucrados en la elección de los derivados de PEG incluyen: el punto de unión deseado (como por ejemplo los grupos R de la lisina o la cisteína), la estabilidad hidrolítica y la reactividad de los derivados, la estabilidad, la toxicidad y la antigenicidad de la unión, la conveniencia de su análisis, etc. Las instrucciones específicas para el uso de cualquier derivado en particular están disponibles por parte del fabricante.

[0193] Los conjugados de un anticuerpo de la IL-13 o un fragmento del mismo y un polímero se pueden separar de los materiales de inicio sin reaccionar, por ejemplo, por filtración por gel o cromatografía de intercambio de iones, por ejemplo, HPLC. Las especies heterólogas de los conjugados se pueden purificar de uno al otro de la misma manera. La resolución de especies diferentes (por ejemplo que contienen uno o dos residuos PEG) también es posible debido a la diferencia en las propiedades iónicas de los aminoácidos no sometidos a reacción (véase, por ejemplo, WO 96/34015).

[0194] Usos Terapéuticos y Profiláctivcos de los anticuerpos anti-IL-13

[0195] Aún en otro aspecto, esta revelación presenta un método para neutralizar y/o inhibir una o más actividades asocidadas de la IL-13 *in vivo* por medio de la administración de un anticuerpo que se una y/o neutralice al IL-13, por ej., un anticuerpo descrito aquí en una cantidad suficiente para inhibir su actividad. Dichos anticuerpos también se pueden administrar a los pacientes para los cuales se requiere la inhibición de una respuesta inflamatoria mediada por la IL-13. Estas condiciones

incluyen, por ejemplo, la inflamación de las vías aéreas, el asma, la fibrosis, la eosinofilia y la mayor producción de moco.

[0196] Hemos demostrado que un anticuerpo que se une a IL-13 reduce la inflamación de las vías aéreas en los monos cynomolgus expuestos al alérgeno *Ascaris suum* (Ejemplo 3.6). También hemos demostrado la regulación por aumento por IL-13 de CD23 en los monocitos de sangre periférica humana. Por consiguiente, los anticuerpos que se revelan en la presente invención que se unen a IL-13, interfieren con la formación de un complejo funcional de señalización de la Il-13, y pueden neutralizar una o más actividades asociadas con la IL-13, se pueden utilizar para reducir la inflamación *in vivo* mediada por la IL-13, por ejemplo, para tratar o prevenir las patologías asociadas con la IL-13, que incluyen el asma y / o sus síntomas asociados y/o los trastornos atópicos (por ejemplo, que resultan del aumento de sensibilidad a la IL-13).

[0197] Por consiguiente, los anticuerpos que se revelan en la presente invención se pueden utilizar para tratar un trastorno asociado con la IL-13, por ejemplo, un trastorno elegido a partir de uno o más de: los trastornos respiratorios, por ejemplo, el asma (por ejemplo, asma alérgica y no alérgica (por ejemplo, el asma debida a la infección con, por ejemplo, el virus sincitial respiratorio (RSV), por ejemplo, en los niños de menor edad)), la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), y otras condiciones que implican la inflamación de las vías aéreas, la eosinofilia, la fibrosis y la producción excesiva de moco, por ejemplo, la fibrosis quística y la fibrosis pulmonar; los trastornos atópicos, por ejemplo, que resultan de una mayor sensibilidad a la IL-13, (por ejemplo, la dermatitis atópica, la urticaria, el eczema, la rinitis alérgica, y la enterogastritis alérgica); las condiciones inflamatorias y / o autoinmunes de la piel (por ejemplo, la dermatitis atópica), los órganos gastrointestinales (por ejemplo, las enfermedades intestinales inflamatorias (IBD), tales como la colitis ulcerosa y / o la enfermedad de Crohn), el hígado (por ejemplo, la cirrosis, el carcinoma hepatocelular), y el escleroderma; los tumores y los cánceres (por ejemplo, los tumores de tejido blando y sólido), como la leucemia, el glioblastoma, y el linfoma, por ejemplo, el linfoma de Hodgkin; las infecciones virales (por ejemplo, de HTLV-1); la fibrosis de otros órganos, por ejemplo, la fibrosis hepática, (por ejemplo, la fibrosis provocada por una hepatitis B

y / o el virus C); y la supresión de la expresión de las respuestas inmunes protectoras de tipo 1, (por ejemplo, durante la vacunación), como se describe en la presente invención.

[0198] Trastornos respiratorios

[0199] Los antagonistas de la IL-13, (por ej., un agente que se una al IL-13 tal como un anticuerpo o un fragmento aglutinante de un antígeno que se describe aquí), se pueden utilizar para tratar o prevenir los trastornos respiratorios que incluyen, pero no se limitan al asma (por ejemplo, el asma alérgica y no alérgica (por ejemplo, debida a la infección, por ejemplo, con el virus sincitial respiratorio (RSV), por ejemplo, en los niños de menor edad)); la bronquitis (por ejemplo, la bronquitis crónica); la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) (por ejemplo, el enfisema (por ejemplo, el enfisema inducido por el cigarrillo); las condiciones que implican la inflamación de las vías aéreas, la eosinofilia, la fibrosis y la producción excesiva de moco, por ejemplo, la fibrosis quística, la fibrosis pulmonar y la rinitis alérgica.

[0200] El asma se puede disparar por medio de innumerables condiciones, por ejemplo, la inhalación de un alergeno, la presencia de una infección en el tracto respiratorio superior o de una infección auditiva, etc. (Opperwall (2003) *Nurs. Clin. North Am.* 38:697-711). El asma alérgico se caracteriza por la hipersensibilidad de las vías aéreas (AHR) a una variedad de estímulos específicos y no específicos, la elevada inmunoglobulina E (IgE) en suero, la excesiva producción de moco en las vías aéreas, el edema y la lesión epitelial bronquial (Wills-Karp, *supra*). El asma alérgica comienza cuando el alergeno provoca una respuesta inmediata temprana de las vías aéreas, la cual con frecuencia es seguida muchas horas más tarde por una fase tardía demorada de la respuesta de las vías aéreas (LAR) (Henderson et al. (2000) *J. Immunol.* 164:1086-95). Durante la LAR, hay un influjo de los esosinófilos, los linfocitos, y los macrófagos a lo largo de la pared de las vías aéreas y el líquido bronquial. (Henderson et al., *supra*). La eosinofilia pulmonar es un sello distintivo del asma alérgico y es responsible de gran parte del daño del epitelio respiratorio (Li et al. (1999) *J. Immunol.* 162:2477-87).

[0201] Las células $CD4^+$ T axuxiliares (Th) son importantes para la inflamación crónica asociada con el asma (Henderson et al., *supra*). Diversos estudios han demostrado que

el compromiso de las células $CD4^+$ con las células T helper de tipo 2 (Th2) y la producción subsiguiente de citoquinas de tipo 2 (por ejemplo, IL-4, IL-5, IL-10, e IL-13) son importantes en la respuesta inflamatoria alérgica que conduce a AHR (Tomkinson et al. (2001) *J. Immunol.* 166:5792-5800, y las referencias que se citan en la presente invención). En primer lugar, las células $CD4^+$ T han demostrado que son necesarias para el asma inducida por alergi en los modelos murinos. En segundo lugar, las células $CD4^+$ T que producen citoquinas de tipo 2 se someten a una expansión no solamente en estos modelos animales sino también en pacientes con asma alérgica. En tercer lugar, los niveles de citoquina de tipo 2 aumentan en los tejidos de las vías aéreas de modelos animales y en los asmáticos. En cuarto lugar, las citoquinas Th2 han estado involucradas al desempeñar un papel central en el reclutamiento de eosinófilos en modelos murinos de asma alérgico y las células Th2 transferidas de manera adoptiva han sido correlacionadas con mayores niveles de eotaxina (una sustancia que atrae químicamente eosinófilos de manera potente) en el pulmón al igual que la eosinofilia pulmonar (Wills-Karp et al., *supra*; Li et al., *supra*).

[0202] Los métodos para tartar o prevenir el asma que se describen aquí incluyen aquéllos para el asma extrínseca (que también se conocen como el asma alérgica o el asma atópica), el asma intrínseca (que también se conoce como el asma no alérgica o el asma no atópica) o las combinaciones de ambas, la cual se ha denominado como asma mixta. El asma extrínseca o alérgica incluye los incidentes provocados por, o asociados con, por ejemplo, los alergenos, como por ejemplo los pólenes, las esporas, los pastos o las malezas, caspa de las mascotas, polvo, ácaros, etc. Dado que los alergenos y otros irritantes se presentan ellos mismos en distintos puntos que varían a lo largo del año, estos tipos de incidentes también se denominan asma estacional. También se incluye en el grupo del asma extrínseca el asma bronquial y la aspergilosis broncopulmonar alérgica.

[0203] Los trastornos que se pueden tratar o aliviar por medio de los agentes que se describen en la presente invención incluyen los de los los trastornos respiratorios y el asma provocada por agentes infecciosos, tales como los virus (por ejemplo, los virus del resfrío y de la gripe, el virus sincitial respiratorio (RSV), el paramixovirus, el rinovirus y los virus de la influenza. Las infecciones por RSV, rhinovirus y virus de la influenza son communes en los niños, y constituyen una causa principal de las enfermedades del

tracto respiratorio en las criaturas y en los niños. Los niños con bronquiolitis viral pueden desarrolar la respiración dificultosa crónica y el asma, que se pueden tratar utilizando los métodos que se describen en la presente invención. También se incluyen las condiciones asmáticas que podrían desencadenarse en algunos asmáticos por medio del ejercicio y/o el aire frío. Los métodos son útiles para los casos de asma asociados con la exposición al humo del cigarrillo (por ejemplo, el humo inducido por el cigarrillo y el humo industrial), al igual que las exposiciones industriales y ocupacionales, como por ejemplo el humo, el ozono, los gases nocivos, el dióxido de azufre, el óxido nitroso, los vapores, que incluyen los isocianatos, de la pintura, los plásticos, los poliuretanos, los varnices, etc., la madera, los polvos de las plantas u otros polvos orgánicos, etc. Los métodos también son útiles para los incidents asmáticos asociados con los aditivos de los alimentos, los conservantes o los agentes farmacológicos. También se incluyen los métodos para tratar, inhibir o aliviar los tipos de asma denominados como asma silente o asma con variante de tos.

[0204] Los métodos que se revelan en la presente invención también son útiles para el tratamiento y el alivio del asma asociada con el reflujo gastroesofágico (GERD), el cual puede estimular la broncoconstricción. GERD, junto con las secreciones retenidas en forma corporal, suprimieron la tos y la exposición a los alergenos y los irritantes en el dormitorio pueden contribuir a las condiciones asmáticas y han sido denominadas en forma colectiva como el asma de noche o e asma nocturna. En los métodos de tratamiento, la inhibición o el alivio del asma asociada con GERD, una cantidad efectiva desde el punto de vista farmacéutico del antagonista de IL-13 se puede utilizar como se describe en la presente invención en combinación con una cantidad efectiva desde el punto de vista farmacéutico de un agente para tratar GERD. Estos agentes incluyen, pero no se limitan a, los agents inhibidores de la bomba de protons como los comprimidos dc la marca PROTONIX® de pantoprazol sódico de liberación lenta, las cápsulas de la marca PRILOSEC® de omeprazol de liberación lenta, los comprimidos de la marca ACIPHEX® de rebeprazol sódico de liberación lenta o las cápsulas de la marca PREVACID® de lansoprazol de liberación lenta.

[0205] Los trastornos atópicos y los Síntomas de los mismos

[0206] "Atópico" se refiere a un grupo de enfermedades en las cuales a menudo existe una tendencia heredada a desarrollar una reacción alérgica. Los ejemplos de los trastornos atópicos incluyen la alergia, la rinitis alérgica, la dermatitis atópica, el asma y la fiebre del heno. El asma es un trastorno fenotípicamente heterogéneo asociado con síntomas respiratorios intermitentes tales como, por ejemplo, la hipersensibilidad bronquial y la obstrucción reversible del flujo de aire. Las características inmunohistopatológicas del asma incluyen, por ejemplo, la erosión del epitelio de las vías aéreas, la deposición de colágeno por debajo de la membrana del basamento, el edema, la activación de los mastocitos y la infiltración de las células inflamatorias (por ejemplo, por parte de los neutrófilos, los eosinófilos y los linfocitos). La inflamación de las vías aéreas puede contribuir además a la hipersensibilidad de las vías aéreas, la limitación del flujo de aire, la broncoconstricción aguda, la formación de un tapón de moco, la remodelación de las paredes de las vías aéreas y otros síntomas respiratorios. Se puede administrar un antagonista de la IL-13 (por ej., un agente aglutinante de IL-13 tal como un un anticuerpo o un fragmento de antígeno aglutinante) para mejorar uno o más de estos síntomas.

[0207] Los síntomas de la rinitis alérgica (fiebre del heno) incluyen picazón y goteo de nariz, estornudos o obstrucción en la nariz y picazón en los ojos. Se puede administrar un antagonista de la IL-13 para mejorar uno o más de estos síntomas. La dermatitis atópica es una enfermedad crónica (de duración prolongada) que afecta la piel. La información relacionada con la dermatitis atópica está disponible, por ejemplo, en la Publicación NIH No. 03-4272. En la dermatitis atópica, la piel puede llegar a picar extremadamente, producir enrojecimiento, inflamación, piel reseca, sudoración de líquido transparente, y finalmente, asperezas, escamación y engrosamiento. En muchos casos, estos son períodos de tiempo durante los cuales la enfermedad empeora (denominados exacerbaciones o brotes) seguidos por períodos durante los cuales la piel mejora o se limpia por completo (denominados remisiones). La dermatitis atópica a menudo se denomina "eczema," que es un término general para los diversos tipos de

inflamación de la piel. La dermatitis atópica es el más común de los diversos tipos de eczemas. Los ejemplos de la dermatitis atópica incluyen: el eczema de contacto alérgico (la dermatitis: una reacción roja, con picazón, con sudoración entró en contacto con una sustancia que el sistema immune reconoce como extraña, como por ejemplo la hiedra venenosa o ciertos conservantes de cremas y lociones); el eczema de contacto (una reacción localizada que incluye el enrojecimiento, la picazón y el ardor en los cuales la piel entró en contacto con un alergeno (una sustancia que provoca alergia) o con un irritante como un ácido, un agente de limpieza, u otro químico); el eczema dishidrótico (irritación de la piel en las palmas de las manos y las plantas de los pies caracterizada por ampollas transparentes, profundas que pican y arden); la neurodermatitis (parches en capas del cuero cabelludo, las extremidades inferiores, las muñecas o los antebrazos provocadas por una picazón localizada (como por ejemplo la picazón de un insecto, que se irrita con intensidad al rascarse); el eczema numular (parches con forma cónica de la piel irritada – más común en brazos, espalda, nalgas y las extremidades inferiores – que pueden presentar escamaciones, en capas y con extrema picazón); el eczema seborreico (parches de piel amarillenta, oleosa, en capas en el cuero cabelludo, el rostro y ocasionalmente otras partes del cuerpo). Los síntomas particulares adicionales incluyen la dermatitis de estasis, el pliegue atópico (pliegue de Dennie-Morgan), quelitis, palmas hiperlineales, párpados hiperpigmentados: párpados que se han vuelto de color más oscuro por la inflamación o la fiebre del heno, ictiosis, queratosis pilaris, liquenificación, pápulas y urticaria. Un antagonista de la IL-13 (por ej., un agente aglutinante de IL-13 tal como un anticuerpo o un fragmento de antígeno aglutinante descrito aquí) se puede administrar para mejorar uno o más de estos síntomas.

[0208] Un método ejemplar para el tratamiento de la rinitis alérgica o de desórdenes alérgicos puede incluir el inicio de una terapia con un antagonista de IL-13 antes de la exposición a un alergeno, por ej., antes de la exposición estacional al alergeno, por ej., antes que los alergenos proliferen. Dicha terapia puede incluir una o más dosis, por ej., dosis a intervalos regulares.

[0209] Cáncer

[0210] La IL-13 en cáncer y sus receptores pueden estar involucrados en el desarrollo de por lo menos algunos tipos de cáncer, por ejemplo, un cáncer derivado de las células hematopoyéticas o un cáncer derivado de las células cerebrales o neuronales (por ejemplo, un glioblastoma). Por ejemplo, el bloqueo de la vía de señalización de la IL-13, por ejemplo, por medio del uso de un receptor de IL-13 soluble o un ratón deficiente en STAT6 –, conduce a una demora en el inicio del tumor y/o el crecimiento de las líneas celulares del linforma de Hodgkins 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). Se puede apuntar de manera específica a los cánceres que expresan IL-13RI2 (Husain and Puri (2003) J. Neurooncol. 65:37-48; Mintz et al. (2003) J. Neurooncol. 64:117-23) por medio de los anticuerpos anti-IL-13 que se describen en la presente invención. Los antagonistas de IL-13, por ejemplo, los anticuerpos anti-IL-13 y los fragmentos de los mismos, pueden ser útiles para inhibir la proliferación de las células cancerígenas u otra actividad de las células cancerígenas. Un cáncer se refiere a una o más células que tienen una pérdida de hipersensibilidad a los controles del crecimiento normal y de manera típica prolifera con una regulación reducida respecto de un célula normal que corresponde.

[0211] Los ejemplos de cánceres contra los cuales los antagonistas de la IL-13 (por ejemplo un agente aglutinante de IL-13 tal como un fragmento aglutinante del antígeno que se describe aquí) pueden ser útiles, incluyen las leucemias, por ejemplo, la leucemia linfocítica crónica de la célula B, la leucemia mielógena agua y las células T transformadas por el virus tipo 1 (HTLV-1) de la leucemia de las células T humanas; los linfomas, por ejemplo, el linfoma de las células T, el linfoma de Hodgkin; los glioblastomas; los cánceres pancreáticos; el carcinoma de células renales; el carcinoma ovárico; y el sarcoma de Kaposi - SIDA.

[0212] Fibrosis

[0213] Los antagonistas de la IL-13, (por ej., un agente aglutinante de IL-13 tal como un anticuerpo o un fragmento de antígeno aglutinante que se describe aquí), también pueden ser útiles para el tratamiento de la inflamación y la fibrosis, por ejemplo, la fibrosis hepática. La producción de la IL-13 se correlacionó con la progresión de la inflamación hepática (por ejemplo, la hepatitis viral) por la cirrosisto y posiblemente, el carcinoma hepatocelular (de Lalla et al. (2004) *J. Immunol.* 173:1417-1425). La fibrosis se produce, por ejemplo, cuando el tejido normal es reemplazado por el tejido marcado con cicatrices, a menudo después de la inflamación. Los virus de la hepatitis B y la hepatitis C provocan una reacción fibrótica en el hígado, la cual progresa hacia la cirrosis. La cirrosis, a su vez, puede evolucionar hacia complicaciones severas tales como la insuficiencia hepática o el carcinoma hepatocelular. El bloqueo de la actividad de la IL-13 mediante el uso del antagonista de la IL-13s, por ejemplo, los anticuerpos anti-IL-13, que se describen en la presente invención, puede reducir la inflamación y la fibrosis, por ejemplo, la inflamación, la fibrosis y la cirrosis asociadas con las enfermedades hepáticas, específicamente la hepatitis B y C.

[0214] Enfermedad Intestinal Inflamatoria

[0215] La enfermedad intestinal inflamatoria (IBD) es el nombre general de las enfermedades que provocan inflamación de los intestinos. Dos ejemplos de enfermedad intestinal inflamatoria son la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. Se halló que la señalización de IL-13/STAT6 está invoucrada en la hipercontractividad del músculo liso del ratón inducida por la inflamación, a model of inflammatory bowel disease (Akiho et al. (2002) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 282:G226-232). Los antagonistas de la IL-13, (por ej., un agente aglutinante de IL-13 tal como un anticuerpo o un fragmento de antígeno aglutinante que se describe aquí), pueden ser útiles para tartar, prevenir, o aliviar la enfermedad intestinal inflamatoria o uno o más síntomas de la enfermedad intestinal inflamatoria.

[0216] En una realización, un anticuerpo que se describe aquí, por ejemplo, una composición farmacéutica se administra en la terapia combinada, es decir, combinada con otros agentes, por ejemplo, agentes terapéuticos, que son útiles para tratar condiciones o trastornos patológicos, tales como los trastornos alérgicos e inflamatorios. El término "en combinación" en este contexto significa que los agents se dan esencialmente en forma contemporánea, ya sea en forma simultánea o secuencial. Si se dan en forma secuencial, en el inicio de la administración del segundo compuesto, el primero de los dos compuestos es preferentemente aún detectable a concentraciones efectivas en el sitio del tratamiento.

[0217] Por ejemplo, la terapia combinada puede incluir uno o más anticuerpos descritos aquí, es decir, que se unen a la IL-13 e interfieren con la formación de un complejo funcional de señalización de la Il-13, formulado en forma conjunta con, y / o administrado en forma conjunta con uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, uno o más inhibidores de la citoquina y del factor de crecimiento, inmunosupresores, agentes antiinflamatorios, inhibidores metabólicos, inhibidores de las enzimas, y / o agentes citotóxicos o citostáticos, según se describe más abajo con mayor detalle. Además, uno o más de los anticuerpos anti-IL-13 que se describen en la presente invención se pueden utilizar en combinación con dos o más de los agentes terapéuticos que se describen en la presente invención. Tales terapias combinadas pueden utilizar de manera ventajosa dosificaciones menores de los agentes terapéuticos administrados, evitando de ese modo posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias. Además, los agentes terapéuticos que se revelan en la presente invención actúan sobre las vías que difieren de la vía de IL-13 / IL-13-receptor, y de ese modo se espera que mejoren y/o sinergicen con los efectos de los anticuerpos de IL-13.

[0218] Los ejemplos de los agentes terapéuticos adicionales preferidos que se pueden administrar en forma conjunta y/o formular en forma conjunta con uno o más antagonistas de la IL-13, por ejemplo, los anticuerpos anti-IL-13 o los fragmentos de los mismos, incluyen, pero no se limitan a, uno o más de: los esteroides inhalados; los agonistas beta, por ejemplo, los agonistas beta de corta duración o de acción prolongada; antagonistas de leucotrienos o antagonistas de los receptores de los leucotrienos; drogas combinadas tales como ADVAIR®; los inhibidores de IgE, por

ejemplo, los anticuerpos anti-IgE (por ejemplo, XOLAIR®); los inhibidores de la fosfodiesterasa (por ejemplo, los inhibidores de PDE4); las xantinas; las drogas anticolinérgicas; los agentes estabilizadores de los mastocitos tales como un cromolin; los inhibidores de la IL-4; los inhibidores de la IL-5; los inhibidores de la eotaxina / CCR3; y los antihistamínicos. Las combinaciones mencionadas se pueden utilizar para tratar el asma y otros trastornos respiratorios. Los ejemplos adicionales de agentes terapéuticos que se pueden administrar en forma conjunta y / o formular en forma conjunta con uno o más de los anticuerpos anti-IL-13 o los fragmentos de los mismos incluyen uno o más de: los antagonistas de TNF (por ejemplo, un fragmento soluble de un receptor de TNF, por ejemplo, p55 or p75 human TNF recepto o los derivados del mismo, por ejemplo, 75 kd TNFR-IgG (75 kD TNF receptor-IgG proteína de fusión, ENBREL™)); Los antagonistas de la enzima TNF, por ejemplo, los inhibidores de la enzima convertidora de TNFa (TACE)); los antagonistas de los receptores muscarínicos; los antagonistas de TGF-J; el interferón gamma; la perfenidona; los agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, el metotrexato, la leflunomida, o un sirolimus (rapamicina) o un análogo de los mismos, por ejemplo, los inhibidores de CCI-779; COX2 y cPLA2; los NSAID; los inmunomoduladores; los inhibidores de p38, los inhibidores de TPL-2, Mk-2 y NFRB, entre otros.

[0219] También es posible proveer kits para portar la administración combinada de un anticuerpo de IL-13 con uno o más compuestos terapéuticos, o para utilizar los anticuerpos anti-IL-13 como una investigación o herramienta terapéutica para determinar la presencia y / o el nivel de IL-13 en una muestra biológica, como por ejemplo un kit ELISA. En una realización, the kit comprende uno más del anticuerpo anti-IL-13 formulado en un portador farmacéutico, y por lo menos un agente, por ejemplo, un agente terapéutico, formulado como corresponde, en una o más preparaciones farmacéuticas separadas.

[0220] Formulaciones de Vacunas

[0221] Los antagonistas de la IL-13, (por ej., un agente aglutinante de IL-13 tal como un anticuerpo o un fragmento de antígeno descrito aquí), se pueden utilizar para incrementar la eficacia de una formulación de vacuna para inmunizar a un sujeto. Por

ejemplo, un antagonista de la IL-13 se puede administrar ante, durante y / o después de una inmunización para aumentar la eficacia de la vacuna. En una realización, la formulación de la vacuna contiene uno o más antagonistas de la IL-13 y un antígeno, es decir, un inmunógeno. En otra realización, el antagonista de IL-13 y el inmunógeno se administrant por separado, por ejemplo, dentro de una hora, tres horas, un día, o dos días de cada uno de los otros.

[0222] La inhibición de la IL-13 puede mejorar la eficacia de, por ejemplo, las vacunas celulares, por ejemplo, las vacunas contra las enfermedades tales como el cáncer y la infección viral, por ejemplo, la infección retroviral, por ejemplo, la infección por HIV. La inducción de CD8+ linfocitos T citotóxicos (CTL) por medio de vacunas es modulada por disminución por medio de CD4+ células T, probablemente a través de la la IL-13 de la citoquina. La inhibición de IL-13 ha demostrado que mejora la inducción por parte de la vacuna de la respuesta CTL (Ahlers et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:13020-10325). Un antagonista de la IL 13, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL 13 o un fragmento del mismo, un anticuerpo que se describe en la presente invención, se puede utilizar en conjunto con una vacuna para aumentar la eficacia de la vacuna. El cáncer y la infección viral (como por ejemplo la infección retroviral (por ejemplo, HIV)) son trastornos que constituyen un ejemplo contra los cuales puede ser efectiva una respuesta celular a la vacuna. La eficacia de la vacuna es mejorada mediante el bloqueo de la señalización de la IL-13 en el tiempo de la vacunación (Ahlers et al. (2002) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99:13020-25).

[0223] Una formulación de la vacuna se puede administrar a un paciente en la forma de una composición farmacéutica o terapéutica. Las composiciones farmacéuticas que comprenden el antagonista de IL-13s que se describen en la presente invención y un antígeno pueden ser elaboradas por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulado, elaboración de grageas, levigado, emulsificación, encapsulamiento, atrapamiento o liofilización. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de manera convencional utilizando uno o más portadores, diluyentes, excipientes o auxiliares aceptables desde el punto de vista farmacéutico que facilitan el procesamiento de los antígenos y de los antagonistas que se describen en la presente invención en las preparaciones que se pueden utilizar desde el punto de vista

farmacéutico. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida. Las formulaciones sistémicas incluyen las diseñadas para la administración por medio de inyección. Por ejemplo subcutánea, intradérmica, intramuscular o intraperitoneal. Para la inyección, las preparaciones de vacunas se pueden formular en soluciones acuosas, con preferencia en soluciones amortiguadoras fisiológicamente compatibles tales como la solución de Hank, la solución de Ringeer, la solución amortiguadora salina fisiológica de fosfato. La solución puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. De manera alterna, las proteínas pueden estar en forma de polvo para la constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

[0224] Una dosis efectiva se puede estimar en forma inicial utilizando modelos animales. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos animals para locrar una inducicón de una respuesta immune utilizando técnicas que son bien conocidas en el arte previo. La cantidad de la dosis y el intervalo pueden ajustarse de manera individual. Por ejemplo, cuando se utiliza como una vacuna, las formulaciones de vacunas se pueden administrar en alrededor de 1 a 3 dosis durante un período de 1-36 semanas. Con preferencia, se administran 1 ó 2 dosis a intervalos de alrededor de 3 semanas a alrededor de 4 meses y las vacunas de refuerzo se pueden administrar periódicamente de allí en adelante. Los protocolos alternativos pueden ser adecuados para los animales. Una dosis adecuada es una cantidad de la formulación de la vacuna que, cuando se administra como se describió con anterioridad, es capaz de provocar una respuesta inmune en un paciente inmunizado suficiente para proteger al paciente de una infección durante por lo menos 4 a 12 meses. En general, la cantidad de antígeno presente en rangos de dosis de alrededor de 1 pg a alrededor de 100 mg por kg de huésped, de manera típica de alrededor de 10 pg a alrededor de 1 mg, y con preferencia de alrededor de 100 pg a alrededor de 1 Tg. El rango de dosis adecuado variará con la vía de inyección y el tamaño del paciente, pero de manera típica oscilará de alrededor de 0.1 mL a alrededor de 5 mL.

[0225] Métodos de Diagnóstico, Pronóstico y Monitoreo de los Trastornos

[0226] Las proteínas que se unen a la IL-13, por ejemplo, los anticuerpos, que se describen en la presente invención tienen diagnósticos y utilidades *in vitro* e in *vivo*. Un

método que se ofrece a modo de ejemplo incluye: (i) administrar el anticuerpo de IL-13 a un paciente; y (ii) detectar el anticuerpo de IL-13 en el paciente. La detección puede incluir la determinación de la ubicación del anticuerpo de la IL-13 en el paciente. Otro método que se ofrece a modo de ejemplo incluye el contacto de un anticuerpo de la IL-13 con una muestra, por ejemplo, una muestra de un paciente.

[0227] En otro aspecto, la presente invención proporciona un 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, imágenes in vivo imaging en un paciente). El método incluye: (i) poner en contacto una muestra con el anticuerpo de la IL-13; y (ii) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo de IL-13 y la muestra. El método también puede incluir el hecho de poner en contacto una muestra de referencia (por ejemplo, una muestra de control) con el ligando, y determinar la extensión de la formación del complejo entre el ligando y la muestra con respecto a la misma para la muestra de referencia. Un cambio, por ejemplo, un cambio estadístico desde el punto de vista estadístico, en la formación del complejo en la muestra o el paciente relativo a la muestra de control o el paciente puede ser indicativo de la presencia de IL-13 en la muestra.

[0228] El anticuerpo de IL-13 puede ser directa o indirectamente rotulado con una sustancia detectable para facilitar la detección de la proteína unida o no unida. Las sustancias detectables adecuadas incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materials fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radioactivos.

[0229] La formación del complejo entre el anticuerpo de IL-13 e IL-13 se pueden detectar midiendo o visualizando ya sea el ligando unido a la IL-13 o bien el ligando no unido. Se pueden utilizar ensayos convencionales de detección, por ejemplo, un ensayo de inmunoabsorbencia unido a la enzima (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica de tejido. Además de rotular el anticuerpo de IL-13, la presencia de la IL-13 se pueden someter a ensayo en una muestra por medio de un inmunoensayo de competencia utilizando estándars rotulados con una sustancia detectable y un anticuerpo de IL-13 no rotulado.

[0230] Métodos para Diagnosticar, Pronosticar y Monitorear el Progreso del Asma

[0231] También es posible diagnosticar, pronosticar y/o monitorear el progreso del asma y / o los trastornos atópicos (por ejemplo, que resultan de una mayor sensibilidad a IL-13) midiendo el nivel de IL-13 en una muestra biológica. En particular, los anticuerpos revelados en la presente se pueden utiliza en un método para distinguir si un paciente está sufriendo de asma alérgica o asma no alérgica.

[0232] Dichos métodos para diagnosticar el asma alérgica y no alérgica pueden incluir la detección de una altaración, (por ej., la disminución o el aumento) de IL-13 en una muestra biológica, por ejemplo, suero, plasma, líquido de lavado broncoalveolar, sputum, etc. "Diagnóstico" o "diagnosticar" significa identificar la presencia o ausencia de una condición patológica. Los métodos de diagnóstico comprenden la detección de la presencia de la IL-13 mediante la determinación de una cantidad de prueba del polipéptido de la IL-13 en una muestra biológica, por ejemplo, en el fluido del lavado broncoalveolar, de un paciente (mamífero humano o no humano), y la comparación de la cantidad de prueba con una cantidad o rango normal (es decir, una cantidad o rango de un individuo del cual se sabe que no sufre de asma) para el polipéptido de la IL-13. Mientras que un método de diagnóstico en particular puede no proporcionar un diagnóstico definitivo de asma, el mismo basta si el método proporciona una indicación positiva que contribuye al diagnóstico.

[0233] Los métodos para pronosticar el asma y/o los trastornos atópicos pueden incluir la detección de la regulación por incremento de la IL-13, a nivel de la proteína o del ARNm. "Pronóstico" o "pronosticar" significa predecir el probable desarrollo y / o la severidad de una condición patológica. Los métodos de pronóstico implican determinar la cantidad de prueba de la IL-13 en una muestra biológica de un paciente y comparar la cantidad de prueba con una cantidad o rango pronóstico (es decir, una cantidad o rango de individuos con severidades variables de asma) para la IL-13. Varias cantidades de la IL-13 en una muestra de prueba son consistentes con ciertos pronósticos para el asma. La detección de una cantidad de IL-13 en un nivel pronóstico particular proporciona un pronóstico para el paciente.

[0234] La presente invención también proporciona métodos para monitorear el curso del asma y/o los trastornos atópicos al detectar la regulación por incremento de IL-13. El monitoreo de los métodos implica determinar las cantidades de pruebas de IL-13 en las muestras biológicas obtenidas de un paciente en un primer y en un segundo tiempo y al comparar las cantidades. Un cambio en la cantidad de IL-13 entre el primer y el segundo tiempo indica un cambio en el curso del asma y/o el trastorno atópico, con una disminución en la cantidad que indica la remisión del asma y un aumento en la cantidad que indica la progresión del asma y/o el trastorno atópico. Los ensayos de monitoreo mencionados también resultan útiles para evaluar la eficacia de una intervención terapéutica particular (por ejemplo, atenuación y/o reversión de la enfermedad) en los pacientes que están siendo tratados por asma y/o trastornos atópicos.

[0235] Se pueden preparar ligandos de la proteína rotulada con fluoroforo y cromoforo. Dado que los anticuerpos y otras proteínas abasorben luz que tienen longitudes de onda de hasta alrededor de 310 nm, las mitades fluorescentes se deben seleccionar para tener la absorción esencial a las longitudes de onda de alrededor de 310 nm y con preferencia de alrededor de 400 nm. Una variedad de agentes fluorescentes y cromoforos son descriptos por Stryer (*Science* (1968) 162:526) y por Brand et al. (*Annual Rev. Biochem.* (1972) 41:843 868). Los ligandos de la proteína se pueden rotular con grupos cromoforos fluorescentes por medio de los procedimientos convencionales tales como los que se describen en la Patente de los Estados Unidos de América Nos. 3.940.475 4.289.747, y 4.376.110. Un grupo de agentes fluorescentes que tienen un número de las propiedades deseables que se describieron con anterioridad en las tinturas de xanteno, que incluye las floresceínas y las rhodaminas. Otro grupo de compuestos fluorescentes son las naftilaminas. Una vez rotulada con un fluoroforo o un cromoforo, el ligando de la proteína se puede utilizar para detectar la presencia o la localización de la IL-13 en una muestra, por ejemplo utilizando el microscopio fluorescente (tal como microscopía confocal o de espiras).

[0236] Se puede realizar inmunohistoquímica utilizando los ligandos de la proteína que se describen en la presente invención. Por ejemplo, en el caso de un anticuerpo, el anticuerpo se puede sintetizar con un rótulo (tal como una señal de purificación o epitopo), o puede rotularse de manera detectable, por ejemplo por medio de la conjugación de un rótulo o de un grupo de unión al rótulo. Por ejemplo, un agente

quelante se puede unir al anticuerpo. Luego el anticuerpo se prepara con una preparación histológica, por ejemplo una sección fija de tejido que está en un portaobjetos de un microscopio. Luego se analiza la preparación, por ejemplo utilizando microscopio, para identificar si el anticuerpo se une a la preparación.

[0237] El anticuerpo (u otro polipéptido o péptido) pueda estar sin rotular en el momento de la unión. Después de la unión y el lavado, el anticuerpo es rotulado con el objeto de volverlo detectable.

[0238] El anticuerpo de IL-13 también se puede inmobilizar sobre una disposición de proteínas. La disposición de proteínas se puede utilizar como una herramienta diagnóstica, por ejemplo para evaluar las muestras médicas (tales como las células aislados, la sangre, el suero, las biopsias y otros similares). La disposición de proteínas también puede incluir otros ligandos, por ejemplo, que se unan a IL-13 o a otras moléculas que constituyen el blanco.

[0239] Los métodos para producir disposiciones de péptidos 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 and WO 99/51773A1. Los polipéptidos para la disposición se pueden manchar a una velocidad alta, por ejemplo utilizando aparatos robóticos disponibles en el ámbito comercial, por ejemplo en Genetic MicroSystems o BioRobotics. El substrato de disposición puede ser, por ejemplo, nitrocelulosa, plástico, vidrio, por ejemplo modificado por superficie. La disposición también puede incluir una matriz porosa, por ejemplo acrilamida, agarosa u otro polímero.

[0240] Por ejemplo, la disposición puede ser una disposición de anticuerpos, por ejemplo, como se describe en De Wildt, *supra*. Las células que producen los ligandos de la proteína pueden crecer sobre un filtro en un formato dispuesto. La producción de polipéptidos es inducida y los polipéptidos expresados son inmovilizados hasta el filtro en la ubicación de la célula.

[0241] Una disposición de proteínas se puede contactar con un blanco rotulado para determinar la extensión de la unión del blanco a cada polipéptido inmovilizado desde la biblioteca de diversidad de cepas. Si el blanco no está rotulado, se puede utilizar un método sandwich, por ejemplo, utilizando una sonda rotulada para detectar la unión del blanco sin rotular.

[0242] La información acerca de la extensión de la unión en cada dirección de la disposición se puede almacenar un perfil, por ejemplo, en una base de datos de una computadora. La disposición de proteínas se puede producir en replicados y utilizar para comprara los perfiles de unión como por ejemplo de un blanco y un no blanco. Por lo tanto, las disposiciones de proteínas se pueden utilizar para identificar los miembros individuales de la biblioteca de diversidad de cepas que han deseado propiedades de unión con respecto a una o más moléculas.

[0243] El anticuerpo de IL-13 se puede utilizar para rotular las células, por ejemplo, las células de una muestra (por ejemplo, una muestra del paciente). El lligando también está unido (o se puede unir) a un compuesto fluorescente. Las células entonces se pueden almacenar utilizando un distribuidor celular activado fluorescente (por ejemplo, utilizando un distribuidor que está disponible en Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose CA; véase también U.S. la Patente de los Estados Unidos de América Números. 5.627.037; 5.030.002; y 5.137.809). Un haz de láser excita el compuesto fluorescente mientras que un detector cuenta las células que pasan a través de éste y determina si un compuesto fluorescente está ligado a la célula por medio de fluorescencia. La cantidad de unión de rótulo a cada célula se puede cuantificar y analizar para caracterizar la muestra.

[0244] El distribuidor también puede desviar la célula y separar la unión de células por el ligando a partir de las células no unidas por el ligando. Las células separadas se pueden cultivar y/o caracterizar.

[0245] Todavía en otra realización, la invención proporciona 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 tenga un trastorno asociado con la IL-13) un anticuerpo anti-IL-13, conjugado con un marcador detectable; (ii) exponer al paciente a

un medio para detectar el marcador detectable. Por ejemplo, el paciente es sometido a imágenes, por ejemplo por NMR u otros medios tomográficos.

[0246] Los ejemplos de rótulos útiles para diagnóstico por imágenes incluye los radiorótulos tales como los rótulos fluorescentes ^{131}I, ^{111}In, ^{123}I, ^{99m}Tc, ^{32}P, ^{33}P, ^{125}I, ^{3}H, ^{14}C, y ^{188}Rh, tales como fluoresceína y rhodamina, los rótulos activos de resonancia magnética nuclear, los isótopos que emiten positrones detectables por medio de una tomografía de emisión de positrones ("PET"), quimiluminiscentes tales como la luciferina y los marcadores enzimáticos tales como la peroxidasa o la fosfatasa. Los emisores de radiación de rango corto, tales como los isótopos detectables pro medio de sondas de detectores de rango corto también pueden ser empleados. El ligando de la proteína se puede rotular con tales reactivos utilizando las técnicas conocidas. Por ejemplo, véase Wensel and Meares (1983) *Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy*, Elsevier, New York para las técnicas relacionadas con el radiorótulo de los anticuerpos y Colcher et al. (1986) *Meth. Enzymol.* 121: 802 816.

[0247] También puede utilizarse un ligando radiorotulado para las pruebas de diagnóstico in vivo. La actividad específica de un ligando rotulado isotópicamente depende de la vida media, la pureza isotópica del rótulo radioactivo y cómo se incorpora el rótulo dentro del anticuerpo.

[0248] Los procedimientos para rotular los polipéptidos con los isótopos radioactivos (tales como ^{14}C, ^{3}H, ^{35}S, ^{99m}Tc, ^{125}I, ^{32}P, ^{33}P, y ^{131}I) son generalmente conocidos. Véase, por ejemplo, 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 en la presente invención; 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).

[0249] Los anticuerpos IL-13 que se describen en la presente invención se pueden conjugar con agentes de contraste de Resonancia Magnética por Imágenes (MRI). Algunas técnicas de MRI se resumen en EP-A-0 502 814.

[0250] Las diferencias en estas constantes de tiempo de relajación se pueden mejorar por medio de agentes de contraste. Los ejemplos de tales agentes de contraste incluyen una cantidad de agentes magnéticos, agentes paramagnéticos (los cuales principalmente alteran T1) y ferromagnéticos o superparamagnéticos (los cuales principalmente alteran la respuesta T2). Los quelatos (por ejemplo, EDTA, DTPA y los quelatos NTA) se pueden utilizar para unir (y reducir la toxicidad) de algunas sustancias paramagnéticas (por ejemplo, Fe^{3+}, Mn^{2+}, Gd^{3+}). Otros agentes pueden estar en forma de partículas, por ejemplo, menos de 10 mm, alrededor de 10 mm de diámetro y tener propiedades ferromagnéticas, antiferromagnéticas y superparamagnéticas.

[0251] Los anticuerpos de IL-13 también se pueden rotular como con un grupo que indique que contienen el átomo ^{19}F atom activo NMR o una pluralidad de tales átomos según lo descripto por Pykett ((1982) *Scientific American* 246:78-88) para ubicar una imagen de distribución de IL-13.

[0252] También dentro del alcance que se describe en la presente invención están los kits que comprenden el ligando de la proteína que se une a IL-13 y las instrucciones para el uso diagnóstico, por ejemplo el uso del anticuerpo IL-13 (por ejemplo, anticuerpo o el fragmento del mismo que se une al antígeno, u otro polipéptido o péptido) para detectar IL-13, in vitro, por ejemplo, en una muestra, por ejemplo una biopsia o las células de un paciente que tenga un trastorno asociado con IL-13 o in vivo, por ejemplo, sometiendo a pruebas de diagnóstico por imágenes a un paciente. El kit además puede contener por lo menos un reactivo adicional tal como un rótulo o agente diagnóstico adicional. Para el uso in vivo, el ligando se puede formular como una composición farmacéutica

[0253] Kits

[0254] Un antagonista de la IL-13, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo, se puede proporcionar en un kit, como un componente de un kit. Por ejemplo, el kit incluye (a) un antagonista de IL-13 o un fragmento del mismo, por ejemplo, una composición que incluye un anticuerpo de IL-13 o un fragmento del mismo, y, opcionalmente (b) material informativo. El material informativo puede ser descriptivo, instructivo, de comercialización u otro material que se refiera a los métodos

que se describen en la presente invención y / o al uso de un antagonista de la IL-13, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo, para los métodos que se describen en la presente invención.

[0255] El material informativo de los kits no se limita a su forma. En una realización, el material informativo puede incluir información acerca de la producción del compuesto, el peso molecular del compuesto, la concentración, la fecha de vencimiento, la información sobre el lote o el sitio de producción y así sucesivamente. En una realización, el material informativo se refiere al uso del ligando para tratar, prevenir, diagnosticar un trastorno que se describe en la presente invención.

[0256] En una realización, el material informativo puede incluir las instrucciones necesarias para administrar un antagonista de la IL-13, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo, en una manera adecuada para realizar los métodos que se describen en la presente invención, por ejemplo, en una dosis adecuada, forma de dosificación adecuada, o modo de administración adecuado (por ejemplo, una dosis, una forma de administración o un modo de administración que se describen en la presente invención). En otra realización, el material informativo pueden incluir las instrucciones necesarias para administrar un antagonista de la IL-13, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo, un paciente adecuado, por ejemplo, un humano, por ejemplo, un humano que tenga, o esté en riesgo de padecer, asma alérgica, asma no alérgica o un trastorno mediado por la IL-13, por ejemplo, un trastorno alérgico y/o inflamatorio, o la infección HTLV-1. La producción de IL-13 se correlacionó con la infección HTLV-1 (Chung et al., (2003) *Blood* 102: 4130-36).

[0257] Por ejemplo, el material puede incluir las instrucciones necesarias para administrar un antagonista de la IL-13, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo, a un paciente, un paciente con o en riesgo de padecer asma alérgica, asma no alérgica o un trastorno mediado por la IL-13, por ejemplo, un trastorno alérgico y/o inflamatorio, o la infección HTLV-1.

[0258] El kit puede incluir uno o más recipientes para la composición que contiene un antagonista de la IL-13, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo. En otras realizaciones, el kit contiene los recipientes separados, divisores o compartimientos para la composición o el material informativo. Por ejemplo, la

composición puede estar contenida dentro de una botella, una ampolla o una jeringa y el material informativo puede estar contenido en una manga o paquete de plástico. En otras realizaciones, los elementos separados del kit están contenidos dentro de un recipiente único sin divisiones. Por ejemplo, la composición está contenida dentro de una botella, ampolla o jeringa que tiene unido a la misma el material informativo en forma de una etiqueta. En otras realizaciones, el kit incluye una pluralidad (por ejemplo, un paquete) de recipientes individuales, cada uno de los cuales contiene una o más formas de dosificación por unidad (por ejemplo, una forma de dosificación que se describe en la presente invención) de un antagonista de la IL-13, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo. Por ejemplo, el kit incluye una pluralidad de jeringas, ampollas, paquetes de foil, atomizadores o dispositivos de inhalación, cada uno de los cuales contiene una dosis de unidad única de un antagonista de la IL-13, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo, o dosis de unidades múltiples.

[0259] El kit incluye de manera opcional un dispositivo adecuado para la administración de la composición, por ejemplo, una jeringa, inhalante, pipeta, fórceps, cuchara medidora, gotero (por ejemplo, gotero para ojos), apósito (por ejemplo, un apósito de algodón o un tapón de madera), o cualquiera de tales dispositivos de liberación. En una realización preferida, el dispositivo es un dispositivo implantable que dispensa dosis reguladas del ligando.

[0260] Los Ejemplos que siguen se establecen para contribuir a la comprensión de las invenciones pero no están destinados a, y no deberían interpretarse como, limitantes de su alcance de ninguna manera.

[0261] Ejemplo 1: Generación de un anticuerpo monoclonal murino específico para la IL-13 humana.

[0262] *Ejemplo 1.1: Aislamiento de un anticuerpo monoclonal murino que se une a la IL-13 humana (mAb13.2)*

[0263] Se prepararon antisueros policlonales por medio de inmunización de hembras de ratones BALB/c con IL-13 recombinante humana (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Los sueros fueron evaluados para unirse a la IL-13 humana por medio de ELISA. Los esplenocitos de un ratón demostraron los títers con alta cantidad del anticuerpo en suero, fueron fusionados con el mieloma P3X63_AG8.653 (ATCC), y se colocaron en bandejas de medios selectivos. Las fusiones se aislaron con 3 vueltas de subclonante por medio de la limitación de la dilución y se evaluaron para la producción de anticuerpos que tienen una afinidad de unión a la IL-13 humana. Tres anticuerpos monoclonales que fueron capaces de unirse a la IL-13, interferir con la formación de un complejo funcional de señalización de la Il-13 y neutralizar y / o inhibir una o más actividades asociadas con la IL-13, el anticuerpo de mAb13.2 (IgG1 kappa) se eligieron para un estudio posterior.

[0264] *Ejemplo 1.2: Anticuerpo monoclonal murino, mAb13.2, se une a la IL-13 humana con alta afinidad y especificidad.*

[0265] Se tomaron diversas medidas para confirmar que el anticuerpo monoclonal murino aislado en el Ejemplo 1.1, es decir, mAb13.2, se une con alta afinidad y especificidad a la IL-13 humana. En primer lugar, los análisis de BIACORE™ de los tres anticuerpos monoclonales a la IL-13 humana (mAb13.2, mAb13.4, y mAb13.9) se realizaron utilizando un chip de streptavidin 69 RU en el cual se inmovilizó IL-13 inmovilizada. Los tres anticuerpos se pasaron de manera individual sobre el chip y cada uno de ellos mostró una unión rápida (**FIG. 1**). Después del intercambio de la solución amortiguadora, la disociación fue lenta (**FIG. 1**). En segundo lugar, el análisis BIACORE™ de mAb13.2 se realizó utilizando un chip de Biacore chip en el cual se inmovilizó mAb13.2. Diferentes concentraciones de la IL-13 se pasaron sobre el chip. Nuevamente, la unión rápida y la disociación lenta se demostró (**FIG. 2**). En tercer lugar, el análisis por medio de ELISA determinó que mAb13.2 se une a todas las formas de la IL-13 humana probada, que incluye la IL-13 nativa dericada de las células T de sangre de médula (**FIG. 3**). Las placas fueron revestidas con el anticuerpo anti-FLAG M2. La unión de FLAG-IL-13 humana se detectó con mAb13.2 biotilizada y streptavidin-peroxidasa. ELISA demostró que la unión entre mAb13.2 y la IL-13 se

podría completar con la IL-13 humana aislada a partir de las células mononucleares de sangre de médula, con distorsión de Th2, activada por mitógenos y la IL-13 recombinante humana (**FIG. 3**). No hubo ninguna unión detectable de mAb13.2 a la IL-13 recombinante de murino (**FIG. 3**). Para confirmar los resultados hallados por ELISA, el anticuerpo monoclonal, mAb13.2, se recubrió sobre un chip Biacore, y las soluciones que contenían IL-13 recombinante humana o una forma polimórfica de IL-13 (variante de ARG), que se expresa en una alta frecuencia en los pacientes que sufren de asma (Heinzmann et al. (2000) *Hum. Mol. Genet.* 9:594), fueron pasadas sobre el chip. Ambas formas mostraron una unión rápida y una disociación no detectable a partir del anticuerpo (**FIG. 4A**). Finalmente, durante un estudio preliminar de reactividad cruzada realizado bajo condiciones de GLP (buenas prácticas de laboratorio), mAb13.2 no demostraron ninguna reacción cruzada significativa cuando se evaluaron contra un panel de 37 tejidos humanos normales obtenidos en una autopsia o biopsia, es decir, un tejido que incluye a todos los tejidos en la "lista sugerida de tejidos humanos que se deben utilizar para las investigaciones inmunohistoquímicas de reacción cruzada" en el Anexo II de los Lineamientos DC CPMP III/5271/94 Borrador 5, "Production and quality control of monoclonal antibodies" y todos los tejidos que se recomiendan en la Tabla 2 de 1997 US FDA/CBER "Points to Consider in the Manufacture and Testing del anticuerpo monoclonal Products for Human Use".

[0266] *Ejemplo 1.3: El anticuerpo monoclonal mAb13.2 de murino neutraliza las actividades asociadas con la IL-13 in vitro*

[0267] La capacidad de mAb13.2 para neutralizar una o más actividades asociadas asociadas con la IL-13 *in vitro* se confirmó utilizando el bioensayo TF1, los monocitos de sangre humana periférica y las células B de sangre humana periférica. En condiciones adecuadas, la proliferación de la línea celular humana TF1 de eritroleucemia se puede hacer dependiente de IL-13. Primero se determinó si la proliferación de la línea celular TF1 dependiente de la citoquina inducida con concentraciones subóptimas de cualquiera de las IL-13 recombinantes humanas o la

forma de variante de ARG de IL-13 humana podrían ser inhibidas por medio de mAb13.2. La **FIG. 4B** demuestra que la mAB13.2 inhibió las capacidades de ambas IL-13 humana recombinante y la forma de variante de ARG para estimular la proliferación de TF1. En segundo lugar, la línea celular se recogió para IL-13, luego se expuso a una concentración subóptima de IL-13 humana recombinante hasta inducir la proliferación en presencia de ya sea mAb13.2 purificada de ratón o IL-13 soluble del receptor (rhuIL-13RI2). Las células fueron incubadas durante 3 días y la incorporación de ^{3}H- después de las 4 horas finales se determinó por medio del recuento del líquido de centelleo. A concentraciones subóptimas de IL-13, mAb13.2 provocó una inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de TF1 (**FIG. 5**). La IC_{50} para este efecto, 250 pM, es altamente comparable con la de rhuIL-13RI2 soluble (**FIG. 5**). Los anticuerpos ejemplares tienen un IC_{50} para este efecto entre 50 -500 pM, o 120-300 pM, o 240-350 pM.

[0268] Dado que los monocitos de sangre periférica humana responden en una manera dependiente de la dosis a IL-13 o IL-4 mediante el incremento de la expresión de la superficie celular del receptor de IgE de baja afinidad (CD23) (**FIG. 6A**), los monocitos humanos fueron utilizados para confirmar la capacidad de mAb13.2 para neutralizar esta actividad asociada con la IL-13. Para determinar si mAb13.2 podría neutralizar la expresión de la superficie celular de CD23 mediada por la IL-13 por los monocitos, las células mononucleares de sangre periférica fueron aisladas de un donante sano e incubadas con mayores cantidades de IL-13 solamente, mayores cantidades de IL-4 solamente, 1 ng/ml IL-13 y mayores cantidades de mAb13.2, ó 0.3 ng/ml IL-4 y mayores cantidades de mAb13.2. Al día siguiente, se recogieron las células y se mancharon con CYCHROME^{3}-rotulado anti-CD11b (marcador de monocito) y PE-lrotulado anti-CD23. Gated $CD11b^{+}$ monocitos fueron sometidos a ensayo para la expresión de CD23 por medio de citometría de flujo. Según se esperaba, mAb13.2 inhibió la expresión CD23 mediada por la IL-13 (**FIG. 6B**) pero no inhibió la expresión de CD23 inducida por IL-4 (**FIG. 6C**).

[0269] Los efectos de mAb13.2 también se probaron en un modelo de producción de IgE mediada por IL-13- por células B de sangre periférica humana. En respuesta a IL-13

y el mitógeno de célula T, PHA, las células B se someten a una recombinación de cambio de isotipo Ig a IgE, dando como resultado mayores niveles de IgE en el cultivo. Este efecto se puede observar como un aumento de la frecuencia de las células B que producen IgE. PBMC de un donante sano fueron cultivados en cavidades de microtíters en presencia de PBMC irradiados autólogos como alimentadores y estimulados con PHA y IL-13. Después de 3 semanas, cada cavidad se sometió a ensayo para las concentraciones de IgE por medio de ELISA. PHA + IL-13 aumentaron la frecuencia de los clones de células B que producen IgE (**FIG. 7**). Este efecto fue inhibido por medio de mAb13.2, pero no por medio de un anticuerpo no neutralizador específico de IL-13 (mAb13.8) o por medio de IgG de ratón de control (msIgG) (**FIG. 7**), demostrando que mAb13.2 bloqueó de manera eficiente el cambio de isotipo IgE mediado por IL-13 por medio de las células B cultivadas.

[0270] Finalmente, la capacidad de mAb13.2 para bloquear una respuesta celular temprana a IL-13 se sometió a prueba mediante del examen de sus efectos sobre el transductor y activador de transcripción (STAT) 6 fosforilación. Después de la interacción de IL-13 con el receptor de su superficie celular, STAT6 dimeriza, se vuelve fosforilado y se transloca a partir del citoplasma al núcleo, donde activa la transcripción de los genes sensibles a la citoquina (Murata et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270:30829-36). Los anticuerpos específicos para STAT6 pueden detectar esta activación por medio del análisis de mancha de Western y / o el análisis citométrico de flujo dentro de los 30 minutos de exposición a IL-13.

[0271] La línea celular epitelial humana HT-29 se utilizó para someter a ensayo la fosforilación de STAT6. Las células HT-29 se incubaron en mayores concentraciones de IL-13 durante 30 minutos a 37 °C. El análisis de mancha de Western de los lisatos celulares demostró la fosforilación dependiente de la dosis de STAT6 mediada por IL-13 (**FIG. 8A**). De una manera similar, el análisis citométrico de flujo demostró STAT6 fosforilada en las células HT-29 que fueron tratadas con una concentración saturadora de IL-13 durante 30 minutos a 37 °C, fija, permeabilizada y manchada con un mAb ALEXA^3 rotulada con Fluor 488 hasta fosfo -STAT6 (**FIG. 8B**). Las células tratadas se mancharon con un anticuerpo de control de isotipo no demostraron fluorescencia. Finalmente, cuando las células se trataron con una concentración subóptima de IL-13 sola, IL-13 y mAb13.8, IL-13 y mAB13.2, o IL-13 y un anticuerpo msIgG1 de control,

el análisis citométrico de flujo demostró la abrogación completa de la fosforilación de STAT6 sólo cuando las células fueron tratadas en presencia de mAb13.2, es decir, teniendo en cuenta que mAb13.2 bloqueó la fosforilación de STAT6, un anticuerpo no neutralizador específico de IL-13 (mAb13.8) y un IgG1 de ratón de control no tuvo efecto (**FIG. 8C**). Estos estudios demostraron que mAb13.2 inhibió la fosforilación de STAT6 mediada por IL-13.

[0272] *Ejemplo 1.4: El anticuerpo monoclonal murino mAb13.2 neutraliza las actividades asociadas con la IL-13 in vivo*

[0273] La eficacia de mAb13.2 de ratón para neutralizar una o más actividades asociadas con la IL-13 *in vivo* se sometió a prueba utilizando un modelo de inflamación de las vías aéreas inducida por antígeno en monos cynomolgus naturalmente alérgicos a *Ascaris suum*. En este modelo, la prueba de un mono alérgico con antígeno de *Ascaris suum* da como resultado un influjo de las células inflamatorias, especialmente los eosinófilos en las vías aéreas. Para probar la capacidad de mAb13.2 para prevenir este influjo de células, el anticuerpo se administró 24 horas antes de la prueba con el antígeno de *Ascaris suum*. El día de la prueba, se obtuvo una muestra del lavado broncoalveolar (BAL) del pulmón izquierdo en el nivel basal. Luego el antígeno se instiló en forma endotraqueal en el pulmón derecho. Veinticuatro horas más tarde, el pulmón derecho se sometió a un lavado, y el líquido de BAL se animales tratados por vía endovenosa con 8 mg/kg mAb13.2 purificados con ascitis se comparó con el líquido BAL de los animales que no recibieron tratamiento. Los recuentos de eosinófilos aumentaron en 4 de 5 animales no tratados después de la prueba, según se comparó con 1 de 6 animales tratados con mAb13.2 **(FIG. 9)**. El porcentajes dc eosinófilos de BAL aumentó de manera significativa para el grupo que no recibió tratamiento ($p < 0.02$), pero no para el grupo tratado con el anticuerpo. Estos resultados confirman que mAb13.2 efectivamente evita la eosinofilia en las vías aéreas en los animales alérgicos sometidos a prueba con un alergeno.

[0274] La vida medio promedio del suero de mAb13.2 de ratón fue menor da una semana en los monos. En el punto de tiempo de 3 meses, cuando todas las huellas de mAb13.2 hubieran ido al suero, los animales tratados con mAb13.2 volvieron a someterse a una prueba con *Ascaris suum* para confirmar la hipersensibilidad de *Ascaris* de tales individuos. Se halló que dos de seis monos en el grupo tratado eran no respondedores.

[0275] *Ejemplo 1.5: El anticuerpo monoclonal de murinos mAb13.2 se une a una region de IL-13 que normalmente se une a IL-4RI*

[0276] Las actividades asociadas con la IL-13 presumiblemente están mediadas por un complejo receptor que consiste en las cadenas de IL-13RI1 y IL-4RI. La citoquina primero se somete a una interacción de afinidad relativamente baja con IL-13RI1 en la superficie de las células. El complejo IL-13/IL-13RI1 luego recluta IL-4RI para formar un receptor IL-13 completo, el cual se une a su ligando (IL-13) con alta afinidad (Zurawski et al. (1993) *EMBO J.* 12:2663; Zurawski et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270:23869). La unión de IL-13 con el receptor de alta afinidad luego envía corriente abajo las señales a través de la cadena IL-4RI que involucra al transductor de señal quinasa de Janus y la vía del activador de la transcripción (JAK-STAT), por ejemplo, por medio de la fosforilación de STAT6, la cual se puede monitorear como una de las respuestas celulares más tempranas a IL-13 (Murata et al., *supra*). Diversos enfoques, tales como el mapeo de epitopos, la cristalografía por rayos x y el análisis adicional de BIACORE se utilizaron para elucidar la interacción entre el anticuerpo murino mAb13.2 y la IL-13 humana y para luego examinar la base subyacente a la capacidad de mAb13.2 para modular una o más actividades asociadas con la IL-13.

[0277] La interacción entre mAb13.2 y la IL-13 se estudió por medio de cristalografía de rayos x. La IgG total de ascitis se aisló sobre una columna de proteína A y se digirió con papaína para generar fragmentos de mAb13.2 Fab, los cuales luego fueron altamente purificados. Los fragmentos Fab en sí mismos fueron cristalizados, y los análisis estructurales se obtuvieron a una resolución de 2.8 Å utilizando radiación de

sincotrones. De manera adicional, los fragmentos de mAb13.2 Fab fueron cocristalizados con IL-13 humana, y esta estructura de cristal se resolvió a una resolución de 1.8 Å. Los principales sitios de contacto entre mAb13.2 y la IL-13 fueron identificados como agrupados principalmente en los bucles de la CDR del anticuerpo y la región terminal C de la hélice C de IL-13 (**FIG. 10**). De acuerdo con la secuencia de numeración que se muestra en la FIG. **11** para la proteína madura de IL-13, es decir, la proteína de IL-13 a partir de la cual el péptido señal ha sido dividido, los principales residuos de IL-13 que entran en contacto con mAb13.2 son GLU49, ASN53, GLY69, PRO72, HIS73, LYS74, y ARG86 de la SEQ ID NO:32.

[0278] La capacidad de los fragmentos Fab de mAb13.2 para unirse a la IL-13 humana se confirmó por medio de ELISA. La unión de FLAG-IL-13 humana a las placas de ELISA que estuvieron recubiertas durante toda la noche con el anticuerpo anti-FLAG M2 se detectó utilizando mAb13.2 biotinilada. mAb13.2 no rotulada, los fragmentos Fab aislados de mAb13.2 o el anticuerpo irrelevante se itnrodujeron para completar con mAb13.2 biotnilada unida a FLAG-IL-13 humana. Los datos demuestran que los fragmentos Fab de mAb13.2 y de mAb13.2 sin rotular fueron capaces de completarse con mAb13.2 biotinilada para unirse a la FLAG-IL-13 humana (**FIG. 12**). De una manera adicional, a pesar de que parecía que se requería una concentración mayor de fragmentos Fab para lograr un grado similar de competición como mAb13.2 sin rotular (**FIG. 12A**), esta discrepancia se resolvió cuando la competencia se analizó como una función de la concentración de los sitios de unión, por ejemplo, suponiendo un sitio de unión po cada fragmento Fab aislado y dos sitios de unión por cada mAb13.2 sin rotular (**FIG. 12B**). En contraste con los fragmentos Fab sin rotular mAb13.2 y mAb13.2, el anticuerpo irrelevante no fue capaz de competir con mAb13.2 biotinilada para unirse a la FLAG-IL-13 humana (**FIG. 12**).

[0279] La capacidad de los fragmentos Fab de mAb13.2 para neutralizar una o más actividades asociadas con la IL-13 *in vitro* se confirmó por medio de la determinación de la proliferación de las células TF1 y la expresión de CD23 por medio de los monocitos de sangre periférica humana, tal como se describió con anterioridad, en ausencia o presencia de los fragmentos Fab de mAb13.2. La **FIG. 13A** demuestra que los fragmentos Fab de mAb13.2, de manera similar a mAb13.2, inhibieron la capacidad

de la IL-13 recombinante para estimular la proliferación de TF1 en un sitio de unión de modo dependiente de la concentración. De una manera adicional, los fragmentos Fab de mAb13.2, de manera similar a mAb13.2, inhibieron La expresión de CD23 mediada por la IL-13 en un sitio de unión que depende del modo de concentración (**FIG. 13B**).

[0280] Los análisis de cristalografía por rayos x, mapeo de epitopos, ELISA, proliferación de TF1 y la expresión de CD23 que se describieron con anterioridad indicaron que mAb13.2 se une a la región terminal C de la helice de IL-13, es decir, la región de unión a la IL-4R. Para confirmar este análisis, la interacción entre mAb13.2 y IL-13 se analizó con un chip de BIACORE™. Este análisis se realizó en diversos formatos. En primer lugar, IL-4R se unió al chip de BIACORE™, y un complejo de IL-13 previamente unido a IL-13RI1 se dejó fluir sobre el chip. En ausencia de mAb13.2, se demostró la formación de un complejo trimolecular. Sin embargo, la adición de mAb13.2 a la mezcla de IL-13 previamente unida a IL-13RI1 impidió la unión a IL-4R en el chip. En segundo lugar, mAb13.2 se inmovilizó en el chip y la IL-13 unida se agregó en la fase de solución. A pesar de que se detectó IL-13RI1 para interactuar con la IL-13 unida, no se detectó ninguna interacción de la IL-4R con la IL-13 unida. En tercer lugar, se demostró que mAb13.2 podría unirse a la IL-13 que se unió a la IL-13RI1-Fc o bien al monómero de IL-13RI1 inmovilizado en el chip. Estas observaciones soportan la hipótesis de que mAb13.2 no inhibe la interacción de IL-13 con IL-13RI1 pero quiebra la interacción de la IL-13RI1 con la IL-4RI. Se piensa que este quiebre interfiere con la formación de un complejo funcional de señalización de la Il-13. Estas observaciones proporcionan un modelo teórico para la actividad neutralizadora de este anticuerpo.

[0281] La demostración *in vitro* de un complejo de mAb13.2 con la IL-13 y la IL-13RI1 sugiere que mAb13.2 se podría unir de manera potencial a la IL-13 asociada al receptor en la superficice celular. A fin de determinar si mAb13.2 unida a la célula podría detectarse en condiciones de saturación de IL-13 unida al receptor, la línea celular epitelial humana HT-29 se trató con varias concentraciones de IL-13 a 4 °C seguido del agregado del anticuerpo monoclonal mAb13.2, mAb13.8 o la IgG1 del ratón de control. Se detectó la unión mediante el análisis citométrico de flujo utilizando IgG1 de anti-ratón biotinilado y PE-streptavidin. A pesar de que las células de HT-29 expresan IL-13RI1, la unión de mAb13.2 a la IL-13 unida a la superficie celular no se detectó a

concentraciones de mAb13.2 de hasta 2 mg/ml. Esta observación, junto con la demostración de que mAb13.2 es un potente neutralizador de una o más actividades asociadas con IL-13, indica que el funcionamiento normal del complejo de señalización IL-13, es decir el receptor de IL-13, se quiebra por medio de mAb13.2.

[0282] Los hallazgos que se describieron con anterioridad confirman que el anticuerpo monoclonal de murinos mAb13.2, se une con una alta afinidad y especificidad a IL-13, y exhibe una actividad potente de neutralización, es decir, mAb13.2 bloquea de manera eficiente cada actividad asociada con IL-13 que fue aprobada. Estas observaciones se correlacionaron con el hallazgo de que mAb13.2 puede interactuar con el sitio de unión de IL-4RI y no con el sitio de unión de IL-13RI1 de la IL-13 humana.

[0283] Ejemplo 2: Generación del anticuerpo mAb13.2 quimérico (ch13.2)

[0284] *Ejemplo 2.1: Aislación de un anticuerpo mAb13.2 quimérico (ch13.2)*

[0285] Los genes variables pesados (VH) y variables livianos (VL) que codifican mAb13.2 fueron clonados y sometidos a secuencia del ARNm aislados a partir del hibridoma que produce el anticuerpo. La secuencia VH se subclonó en el vector de expresión pED6 huIgG1_mut, el cual codifica la IgG1 que contiene dos puntos de mutación (L234A y G237A) hasta reducir la unión a los recpetores Fc humanos y complementar los componentes (SEQ ID NO:17; Morgan et al. (1995) *Immunology* 86:319-24; Shields et al (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-604). La secuencia VL de mAb13.2 se subclonó en el vector de expresión Kappa pED6. Los vectores de expresión que contienen las secuencias mAb13.2 VH y VL fueron cotransfectadas dentro de las células COS-1 y el anticuerpo quimérico mAb13.2 se purificó a partir del medio acondicionado (ch13.2).

[0286] *Ejemplo 2.2: El anticuerpo mAb13.2 (ch13.2) quimérico neutraliza las actividades asociadas con la IL-13 in vitro*

[0287] El anticuerpo quimérico, ch13.2, se sometió a prueba para la unión a IL-13. El anticuerpo monoclonal mAb13.2, la forma quimérica de mAb13.2 (ch13.2), y un

anticuerpo de control (13.8) fueron sometidos a prueba para evaluar sus capacidades de competir con mAb13.2 biotinilado de ratón para unirse a la IL-13 FLAG-humana inmovilizada sobre una placa ELISA con un anticuerpo anti-FLAG. El anticuerpo quiméroco, ch13.2, fue capaz de unirse de manera competitiva a IL-13 en forma similar a mAb13.2 (**FIG. 14A**). En otra prueba, los monocitos de sangre periférica humana fueron tratados durante toda la noche con IL-13 para inducir la expresión de CD23 en presencia de varias concentraciones de mAb13.2 o ch13.2 de ratón. Como se muestra en la **FIG. 14B,** ch13.2 impidió la expresión de CD23 mediada por la IL-13 por parte de lso monocitos en el mismo grado que mAb13.2.

[0288] Ejemplo 3: Generación de los anticuerpos mAb13.2 parcial y completamente humanizados (h13.2v1 y h13.2v2)

[0289] *Ejemplo 3.1: Aislamiento de un anticuerpo mAb13.2 parcialmente humanizado (h13.2v1)*

[0290] La humanización de mAb13.2 se basó sobre la homología de la secuencia de aminoácidos, el análisis del CDR, la frecuencia de uso entre los anticuerpos humanos expresados y la información disponible sobre las estructuras de cristal de los anticuerpos humanos. La humanización se basó sobre los genes de la línea germinal humanos DP-54 variables pesados (VH) y DPK-9 variables livianos (VL) (que se muestran por ejemplo en las **Figuras 16 y 17**, respectivamente). Teniendo en cuenta los posibles efectos sobre la unión del anticuerpo, el apareamiento VH-VL y otros factores, los residuos murinos fueron mutados a residuos humanos donde los residuos del marco de trabajo murinos y humanos eran diferentes, con unas pocas excepciones. Una comparación de la secuencia de aminoácidos de la cadena ch13.2 VH con la secuencia de aminoácidos prevista del gen de la línea germinal humana DP-54 y la secuencia de aminoácidos de la cadena VH h13.2v1 parcialmente humanizada se muestra en la **FIG. 15**. Una comparación de la secuencia de aminoácidos de la cadena VL ch13.2 con la secuencia de aminoácidos prevista de DPK-9 humana y la cadena VL h13.2v1

resultante parcialmente humanizada se muestran en la **FIG. 16**. Como se puede ver en las **Figuras 16 y 17**, las cadenas h13.2v1 VH y VL conservaron las regiones que determinan la complementariedad (CDR), o las regiones de unión al antígeno de las cadenas VH y VL de ch13.2 respectivamente. De una manera adicional, sólo un residuo del marco de trabajo VH y dos en el marco de trabajo de VL se conservaron murinos para reducir el riesgo de cambiar de manera drástica la región de unión al antígeno y el aparcamiento VH-VL (**Figuras 16 y 17**).

[0291] La humanización parcial de mAb13.2 se logró mutando la secuencia de nucleótidos que codifica mAb13.2 (murinos) de manera tal que los aminoácidos corresponden a los genes de la línea germinal humana serían sustituidos en las posiciones del marco de trabajo indicadas. Para cada cambio de aminoácidos que debe introducirse, se previeron sustituciones adecuadas de nucleótidos, con codones optimizados para la expresión en las células CHO. La humanización de VH se hizo por medio de un proceso de mutagénesis de PCR en cuyas mutaciones que incorporan cegadores de oligonucleótidos para uno o dos aminoácidos a la vez utilizados para ampliar la secuencia genética del patrón murino. Diversas vueltas de mutagénesis de PCR se requirieron para lograr la humanización parcial. La humanización de VL se realizó por parte de PCR utilizando un panel de nueve oligonucleótidos superpuestos correspondientes a la secuencia de VL de murinos con las sustituciones adecuadas de nucleótidos. La regiones superpuestas sirvieron como patrónes y PCR se utilizó para llenar los espacios vacíos cebadores en las cepas de sentido y antisentido. El anticuerpo resultante parcialmente humanizado se denominó h13.2v1. Las secuencias de nucleótidos que codifican VL y VH de h13.2v1 se designan en la SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:7, respectivamente.

[0292] *Ejemplo 3.2: Aislamiento de mAb13.2 completamente humanizada (h13.2v2)*

[0293] Como se indica en la **FIG. 15 y la FIG. 16**, h13.2v1 conservó 3 residuos murinos en las regions del marco de trabajo: uno en la cadena VH y dos en la cadena VL. El trabajo y el análisis preliminares de la estructura de cocristal de mAb13.2 Fab con IL-13 humana confirmaron que los 3 residuos podrían ser mutados a humanos.

Estos fueron los residuos #3 en la cadena VH (K en el ratón, Q en humanos), el residuo #4 en la cadena VL (L en ratones, M en humanos) y el residuo #72 en lacadena VL (#68 en la línea germinal; R en ratones, G en humanos). Por lo tanto, para producir una versión completamente humanizada de mAb13.2, h13.2v2, se utilizó la mutagénesis PCR para introducir las mutaciones K3Q en la cadena VH de h13.2v1, y L4M y R72G en la cadena VL de h13.2v1. Las secuencias finales VH y VL h13.2v2 se muestran en la **FIG. 17 y la FIG. 18**, respectivamente. La secuencia de nucleótidos que codifican VL y VH de h13.2v2 se designan SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:8, respectivamente.

[0294] De acuerdo con la secuencia que se muestra en la **FIG. 29** (utilizando el esquema de numeración lineal), se determinó que los principales residuos de la cadena pesada de mAb13.2 que hacen contacto con las uniones de hidrógeno con IL-13 son SER50 (CDR2), SER53 (CDR2), TYR101 (CDR3), y TYR102 (CDR3). De una manera adicional, los residuos principales de la cadena pesada de mAb13.2 que hacen contactos Van der Waals con IL-13 son ILE30 (CDR1), SER31 (CDR1), ALA33 (CDR1), TRP47, SER50 (CDR2), SER52 (CDR2), SER53 (CDR2), TYR58 (CDR2), LEU98 (CDR3), ASP99 (CDR3), GLY100 (CDR3), TYR101 (CDR3), TYR102 (CDR3), y PHE103 (CDR3) (sobre la base de la **FIG. 29** utilizando el esquema de numeración lineal).

[0295] De acuerdo con la secuencia que se muestra en la **FIG. 30** (utilizando el esquema de numeración lineal), se determinó que los residuos principales de la cadena liviana de mAb13.2 que hacen contactos de uniones de hidrógeno con IL-13 son ASN31 (CDR1), TYR32 (CDR1), LYS34 (CDR1), ASN96 (CDR3), y ASP98 (CDR3). Los residuos principales de la cadena liviana mAb13.2 que hacen contactos Van der Waals con IL-13 son ASN31 (CDR1), TYR32 (CDR1), LYS34 (CDR1), ARG54 (CDR2), ASN96 (CDR3), ASP98 (CDR3), y TRP100 (CDR3) (Sobre la base de la **FIG. 30** que utiliza el esquema de numeración lineal).

[0296] *Ejemplo 3.3: MAb13.2 completamente humanizada (h13.2v2) conserva toda la actividad aglutinante a IL-13*

[0297] La capacidad de mAb13.2 completamente humanizada (h13.2v2)para competir con mAb13.2 biotinilado para unirse a IL-13-FLAGse determinó por ELISA como se describió en el Ejemplo 2. Los datos demostraron que las versions quiméricas (ch13.2), paracialmente humanizadas (h13.2v1) y completamente humanizadas de mAb13.2 fueron capaces de competir con mAb13.2 biotinilada para unirse a FLAG-IL-13 en grados similares (**FIG. 19A**). El análisis BIACORE también confirmó que IL-13 tenía unión rápida y disociación lenta a h13.2v2 inmovilizada (**FIG. 19B**).

[0298] *Ejemplo 3.4: MAb13.2 completamente humanizada (h13.2v2) neutraliza las actividades in vitro asociadas con IL-13*

[0299] De una manera adicional, la capacidad de las versiones quiméricas (ch13.2) parcialmente humanizada (h13.2v1) y completamente humanizada de (h13.2v2) del mAb13.2 para inhibir la expresión de CD23 la superficie celular mediada por IL-13-por medio de monocitos humanos y reducir la fosforilación STAT6 inducida por IL-13 en las células HT-29 se determinó por medio del análisis citométrico de flujo, tal como se describió en el Ejemplo 1.3. En síntesis, los monocitos de sangre periférica humana se incubaron durante toda la noche con una concentración subóptima de IL-13 humana recombinante en presencia de mayores concentraciones de ch13.2, h13.2v1 o h13.2v2. Los monocitos fueron encerrados y sometidos a ensayo para detectar la expresión de CD23 como una indicación de la hipersensibilidad a IL-13. El análisis citométrico de flujo demostró que las 3 versiones de mAb13.2, es decir, ch13.2, h13.2v1, y 13.2v2, fueron capaces de mitigar la expresión de CD23 mediada por la IL-13 por medio de monocitos de un modo dependiente de la dosis (**FIG. 20A**).

[0300] Para probar la fosforilación de STAT6, la línea celular epiterial humana HT-29 se incubó durante 30 minutos a 37°C con una dosis subóptima de IL-13 humana recombinante y mayores concentraciones de ch13.2, h13.2v1, o h13.2v2, Luego se

sometieron a ensayos para detectar la expresión de STAT6 fosforilado utilizando el anticuerpo monoclonal rotulado con Fluor 488 Alexa^3 hasta STAT6 fosforilado. El análisis citométrico de flujo demostró que las 3 versiones de mAb13.2, es decir, ch13.2, h13.2v1, y h13.2v2, fueron capaces de mitigar la fosforilación de STAT6 mediada por la IL-13 (**FIG. 20B**).

[0301] Dado que h13.2v2 fue capaz de inhibir las actividades in vitro asociadas con la IL-13 humana nativa y asociadas con la IL-13 recombinante (**FIG. 21**), se sometió a prueba para detectar su habilidad para inhibir los trastornos asociados con IL-13 en modelos animales. En la preparación para probar mAb13.2 completamente humanizada, h13.2v2, en modelos no humanos de primates (NHP) y ovejas de enfermedad respiratoria, se sometió a ensayo la capacidad del anticuerpo para neutralizar la IL-13 recombinantes de monos o de ovejas. Se clonó la IL-13 de monos cynomolgus o de ovejas. Se expresó la NHP IL-13 en *E. coli*, se purificó y replegó como para la IL-13 humana. En contraste, la IL-13 recombinante de ovejas se expresó en las células de Ovarios de Hamsters Chinos (CHO). La capacidad de mAb13.2 o h13.2v2 para inhibir una o mas actividades asociadas con la forma recombinante de NHP de monos cynomolgus de IL-13 o de la forma recombinante de oveja de IL-13 se sometió a pruebas *in vitro*. La **FIG. 22** demuestra que la h13.2v2 neutraliza con firmeza la capacidad de NHP IL-13 en los monos cynomolgus para inducir la expresión de CD23 en la superficie celular por medio de los monocitos. Sin embargo, h13.2v2 sólo neutralizó en forma escasa la IL-13 en ovejas, dado que la neutralización de la actividad asociada con la IL-13 en ovejas requirió concentraciones mucho mayores de anticuerpos **(FIG. 22)**.

[0302] *Ejemplo 3.5: MAb13.2 completamente humanizada (h13.2v2) neutraliza las actividades de IL-13 en un modelo de asma de ovejas*

[0303] A pesar de su potencia relativamente baja para neutralizar la bioactividad de la forma de oveja de IL-13, h13.2v2 se sometió a prueba para detectar la eficacia en un modelo de oveja de hipersensibilidad de las vías aéreas inducidas por *Ascaris*-induced airway hyperreactivity. Las ovejas fueron sensibilizadas con el parásito de ascáride, *Ascaris suum*, por medio de la exposición natural. Cuando se los sometió una prueba de

pulmón con el antígeno de *Ascaris*, los animales padecieron broncoconstricción similar a la respuesta de los humanos asmáticos ante la prueba de antígenos. La respuesta consiste en una reacción inmediata seguida por una respuesta en la fase tardía, que comenzó 4-5 horas después de la prueba. Se pensó que la fase temprana es una respuesta del músculo liso, mientras que la fase tardía es una reacción inflamatoria.

[0304] Para probar la capacidad de h13.2v2 para reducir la broncoconstricción inducida por *Ascaris*, a las ovejas se les administró 20 mg/kg, 5 mg/kg, o 2 mg/kg de anticuerpos por vía de infusión endovenosa (i.v.). Veinticuatro horas después de la infusión, los animales recibieron una prueba endotraqueal con antígeno de *Ascaris suum*. Los resultados indicaron que h13.2v2 a 20 mg/kg o 5 mg/kg atenuaron la respuesta de la fase tardía al antígeno **(FIG. 23)**. h13.2v2 a 2 mg/kg no tuvo ningún efectos significativo sobre la respuesta al antígeno en comparación con el control, presumiblemente debido a la escasa actividad de neutralización de h13.2v2 en la IL-13 de ovejas.

[0305] De manera adicional, se probó la capacidad de h13.2v2 para reducir la hipersensibilidad de las vías aéreas inducida por la prueba de las vías aéreas con el agonista colinérgico, carbacol, en ovejas. Carbacol elicita la broncoconstricción, medida como una disminución del volumen expiratorio forzado (FEV) y la dosis del estímulo requerido para elicitar una determinada magnitud de respuesta (PC400) es típicamente menor para los asmáticos que para los pacientes sanos. Las ovejas permanecieron sin recibir tratamiento o recibieron 20 mg/kg, 5 mg/kg, o 2 mg/kg de h13.2v2 por vía endovenosa 24 horas antes de la prueba de inhalación con carbacol y PC400 se determinó en la prueba previa y posterior de ovejas con *Ascaris suum*. Los datos demuestran que h13.2v2 a 20 mg/kg o 5 mg/kg evitaron la caída de PC400 inducida por la prueba con *Ascaris suum* **(FIG. 24)**. De manera similar a los resultados del experimento de respuesta al antígeno, h13.2v2 a 2 mg/kg no tuvo ningún efecto significativo sobre PC400 en comparación con el control.

[0306] *Ejemplo 3.6: MAb13.2 completamente humanizada (h13.2v2) neutraliza las actividades de IL-13 en un modelo primate no humano de asma*

[0307] Para probar la capacidad de h13.2v2 para evitar la inflamación pulmonary inducida por A*scaris* en primates no humanos, se trataron monos cynomolgus de control con solución salina, 8 mg/kg de IgG humano irrelevante (IVIG), o 2 mg/kg de dexametasona por vía intramuscular (como un control positivo). A los monos cynomolgus de prueba se les administró por vía endovenosa 10 mg/kg de h13.2v2. Al día siguiente, las muestras BAL previas a la prueba se obtuvieron del pulmón derecho y se sometió a prueba a los animales con el antígeno *Ascaris suum* por vía endotraqueal en el pulmón derecho. Veinticuatro horas después de la prueba, se recolectaron las muestras de BAL del pulmón derecho y se sometieron a ensayo para infiltrado celular. Los resultados mostraron que el pretratamiento de animales con h13.2v2 evitaron la inflamación de las vías aéreas inducidas por el alergéno *Ascaris suum* **(FIG. 25)**. En un experimento paralelo, IL-5 y eotaxina fueron inducidas en el BAL siguiente a la prueba de Ascaris. El pretratamiento de los animales con h13.2v2 redujo el nivel de inducción de IL-5 y eotaxina.

[0308] Los primates no humanos sensibilizados con *Ascaris suum* desarrollaron IgE al antígeno de Ascaris. Este IgE se une a FcεRI en los basófilos circulantes, de manera tal que la prueba *in vitro* de basófilos de sangre periférica con el antígeno *Ascaris* indujo la desgranulación y la liberación de histamina. La reiterada exposición del antígeno reforzó la sensibilización del basófilo dando como resultado mejores respuestas de liberación de histamina. Para probar los efectos de h13.2v2 en este proceso, a los monos cynomolgus dosificados con h13.2v2 o solución salina o controles IVIG de la manera como se describió se les extrajo sangre 8 semanas después de la prueba con *Ascaris,* y los niveles de IgE específico de *Ascaris*y totales en plasma se determinaron por medio de ELISA. Los niveles de IgE específico de *Ascaris* se incrementaron 8 semanas después de la prueba en los animales de control tratados con solución salina o IVIG **(FIG. 31B)**. En contraste, los animals tratados con h13.2v2 mostraron una reducción significativa en los niveles de IgE circulante específico para *Ascaris* **(FIG. 31A)**. No hubo ningún cambio significativo en el títer total de IgE para cualquiera de los grupos de tratamiento.

[0309] Para evaluar los efectos sobre la liberación de histamina en basófilos, a los animales se les extrajo sangre a las 24 horas, 8 semanas y 4 meses después de la prueba de *Ascaris*. Se probó la sangre completa con el antígeno de *Ascaris* durante 30 minutos a 37 °C, y la histamina liberada en el sobrenadante se cuantificó por medio de ELISA (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Tal como se muestra en la **FIG. 32A**, estos animales sensibilizados demostraron algún nivel de liberación de histamina en basófilos inducida por *Ascaris* aún antes de la prueba de segmento de antígenos. Después de la prueba, los animales de control mostraron el aumento esperado en la sensibilidad del basófilo. En contraste, los animales tratados con h13.2v2 no pudieron someterese a este aumento de sensibilización del basófilo, de manera tal que 2-4 meses después de la prueba, registraron una respuesta a *Ascaris* de liberación de histamina in vitro significativamente menor **(FIG. 32B)**. Por lo tanto, una administración única de h13.2v2 tuvo una actividad modificadora de la enfermedad a largo plazo en este modelo.

[0310] *Ejemplo 4: Humanización de mAb13.2 basada sobre varios genes de línea germinal humana*

[0311] El Ejemplo 3 proporcionó un método y resultado para la humanización de mAb13.2 sobre la base de los genes de la línea germinal DP-54 y DPK9;en este Ejemplo, la humanización de mAb13.2 basada sobre otros genes de la línea germinal se detalla en forma sintética.

[0312] Se diseñaron estrategias adicionales de humanización sobre la base de un análisis de las secuencias del anticuerpo de la línea germinal humana o de un subgrupo de las mismas que poseía un alto grado de homología, es decir, la semejanza de la secuencia, con la secuencia real de aminoácidos de las regiones variables del anticuerpo de murino. Por ejemplo, el grupo VH 3 de BASE V mostró un alto grado de semejanza de la secuencia con mAb13.2. Se determinó que las CDR de la región variable de cadena pesada se podría transferir a cualquiera de un subgrupo de genes de línea germinal dentro del grupo VH 3, es decir 3-53 (DP-42), 3-48 (DP-51), 3-09 (DP-31), 3-13 (DP-48), 3-15 (DP-38), 3-20 (DP-32), 3-21 (DP-77), 3-23 (DP-47), 3-30 y 3-30.5 (DP-49), 3-64 (DP-45), 3-66 (DP-86), y 3-73 (YAC-9) **(FIG. 26)**. También se muestra en la figura 26 la secuencia para DP-61, la cual también se puede utilizar para humanizar

mAb13.2. Se determinó que las sustituciones de aminoácidos comunes siguientes se podrían introducir en mAb13.2 para convertir su marco de tiempo VH en cualquiera de los marcos de tiempo de las líneas germinales humanas propuestas: K3Q, K13Q or K13R, K19R, T40A, E42G, R44G, R75K, I77S o I77T, S83N, S87A o S87D, M92V o M92L, y T113L. Las sustituciones individuales de aminoácidos para la humanización sobre la base de un gen particular de línea germinal también fueron delineadas, por ejemplo la humanización basada en DP-47 puede involucrar las mutaciones adicionales de V5L, A49S, y A74S; la humanización basada sobre DP-42 puede involucrar las mutaciones adicionales de V12I, A49S, y A74S; la humanización basada sobre DP-51 puede involucrar la mutación adicional de A49S; la humanización basada sobre DP-48 puede involucrar las mutaciones adicionales de P41T, D72E, y E88G; la humanización basada sobre DP-53 puede involucrar las mutaciones adicionales de E46V y A49S; la humanización basada sobre DP-32 puede involucrar las mutaciones adicionales de L11V, A49S, y Y94H; la humanización basada sobre DP-38 puede involucrar las mutaciones adicionales de A49G, A74D, R75S, N76K, R86K, y S87T; la humanización basada sobre DP-31 puede involucrar las mutaciones adicionales de G16R, A49S, y R97K; la humanización basada sobre DP-61 puede involucrar las mutaciones adicionales de W47Y, A49S, A74S, y T90M; y la humanización basada sobre DP-45 puede involucrar las mutaciones adicionales de E6Q, A24G, A49S, y T90M. Por ejemplo, cuando la humanización de mAb13.2 se basa sobre el gen DP-47 de la línea germinal humana, el cual tiene una identidad de secuencia del 79%, las siguientes mutaciones, K3Q, V5L, K13Q, K19R, T40A, E42G, R44G, A49S, A74S, R75K, I77T, S83N, S87A, M92V, y T113L, se pueden introducir en mAb13.2. La introducción de las sustituciones comunes de aminoácidos solas, o en combinación con las sustituciones individuales de aminoácidos basadas sobre un gen particular de la línea germinal humana, en mAb13.2 durante la humanización debe dar como resultado un anticuerpo activo. Por ejemplo, un anticuerpo activo, h13.2v3, resultó cuando la humanización de mAb13.2 se basó en 3-21 (DP-77), tal como se describe a continuación.

[0313] Una humanización alternativa de mAb13.2 se basó sobre los genes de la línea germinal DP-77 y B1. La alineación entre la secuencia de aminoácidos prevista de DP-77, la secuencia variable de aminoácidos de cadena pesada de ch13.2, y la secuencia de aminoácidos de cadena pesada del anticuerpo mAb13.2 completamente humanizado (h13.2v3) se muestra en la **FIG. 27**. La alineación entre la secuencia prevista de

aminoácidos de B1, la secuencia variable de aminoácidos de cadena liviana de ch13.2, y la secuencia variable de aminoácidos de cadena liviana de h13.2v3 se muestran en la **FIG. 28.** Las secuencias previstas de aminoácidos de DP-77 y B1 demostraron una identidad de aminoácidos del 80.4% con la cadena pesada variable de mAb13.2 y la identidad de aminoácidos del 77.5% con la cadena liviana variable de mAb13.2, respectivamente. Si bien las diferencias de aminoácidos entre DP-77 y la cadena pesada de mAb13.2 (y la cadena pesada de ch13.2, del mismo modo), y entre B1 y la cadena liviana de mAb13.2 (y la cadena liviana de ch13.2, de igual modo), se hallaron en varios de trabajo y regiones de determinación de la complementariedad, las diferencias en los CDR permanecieron sin modificar. Por el contrario, donde un aminoácido se halló en la región del marco de trabajo de la cadena pesada mAb13.2 difirió del aminoácido en la misma posición en DP-77, el aminoácido de la región pesada variable de mAb13.2 se cambió al aminoácido en DP-77. De una manera similar, donde un aminoácido se encontró en la región del marco de trabajo de la cadena liviana de mAb13.2 difirió del aminoácido en la misma posición en B1, el aminoácido en la cadena liviana variable de mAb13.2 se cambió por el aminoácido en B1. Dos vueltas de mutagénesis de PCR, como se describió con anterioridad, introdujeron los cambios.Después de la primera vuelta de cambios en las cadenas pesadas y livianas, se realizó ELISA como se describió en el Ejemplo 2, tpara asegurar que los cambios no afectaron la capacidad del anticuerpo para unirse a la IL-13. Después de la segunda vuelta de cambios, las secuencias de aminoácidos de las regiones del marco de trabajo dentro de las cadenas pesada y liviana del mAb13.2 fueron idénticas a las secuencias de aminoácidos de las regiones del marco de trabajo de DP-77 y B1, respectivamente.

[0314] El anticuerpo mAb13.2 humanizado, h13.2v3también fue capaz de inhibir las actividades in vitro asociadas con IL-13. h13.2v3 se probó ELISA y el ensayo de proliferación TF1para determinar su capacidad de para determinar su capacidad de para unir e inhibir una o más actividades asociadas a la IL-13. Se demostró que h13.2v3 podría competir de manera similar con mAb13.2 para unirse a la IL-13 cuando se comparó con ch13.2 y h13.2v1 . De manera adicional, h13.2v3 fue capaz de inhibir la proliferación de TF1 hasta el mismo grado que mAb13.2 y h13.2v1 .

[0315] Ejemplo 5: Actividad del efector mediada por el Fc de tipo silvestre reversor de h13.2v2

[0316] La forma de señalización celular y el receptor de IL-13 que incluye los polipéptidos IL-13R□1 y IL-4R□ se encuentra en la superficie de los tipos celulares que responden a la citoquina. IL-13R□2no se expresa típicamente en la superficie de las células sensibles a la IL-13 pero se informó en tumores de cerebro, cabeza y cuello (Kawakami et al. (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:6381-8; Mintz et al. (2002) *Neoplasia* 4:388-99; Liu et al. (2000) *Cancer Immunol. Immunother.* 49:319-24). La expresión de IL-13Rα2 también se puede inducir en los monocitos humanos primarios tratados con IFNγ (Daines et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:10387-93), o TNF□- o los fibroblastos humanos primarios (Yoshikawa et al. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312:1248-55). Este receptor no es competente para mediar las respuestas de señalización con IL-13 (Kawakami et al. (2001) *Blood* 97:2673-9), sino que en su lugar parece actuar como un receptor decoy, que compite por las interacciones productivas de IL-13 con IL-13Rα1 (Feng et al. (1998) *Lab. Invest.* 78:591-602). IL-13R□2 tiene una alta afinidad por IL-13 (Andrews et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:46073-8), y parece interactuar principalmente con la región terminal C de la citoquina (Madhankumar et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:43194-205), la cual no está prevista para incluir al sitio de unión h13.2v2. Por lo tanto, se examinó si h13.2v2 podía interactuar con IL-13 capturada por IL-13R□2 sobre la superficie celular. A375 es una línea celular de melanoma humano que expresa IL-13Rα2. IL-13 recombinante humano (3 ng/ml) se contactó con estas células a 4 °C durante 20 minutos. Las células se lavaron y se probaron para la unión de h13.2v2 biotinilado. Los resultados mostraron una unión dependiente de la dosis del anticuerpo en estas células en presencia de IL-13, iindicando que h13.2v2 se une a IL-13 que se unió a su receptor **(FIG. 33)**.

[0317] A fin de determinar si h13.2v2 podría promocionar la función efectora dependiente de Fc, los residuos mutados de Fc de h13.2v2 (L234A / G237A; residuos 116 y 119 de la SEQ ID NO:17) se revirtieron hasta el tipo silvestre y los anticuerpos que expresan Fc de tipo silvestre o mutado se expresaron y se purificaron. La función

efectora se probó en un ensayo de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) utilizando células A375 cargadas con IL-13 como blancos. Las células blanco A375 fueron rotuladas con cromo 51 y se incubaron con 10 ng/nl de IL-13 recombinante humana. PBMC humana enriquecida para las células exterminadoras naturales (NK) por medio del tratamiento con ROSETTESEP® Human NK Enrichment Cocktail (StemCell Technologies, Seattle, WA) se utilizaron como efectores. El efector y las células blanco se incubaron juntas en presencia de cantidades mayores de h13.2v2 o su Fc reversor de tipo silvestre durante 5 horas a 37 °C. Se midió la citotoxicidad como la liberación de cromo 51 en el sobrenadante y se expresó como un porcentaje de la liberación máxima, determinado por la lisis de las células blanco A375 con TRITON® X-100.

[0318] Los resultados mostraron que el Fc reversor de tipo silvestrefue capaz de mediar ADCC de las células blanco A375 cargadas de IL-13, teniendo en cuenta que h13.2v2 no estaba **(FIG. 34A)**. No se observó ninguna cicotoxicidad en ausencia de IL-13 **(FIG. 34B)**. Se observaron resultados similares utilizando las células del efector de 3 donantes diferentes. Estos resultados indican que, debido a la presencia de las mutaciones L234A y G237A Fc, h13.2v2 no es capaz de mediar ADCC, aún bajo condiciones óptimas in vitro.

[0319] Tomadas juntas, estas observaciones indican que h13.2v2 se puede unir a las células que expresan IL-13R□2 **(FIG. 33)**, pero no a las que expresan IL-13R□1. Los experimentos se realizaron para probar si el h13.2v2 reversor de tipo silvestre podia mediar ADCC en las células HT-29 que expresan la IL-13 y IL-13Rα1, aún en ausencia de la unión detectable. Las células HT-29 fueron utilizadas como blancos en un ensayo de ADCC realizado de la manera como se describió con anterioridad. Los resultados mostraron que en condiciones que conducen a la citolisis de las células A375 que expresan IL-13Rα2, las células HT-29 que expresan IL-13Rα1 no fueron sometidas a lisis **(FIG. 35)**. Estos resultados también demuestran que, mientras que los anticuerpos que incluyen las mutaciones L234A y G237A Fc no inducen ADCC, los anticuerpos con la función del efector Fc de tipo silvestre pueden ser útiles para el tratamiento de ciertos cánceres que expresan IL-13RI2.

[0320] Ejemplo 6: Expresión de un anticuerpo 13.2 humanizado en células COS

[0321] Con el fin de evaluar la expresión de anticuerpos de anti-IL13 humanizados en el sistema mamífero recombinado, las regiones variables de ratón 13.2 (SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:13), hu13.2 V1 (SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:15), y hu13.2 V2 (SEQ ID NO:12 y SEQ ID NO:16) se subclonaron en una expresión vectorial pED6 que contenía regiones humanas constantes kappa y IgG1mut. Se cultivaron células COS-1 de riñón de mono en un medio DME (Gibco) que contenía 10% de suero bovino fetal inactivado por calor, 1 mF de glutamina y 0.1 mg/ml de Penicilina/Estreptomicina. Se realizó la transfección de células COS utilizando un reactivo de transfección TRANSITIT®-LT1 (Mirus Bio Corp., Madison, WI) de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. Las células COS transfectadas se incubaron por 24 horas a 37 °C en la presencia de un 10% de CO2, se lavaron con PBS estéril y se cultivaron en un medio R1CD1 (Gibco) sin suero por 48 horas para permitir la secreción del anticuerpo y su acumulación en el medio condicionado. La expresión del anticuerpo 13.2 se calificó por la cantidad total de IgG ELISA humano utilizando como norma IgG1/kappa humano purificado. El anticuerpo quimérico 13.2 así como ambas versiones humanizadas se expresaron bien en las células COS.

Tabla 5. Expresión transitoria de anticuerpos 13.2 humanizados en células COS

N	Constructo	Expresión μg /ml, 48 hours
1	13.2 Quimérico	14.5
2	13.2(V1) parcialmente humanizado	13.2
3	13.2.2 (V2) totalmente humanizado	14.9

REIVINDICACIONES:

1. Un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno, que se une a la IL-13 con un K_D de menos de 10^{-7} M y que tiene una o más de las propiedades siguientes:

(a) la región variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprende una CDR3 de cadena pesada de mAb13.2 (SEQ ID NO:24), o una CDR3 de cadena pesada que difiere por menos de 3 sustituciones de aminoácidos de una CDR3 correspondiente de mAb13.2;

(b) la región variable de inmunoglobulina de cadena liviana comprende una CDR1 de cadena liviana de mAb13.2 (SEQ ID NO:19), o una CDR1 de cadena liviana que difiere por menos de 3 sustituciones de aminoácidos de una CDR1 de cadena liviana correspondiente de mAb13.2;

(c) la región variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprende una secuencia codificada por un ácido nucleico que hibridiza bajo condiciones muy rigurosas hasta el complemento de un ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena pesada de h13.2 (SEQ ID NO:15, 16, ó 36);

(d) la región variable de inmunoglobulina de cadena liviana comprende una secuencia codificada por un ácido nucleico que hibridiza bajo condiciones muy rigurosas hasta el complemento de un ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena liviana de h13.2 (SEQ ID NO:11, 12, o 35);

(e) la región variable de inmunoglobulina de cadena pesada es por lo menos 90% idéntica a un dominio variable de cadena pesada de h13.2 (SEQ ID NO:15,16, ó 36);

(f) la región variable de inmunoglobulina de cadena liviana es por lo menos 90% idéntica a un dominio variable de cadena liviana de h13.2 (SEQ ID NO:11, 12, ó 35);

(g) el anticuerpo, o un fragmento del mismo de unión al antígeno, compite con mAb13.2 para unirse a la IL-13 humana;

(h) el anticuerpo, o un fragmento del mismo de unión al antígeno, entra en contacto con uno o más residuos de aminoácido de IL-13 seleccionados a partir del grupo que consiste en 68, 72, 88, 91, 92, 93, y 105 de la SEQ ID NO:31;

(i) la región variable de cadena pesada tiene la misma estructura canónica que mAb13.2;

(j) la región variable de cadena liviana tiene la misma estructura canónica que mAb13.2;

(k) la región variable de cadena pesada y/o la región variable de cadena liviana tiene regiones marco de FR1, FR2, y FR3 de segmentos de VH codificados por la línea germinal de genes de DP-54 y DPK-9 respectivamente o una secuencia al menos 95% idéntica a segmentos de VH codificados por la línea germinal de genes DP-54 y DPK-9;

(l) confiere un efecto protector posterior a la inyección contra la exposición al antígeno de Áscaris en un modelo de oveja por lo menos 6 semanas después de la inyección.

(2) El anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno, de la reivindicación 1, que es purificado.

(3) El anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno, de la reivindicación 1, que es un IgG recombinante, de longitud completa.

(4) El anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno, de la reivindicación 1, que es un Fab o un scFv.

5. El anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno, de la reivindicación 1, que comprende las regiones del marco de trabajo que son por lo menos 90% idénticas a las regiones de marco de trabajo de líneas germinales humanas.

6. El anticuerpo de la reivindicación 1 o un fragmento del mismo de unión al antígeno, que comprende las regiones humanas del marco de trabajo, una región humana Fc, o ambas.

7. El anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno, de la reivindicación 1, donde región variable de cadena pesada tiene la misma estructura canónica que mAb13.2 (como en (i)), y el dominio variable de cadena pesada comprende por lo menos cuatro IL-13 residuos de contacto de aminoácidos de mAb13.

8. El anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno, de la reivindicación 1, que se une a la IL-13 humana con un K_D de entre 90 y 120 pM.

9. El anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno, de la reivindicación 1, que se une a la IL-13 humana con un k_{off} de menos de $1x10^{-4}$ s^{-1}.

10. El anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno, de la reivindicación 1, que se une a la IL-13 humana con un k_{on} de entre $5x10^4$ y $8x10^5$ $M^{-1}s^{-1}$.

11. El anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno, de la reivindicación 1, que reduce la capacidad de IL-13 para unirse a la IL-4RI.

12. El anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno, de la reivindicación 1, que se une a la IL-13 que está en un complejo in vitro con la IL-13RI1.

13. Un anticuerpo aislado, recombinante de IgG que comprende dos cadenas de inmunoglobulina: una cadena liviana que incluye las SEQ ID NO:9, 10, 11, 12, ó 35 y una cadena pesada que incluye las SEQ ID NO:13, 14, 15, 16, ó 36.

14. El anticuerpo IgG recombinante, aislado de la reivindicación 13 donde la cadena pesada además incluye la SEQ ID NO:17 y la cadena liviana además incluye la SEQ ID NO:18.

15. Un anticuerpo, o un fragmento del mismo que se une al antígeno, que tiene una o más de las propiedades siguientes:

(a) se une de manera específica a un epitopo que comprende los residuos 81-93 ó 114-132 de IL-13 humana (SEQ ID NO:31), o una forma de la misma sustituida de manera conservadora;

(b) se une de manera específica a un epitopo de IL-13 humana que comprende uno o más de los residuos de los aminoácidos siguientes: Glutamato en la posición 49, Aspargina en la posición 53, Glicina en la posición 69, Prolina en la posición 72, Histidina en la posición 73, Lisina en la posición 74, y Arginina en la posición 86 de la SEQ ID NO:32, o una sustitución conservadora de aminoácidos de la misma;

(c) se une a un complejo de IL-13 e IL13RI1;

(d) interfiere con una interacción de la unión entre IL-13 y IL-4RI;

(e) interfiere con una interacción de unión entre IL-13/IL-13RI1 y IL-4RI; y

(f) se une de manera específica a la IL-13 humana e inhibe de manera competitiva la unión de un segundo anticuerpo a dicho humano, donde el mencionado segundo anticuerpo es elegido a partir de mAb13.2, ch13.2, h13.2v1, h13.2v2, o h13.2v3.

16. El anticuerpo, o el fragmento del mismo que se une al antígeno, de la reivindicación 15, que tiene una región constante mutada hasta reducir uno o más de: la unión del receptor de Fc, la glicosilación del anticuerpo, la cantidad de residuos de cisteína, la función celular efectora o la función de complemento.

17. El anticuerpo, o el fragmento del mismo que se une al antígeno, de la reivindicación 15, que además comprende una región humana IgG1 constante mutada en uno o más residuos 116 y 119 de la SEQ ID NO:17.

18. El anticuerpo, o el fragmento del mismo que se une al antígeno, de la reivindicación 15, que además comprende una cadena liviana humana kappa.

19. El anticuerpo, o el fragmento del mismo que se une al antígeno, de la reivindicación 15, que además comprende por lo menos una región de determinación de la complementariedad que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionados a partir del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:19, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:20, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:21, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:22, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:23, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:24.

20. El anticuerpo, o el fragmento del mismo que se une al antígeno, de la reivindicación 15, donde el fragmento es un scFv, Fab, o un fragmento $F(ab')_2$.

21. El anticuerpo, o el fragmento del mismo que se une al antígeno, de la reivindicación 15, que además comprende una cadena liviana que comprende una región constante kappa humana o un fragmento activo de la misma, y una cadena pesada que comprende una región constante de IgG humano o un fragmento activo del mismo.

22. El anticuerpo, o el fragmento del mismo que se une al antígeno, de la reivindicación 21, donde la región constante humana kappa de dicha cadena liviana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:18, o un fragmento activo del mismo.

23. El anticuerpo, o el fragmento del mismo que se une al antígeno, de la reivindicación 21, donde la región constante de IgG humano de dicha cadena pesada es mutado para reducir FcR y complementar la unión.

24. El anticuerpo, o el fragmento del mismo que se une al antígeno, de la reivindicación 23, donde la región constante del IgG humano mutado de dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:17, o un fragmento activo de la misma.

(25) Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o el fragmento del mismo que se une al antígeno, de la reivindicación 1 ó 15 y y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

(26) La composición farmacéutica de la reivindicación 25 que se adapta para la administración subcutánea, inhalatoria o tópica.

27. Un ácido nucleico que comprende una secuencia que

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

(a) comprende una CDR3 pesada de mAb13.2 (SEQ ID NO:24), o una CDR3 que difiere por menos de 3 sustituciones de aminoácidos de una CDR3 correspondiente de mAb13.2; o

(b) es por lo menos 90% idéntica a un dominio variable de cadena pesada de h13.2 (SEQ ID NO: 15, 16, ó 36); ó

(ii) hibridiza bajo condiciones muy rigurosas al complemento de un ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena pesada de h13.2 (SEQ ID NO: 15, 16, ó 36).

28. Un ácido nucleico que comprende una secuencia que

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

(a) comprende a una CDR3 de cadena liviana de mAb13.2 (SEQ ID NO: 19), o una CDR1 que difiere por menos en 3 sustituciones de aminoácidos de una CDR1 correspondiente de mAb13.2; ó

(b) es por lo menos 90% idéntica a un dominio variable de cadena liviana de h13.2 (SEQ ID NO: 11, 12, ó 35); ó

(ii) hibridiza bajo condiciones muy rigurosas al complemento de un ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena pesada de h13.2 (SEQ ID NO: 11, 12, ó 35).

29. Una célula huésped que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo, o un fragmento del mismo de unión al antígeno, de la reivindicación 1 ó 15.

30. Un método para proporcionar un anticuerpo recombinante, el método comprende:

proporcionar a una célula huésped una secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo, o un fragmento del mismo de unión al antígeno, y

mantener la célula bajo condiciones en las cuales se expresan el anticuerpo, o un fragmento del mismo de unión al antígeno

31. El método de la reivindicación 30, que además comprende el aislamiento de la proteína de la célula huésped o del medio en el cual se mantiene la célula huésped.

32. El método de la reivindicación 31, que además comprende la formulación de la proteína aislada como una composición farmacéutica.

(33) Un método para tratar un trastorno asociado con la IL-13, el método comprende:

administrar a un sujeto que tenga o esté en riesgo de contraer el trastorno, una cantidad efectiva del anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno, de la reivindicación 1.

(34) El método de la reivindicación 33, donde los trastornos asociados a la IL-13 se seleccionan a partir del grupo que consiste en los trastornos asmáticos, los trastornos atópicos, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), condiciones que implican la inflamación de las vías aéreas, eosinofilia, fibrosis y la producción excesiva de mucocidad, condiciones inflamatorias, condiciones autoinmunes, tumores o cánceres, infección viral, y supresión de la expresión de las respuestas inmunes protectoras tipo 1.

(35) El método de la reivindicación 33, donde el trastorno es un trastorno asmático o rinitis alérgica.

(36) El método de la reivindicación 33, donde el trastorno es la enfermedad intestinal inflamatoria.

37. El método de la reivindicación 33, donde el trastorno es enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD).

38. El método de la reivindicación 33, donde el trastorno es un trastorno atópico.

39. El método de la reivindicación 33, donde la proteína se administra vía subcutánea, por inhalación o por vía tópica.

40. Un método para tratar un trastorno asociado con la IL-13, que comprende la administración a un sujeto de un anticuerpo que se une a la IL-13, donde el anticuerpo tiene una o más de las siguientes propiedades:

(i) confiere un efecto protector post-inyección contra la exposición a un antígeno Áscaris en un modelo de oveja por al menos 6 semanas tras la inyección, o

(ii) previene la unión de IL-13 a IL-4Rα, pero no previene la unión de IL-13 a IL-13RI1.

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

(i) poner en contacto a la muestra con un anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo; y

(ii) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo y la muestra, donde la formación del complejo en la muestra es indicadora de la presencia de IL-13 en la muestra.

42. El método de la reivindicación 41, donde la muestra es de un sujeto.

43. Un método para tratar a un sujeto que presenta un síntoma de asma seleccionado a partir del grupo que consiste en respiración dificultosa, falta de aliento, broncoconstricción, hipersensibilidad de las vías aéreas, disminución de la capacidad pulmonar, fibrosis, inflamación de las vías aéreas, y producción de moco, dicho método comprende el paso de administrar al paciente un anticuerpo de acuerdo con la

RESUMEN

Esta solicitud se relaciona con anticuerpos, por ej., anticuerpos humanizados, y los fragmentos del mismo que se unen al antígeno, que se unen a interleuquina-13 (IL-13), en particular, IL-13 humana, y sus usos en la regulación de las respuestas inmunes mediadas por IL-13. Los anticuerpos revelados en la presente son útiles en el diagnóstico, prevención y/o tratamiento de un sujeto, por ej., un paciente humano, uno o más trastornos asociados con la IL-13, por ejemplo, trastornos respiratorios (por ej., asma); desórdenes atópicos (por ej., rinitis alérgica), condiciones inflamatorias y/o autoinmunes de la piel (por ej., desmatitis atópica, y órganos gastrointestinales (por ej., enfermedades intestinales inflamatorias (IBD)), así como trastornos fibróticos y cancerígenos.

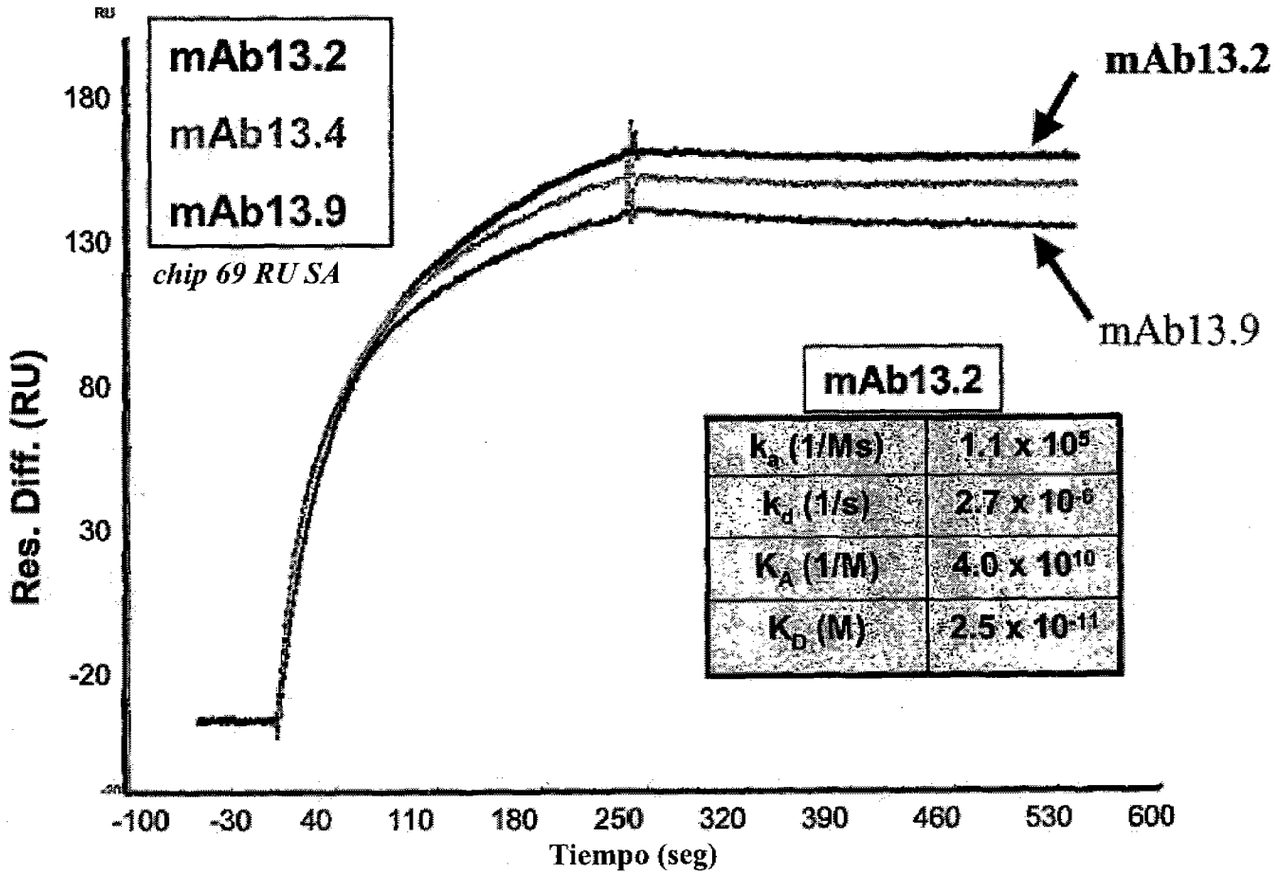
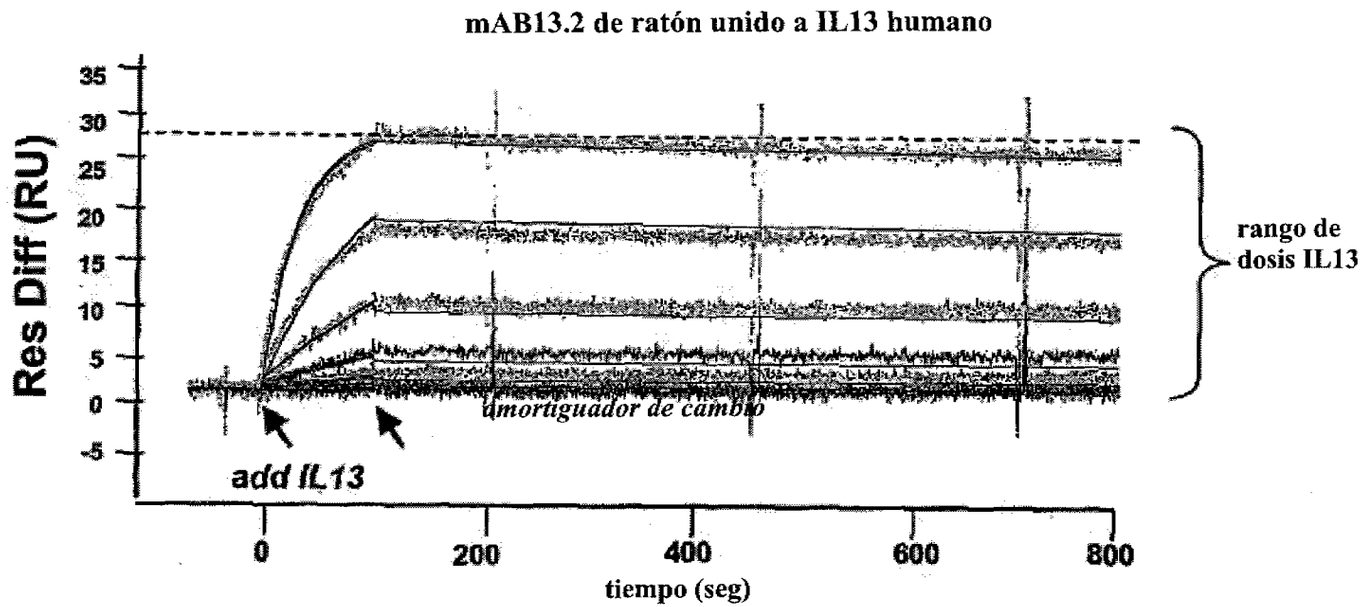

RU
180
130
80
30
-20
Res. Diff. (RU)
mAb13.2
mAb13.4
mAb13.9
chip 69 RU SA
mAb13.2
mAb13.9
mAb13.2
k_a (1/Ms) 1.1 x 10^5
k_d (1/s) 2.7 x 10^{-6}
K_A (1/M) 4.0 x 10^{10}
K_D (M) 2.5 x 10^{-11}
-100 -30 40 110 180 250 320 390 460 530 600
Tiempo (seg)

Figura 1



K_A (1/M)	K_D (M)
2.1×10^9	4.7×10^{-10}

Figura 2

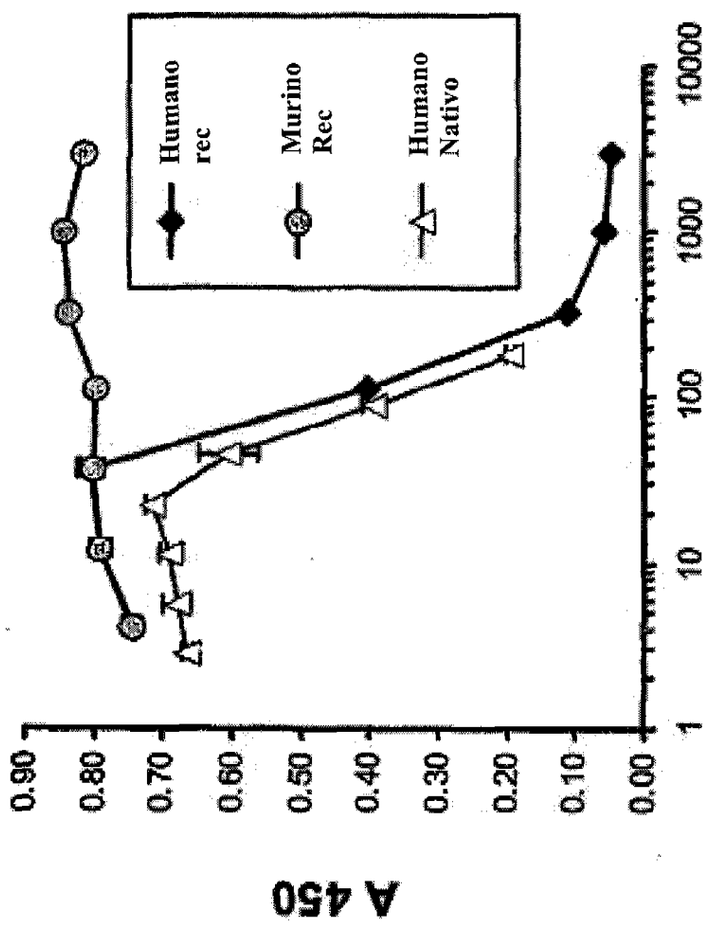

Humano rec
Murino Rec
Humano Nativo
A 450
0.90
0.80
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
1
10
100
1000
10000
IL13 (ng/ml)

Figura 3

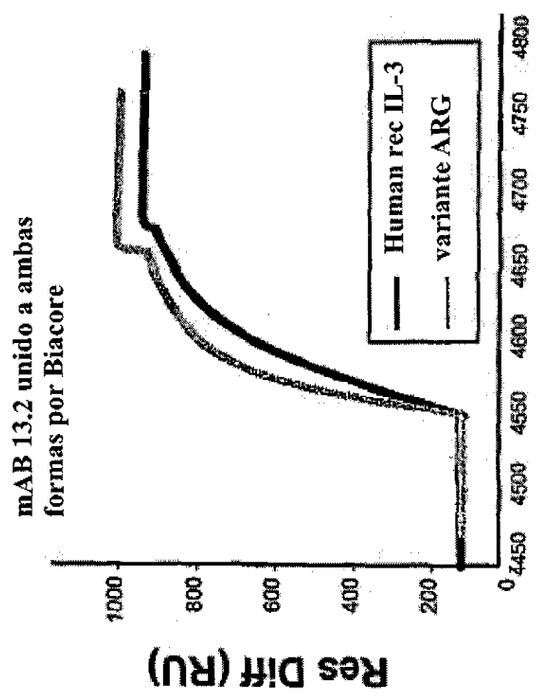


Figura 4A

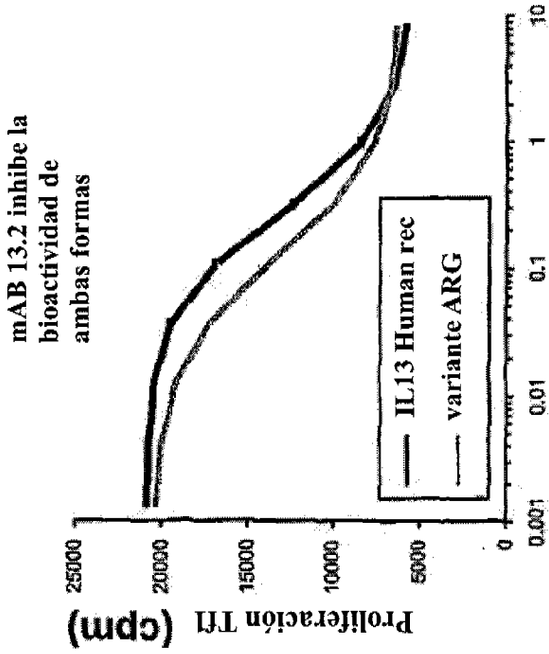


Figura 4B

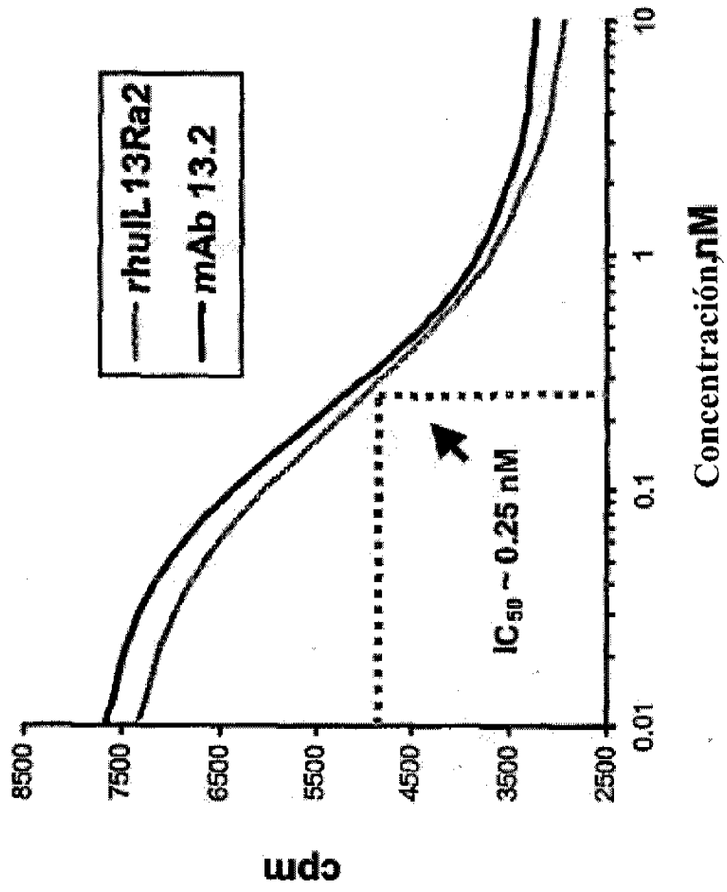

rhuIL13Ra2
mAb 13.2
IC50 ~ 0.25 nM
cpm
8500
7500
6500
5500
4500
3500
2500
0.01
0.1
1
10
Concentración, nM

Figura 5

% CD23+ monocitos
A
Citoquina (ng/ml)
0.001
0.01
0.1
1
10
IL13
IL4
B
IL13
mAb13.2 (nM)
solo
0.02
0.06
0.2
0.6
2
6
no IL13
C
IL4
mAb13.2 (nM)
solo
0.02
0.06
0.2
0.6
2
6
no IL4

Figura 6

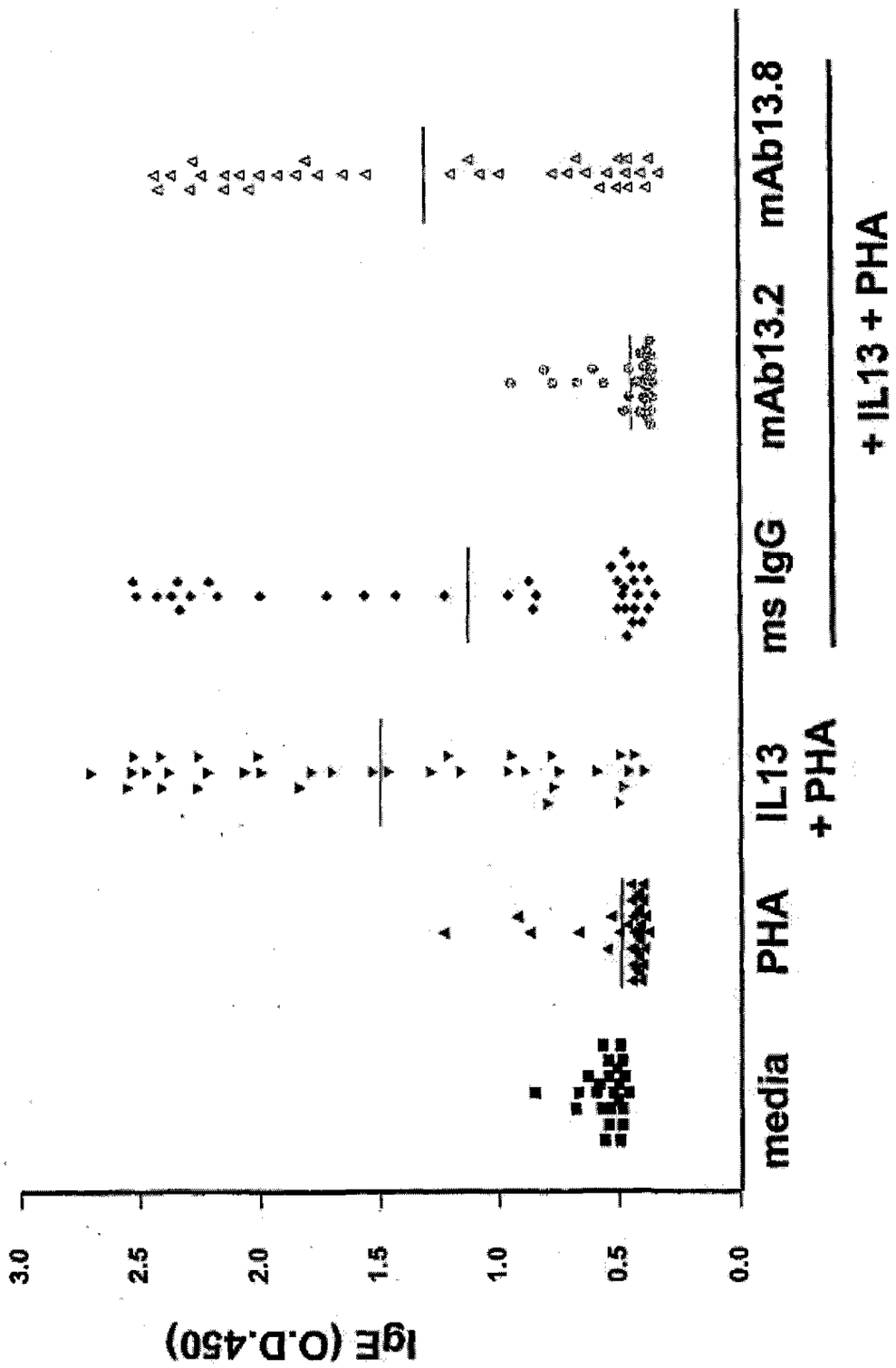

IgE (O.D.450)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
media
PHA
IL13 + PHA
ms IgG
mAb13.2
mAb13.8
+ IL13 + PHA

Figura 7

A
ng/ml
IL-13
100
40
16
6.4
2.5
1
0.4
0.16
0
B
Conteos
120
fosfo-STAT6
C
HT-29, IL13
HT-29, IL13 + mAb13.2
HT-29, IL13 + mAb13.8
HT-29, IL13 + msG1
Conteos
0 80 160 240 320 400
FL1-H
fosfo-STAT6

Figura 8

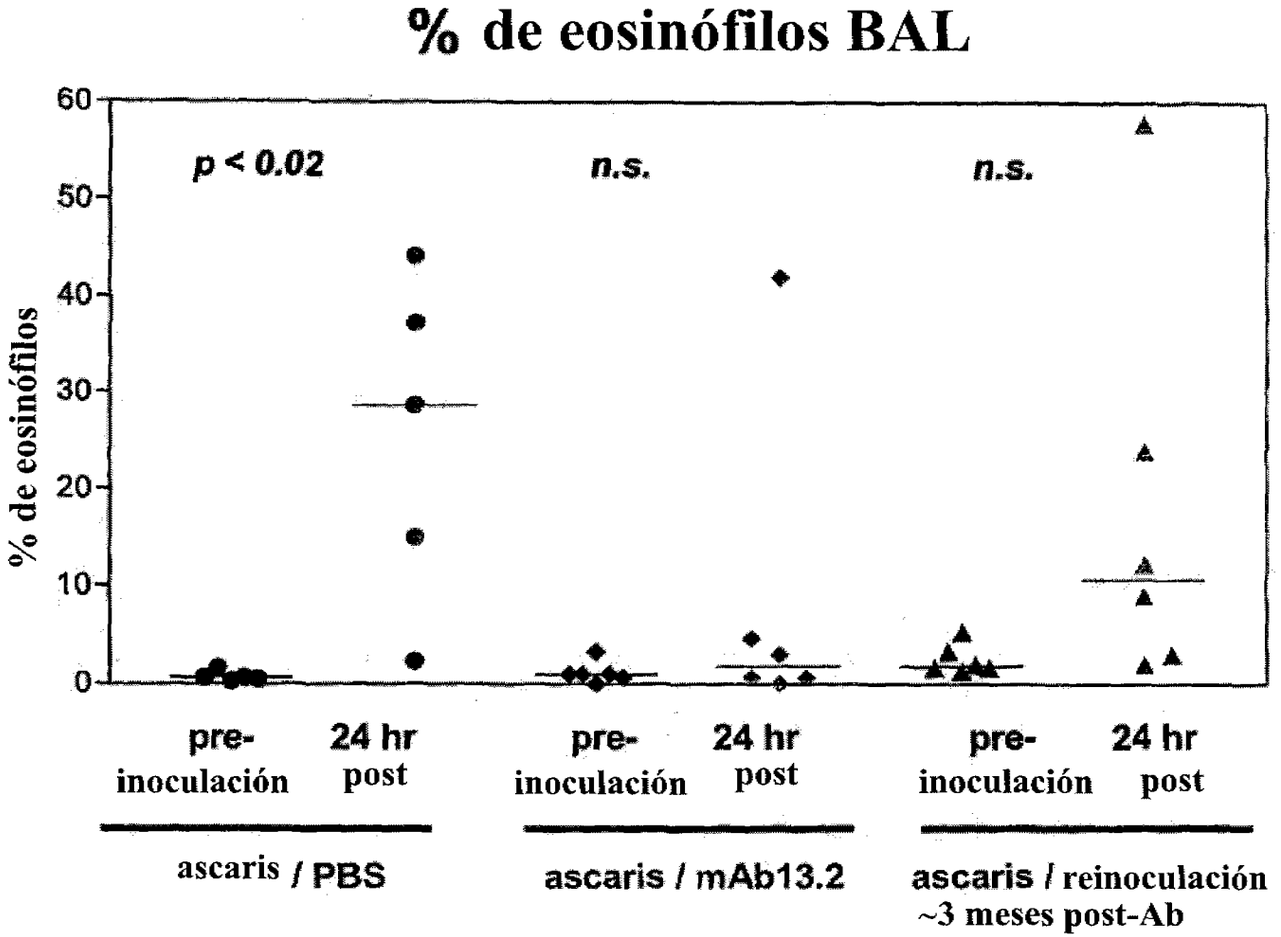

% de eosinófilos BAL
% de eosinófilos
60
50
40
30
20
10
0
p < 0.02
n.s.
n.s.
pre-inoculación
24 hr post
pre-inoculación
24 hr post
pre-inoculación
24 hr post
ascaris / PBS
ascaris / mAb13.2
ascaris / reinoculación ~3 meses post-Ab

Figura 9

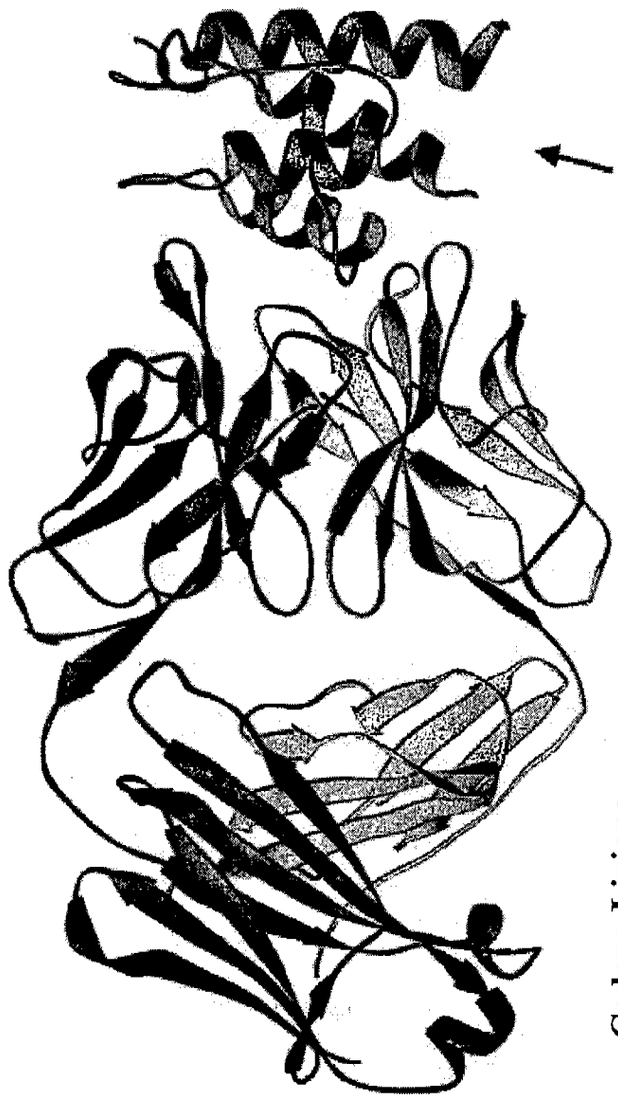


Figura 10

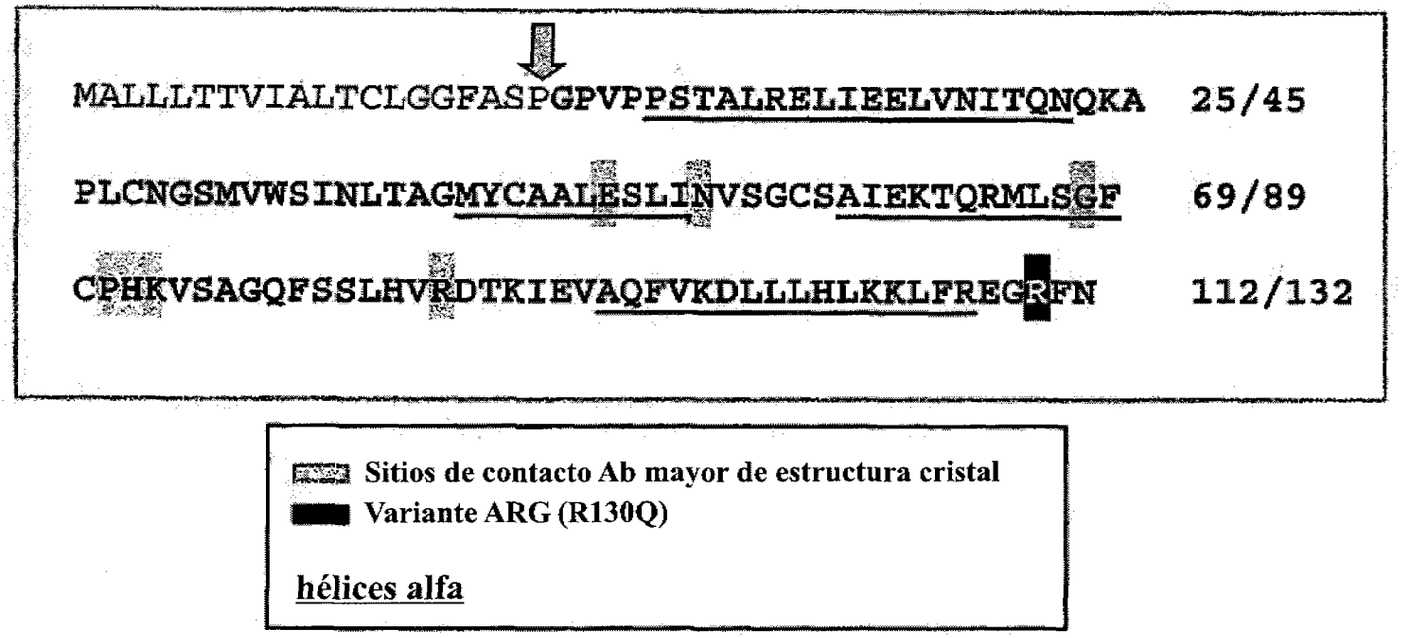

MALLLTTVIALTCLGGFASPGPVPPSTALRELIEELVNITQNQKA 25/45
PLCNGSMVWSINLTAGMYCAALESLINVSGCSAIEKTQRMLSGF 69/89
CPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLLHLKKLFREGRFN 112/132
Sitios de contacto Ab mayor de estructura cristal
Variante ARG (R130Q)
hélices alfa

Figura 11

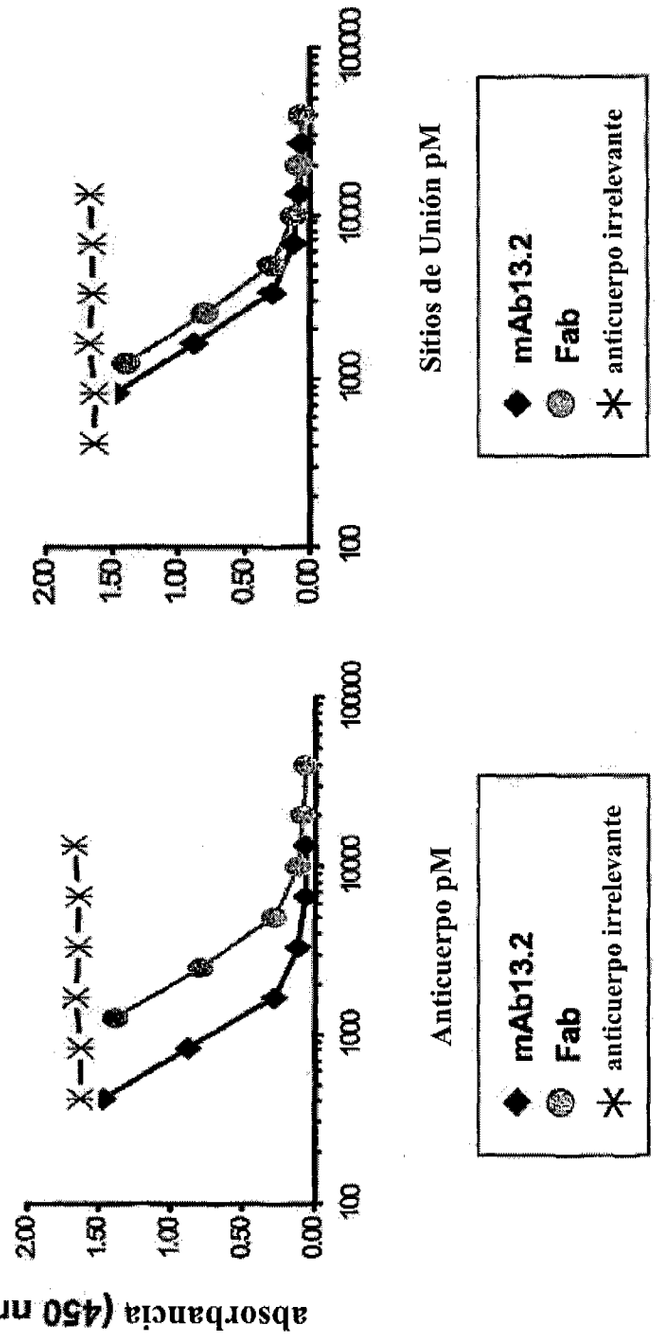


Figura 12A

Figura 12B

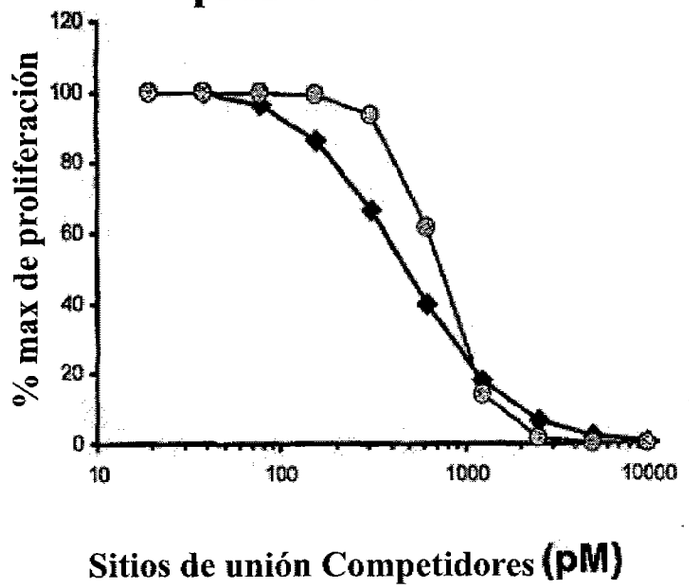


Figura 13A

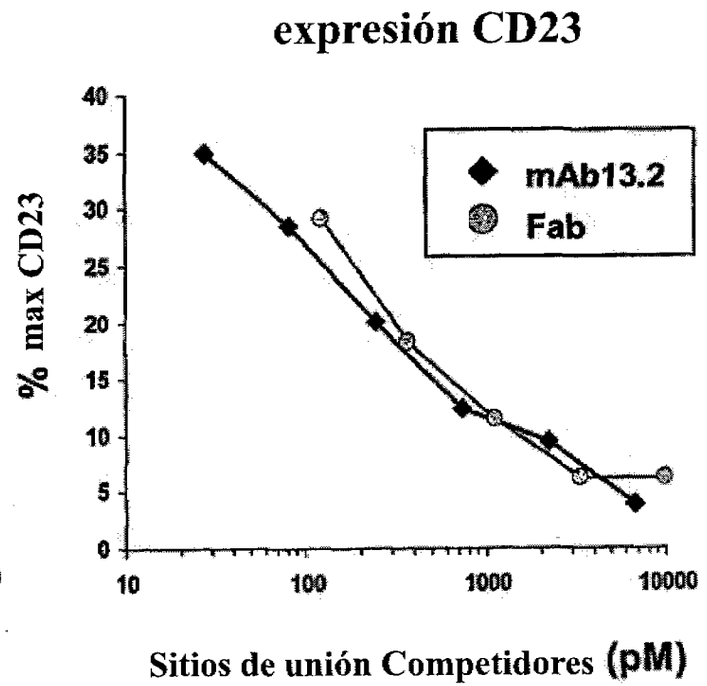


Figura 13B

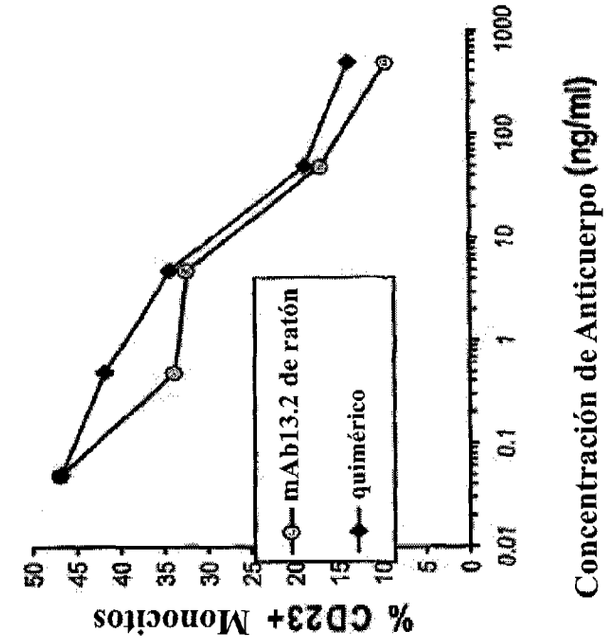


Figura 14B

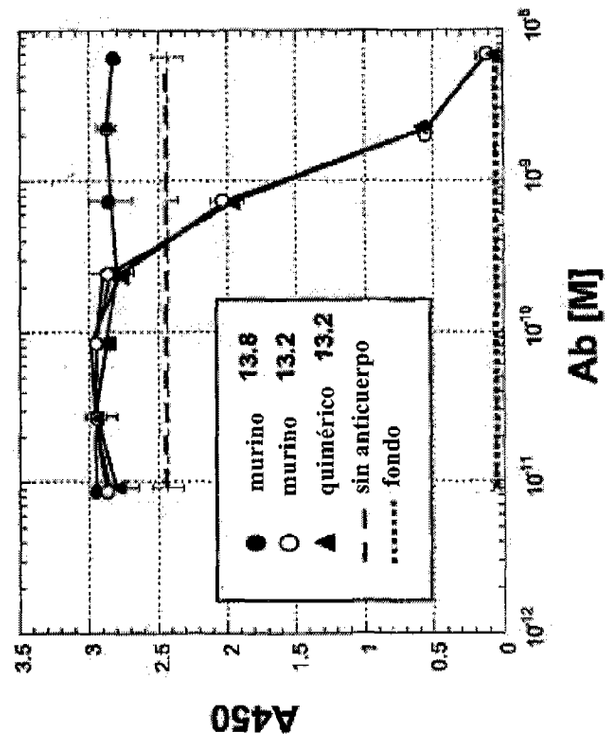


Figura 14A

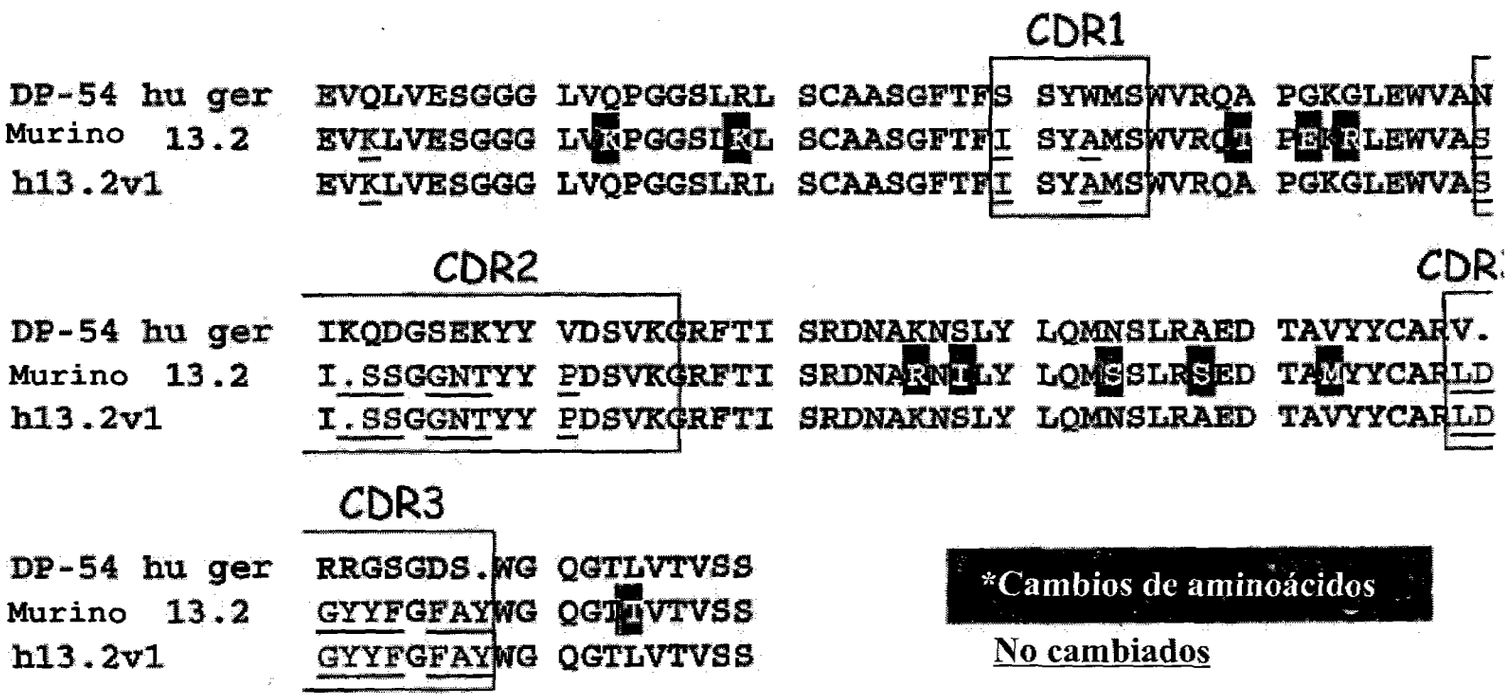

CDR1
DP-54 hu ger EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMSWVRQA PGKGLEWVAN
Murino 13.2 EVKLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFI SYAMSWVRQT PEKRLEWVAS
h13.2v1 EVKLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFI SYAMSWVRQA PGKGLEWVAS
CDR2
CDR
DP-54 hu ger IKQDGSEKYY VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARV.
Murino 13.2 I.SSGGNTYY PDSVKGRFTI SRDNARNILY LQMSSLRSED TAMYYCARLD
h13.2v1 I.SSGGNTYY PDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARLD
CDR3
DP-54 hu ger RRGSGDS.WG QGTLVTVSS
Murino 13.2 GYYFGFAYWG QGTTVTVSS
h13.2v1 GYYFGFAYWG QGTLVTVSS
*Cambios de aminoácidos
No cambiados

Figura 15

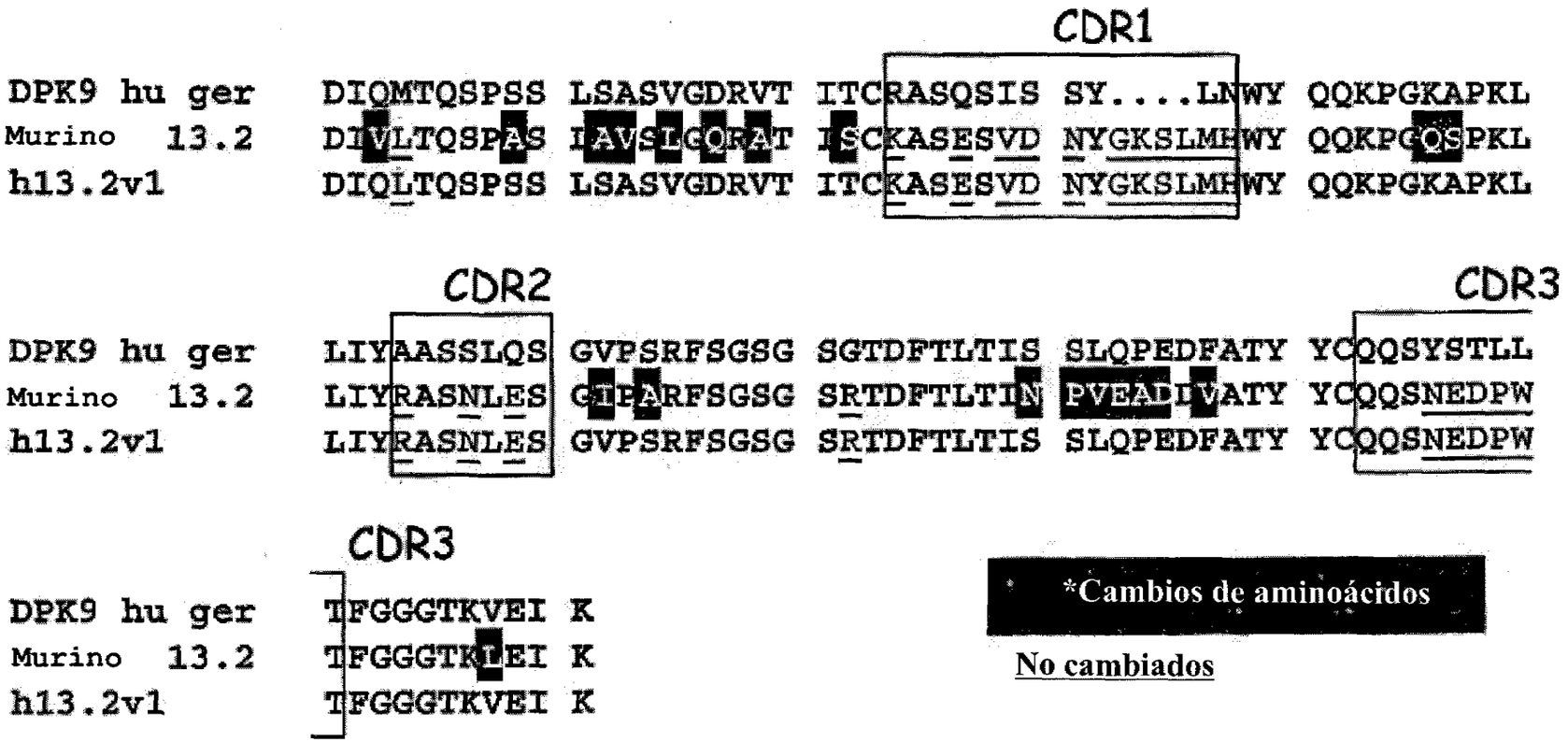

CDR1
DPK9 hu ger DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIS SY....LNWY QQKPGKAPKL
Murino 13.2 DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASESVD NYGKSLMHWY QQKPGQSPKL
h13.2v1 DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASESVD NYGKSLMHWY QQKPGKAPKL
CDR2
CDR3
DPK9 hu ger LIYAASSLQS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSYSTLL
Murino 13.2 LIYRASNLES GTPARFSGSG SRTDFTLTIN PVEADLVATY YCQQSNEDPW
h13.2v1 LIYRASNLES GVPSRFSGSG SRTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSNEDPW
CDR3
DPK9 hu ger TFGGGTKVEI K
Murino 13.2 TFGGGTKLEI K
h13.2v1 TFGGGTKVEI K
*Cambios de aminoácidos
No cambiados

Figura 16

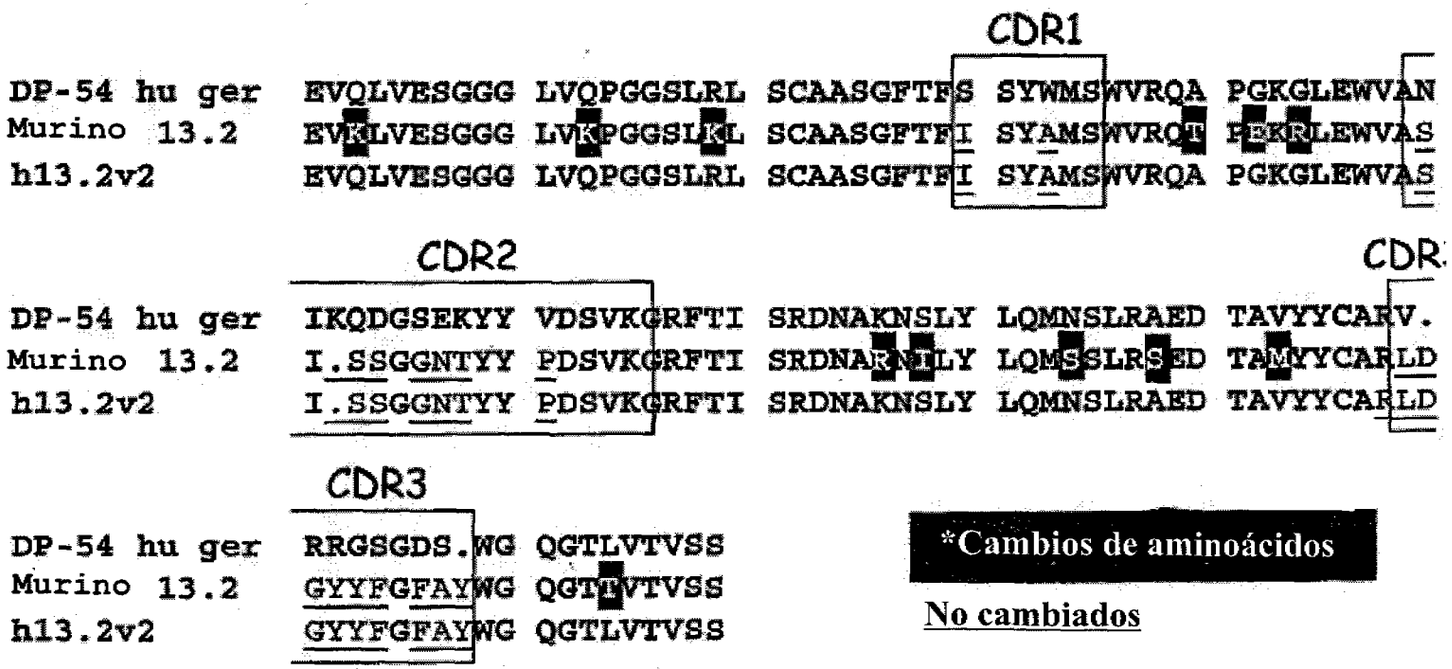

CDR1
DP-54 hu ger EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMSWVRQA PGKGLEWVAN
Murino 13.2 EVKLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFI SYAMSWVRQT PEKRLEWVAS
h13.2v2 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFI SYAMSWVRQA PGKGLEWVAS
CDR2
CDR
DP-54 hu ger IKQDGSEKYY VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARV.
Murino 13.2 I.SSGGNTYY PDSVKGRFTI SRDNARNILY LQMSSLRSED TAMYYCARLD
h13.2v2 I.SSGGNTYY PDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARLD
CDR3
DP-54 hu ger RRGSGDS.WG QGTLVTVSS
Murino 13.2 GYYFGFAYWG QGTTVTVSS
h13.2v2 GYYFGFAYWG QGTLVTVSS
*Cambios de aminoácidos
No cambiados

Figura 17

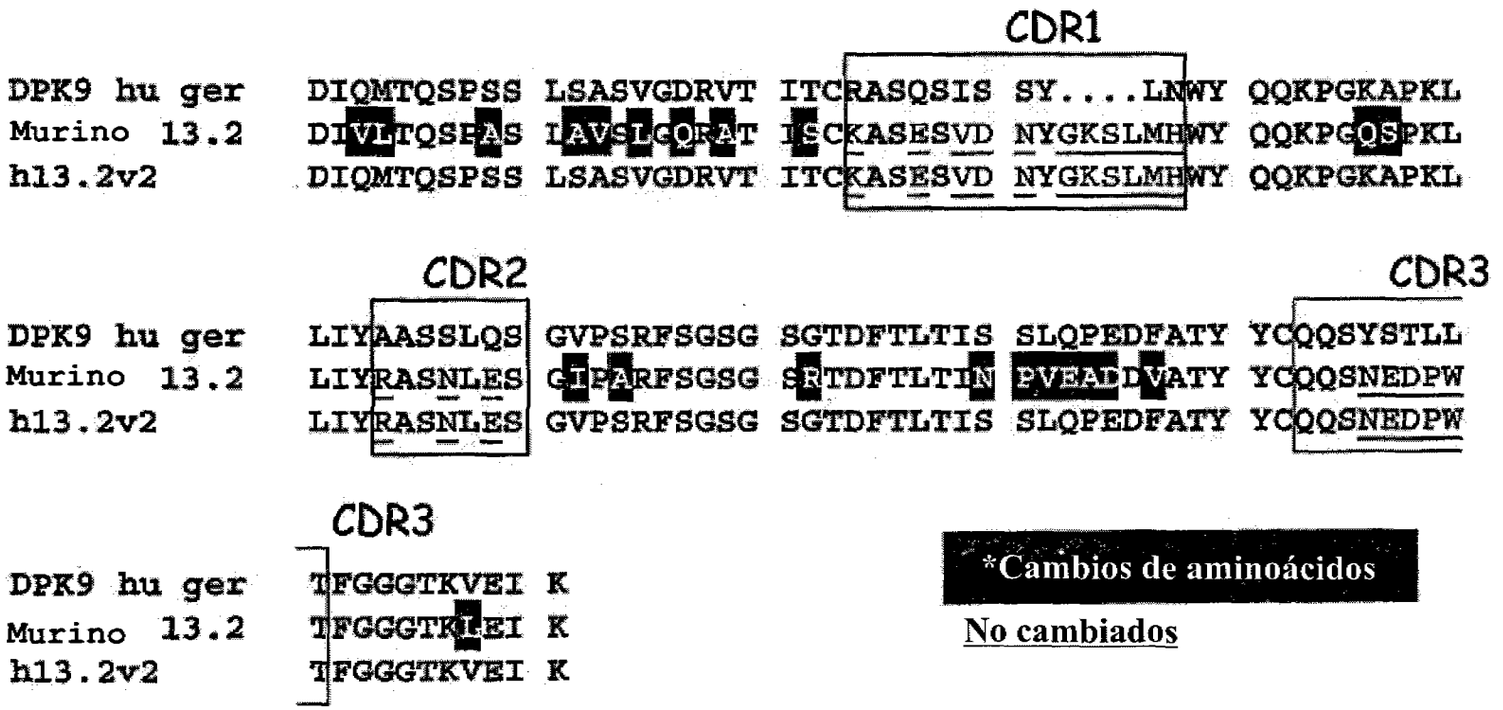

CDR1
DPK9 hu ger DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIS SY....LNWY QQKPGKAPKL
Murino 13.2 DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASESVD NYGKSLMHWY QQKPGQSPKL
h13.2v2 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASESVD NYGKSLMHWY QQKPGKAPKL
CDR2
CDR3
DPK9 hu ger LIYAASSLQS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSYSTLL
Murino 13.2 LIYRASNLES GIPARFSGSG SRTDFTLTIN PVEADDVATY YCQQSNEDPW
h13.2v2 LIYRASNLES GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSNEDPW
CDR3
DPK9 hu ger TFGGGTKVEI K
Murino 13.2 TFGGGTKLEI K
h13.2v2 TFGGGTKVEI K
*Cambios de aminoácidos
No cambiados

Figura 18

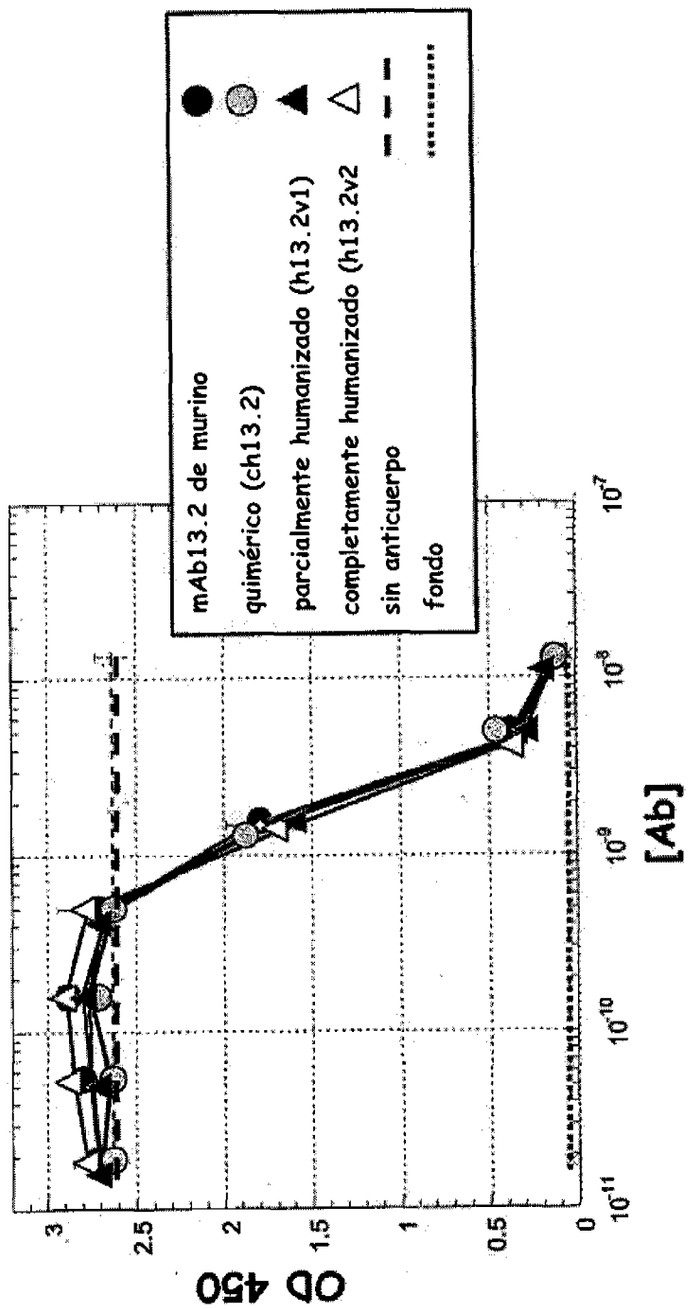
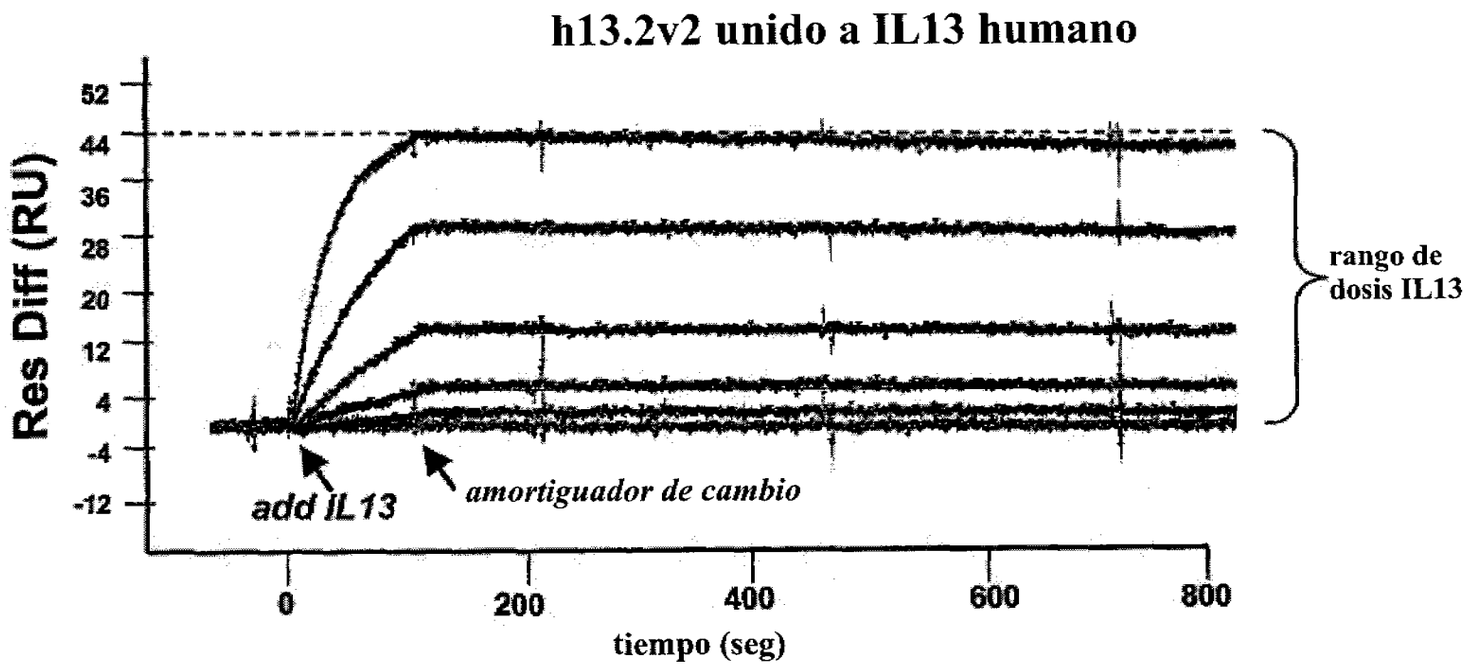

mAb13.2 de murino
quimérico (ch13.2)
parcialmente humanizado (h13.2v1)
completamente humanizado (h13.2v2
sin anticuerpo
fondo
OD 450
[Ab]
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
10^{-11}
10^{-10}
10^{-9}
10^{-8}
10^{-7}

Figura 19A



K_A (1/M)	K_D (M)
9.3×10^9	1.1×10^{-10}

Figura 19B

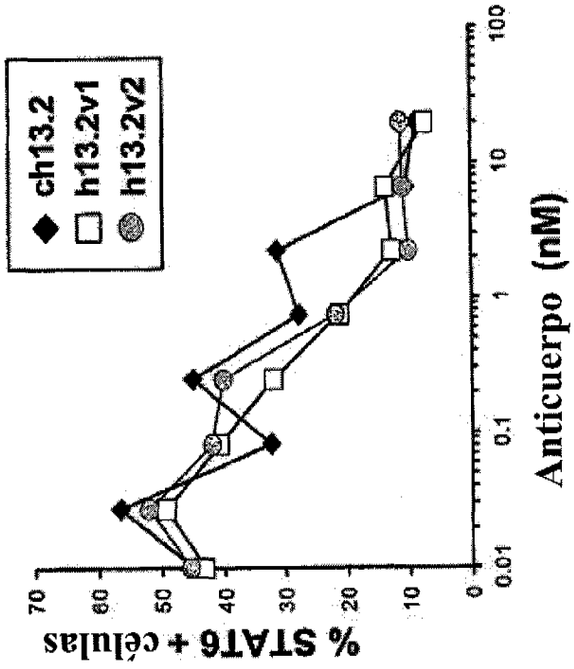


Figura 20B

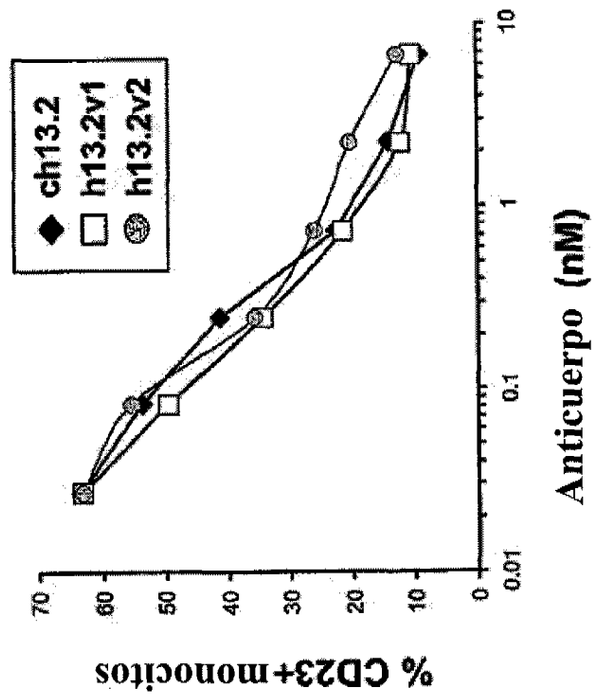


Figura 20A

IL13 humano Recombinante

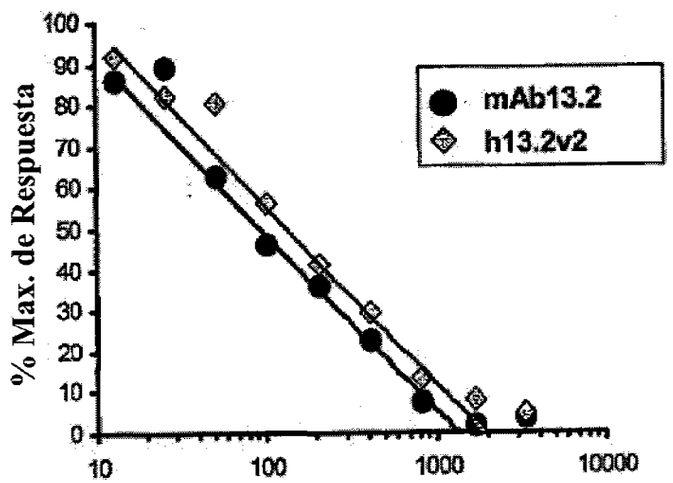


Figura21A

IL13 humano nativo

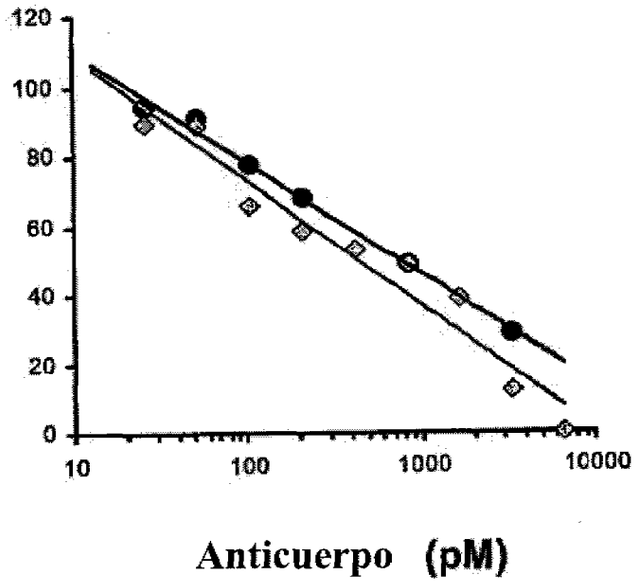


Figura21B

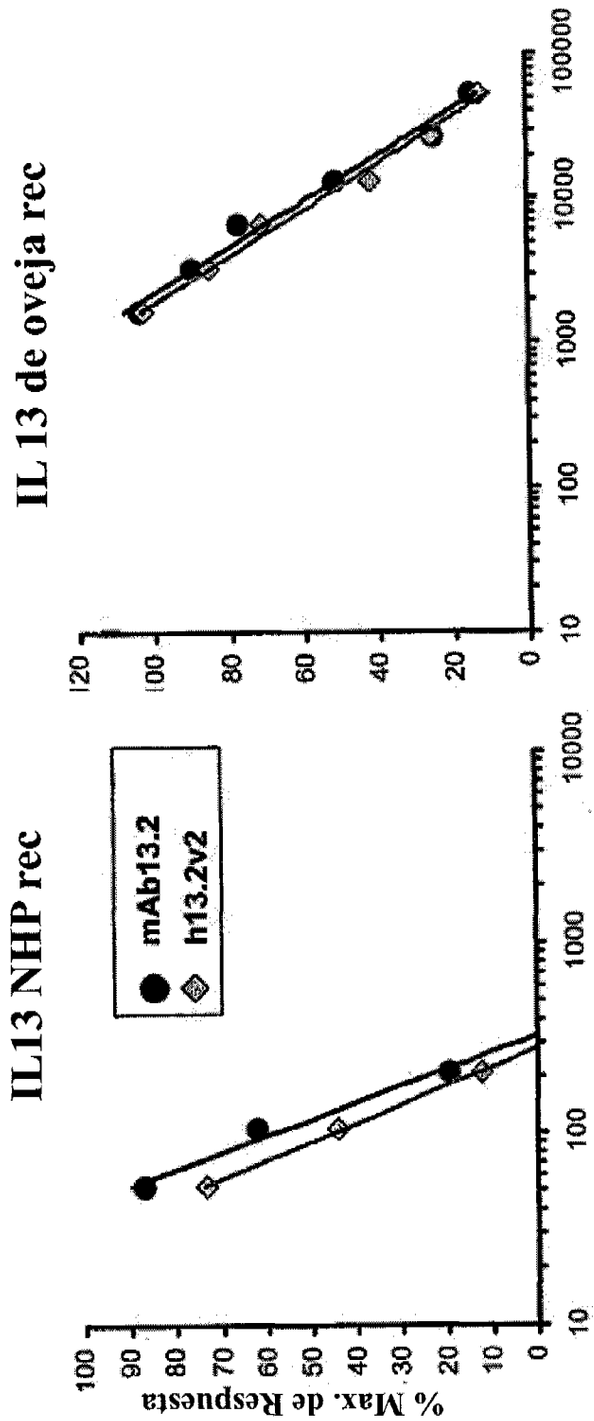


Figura22A

Figura22B

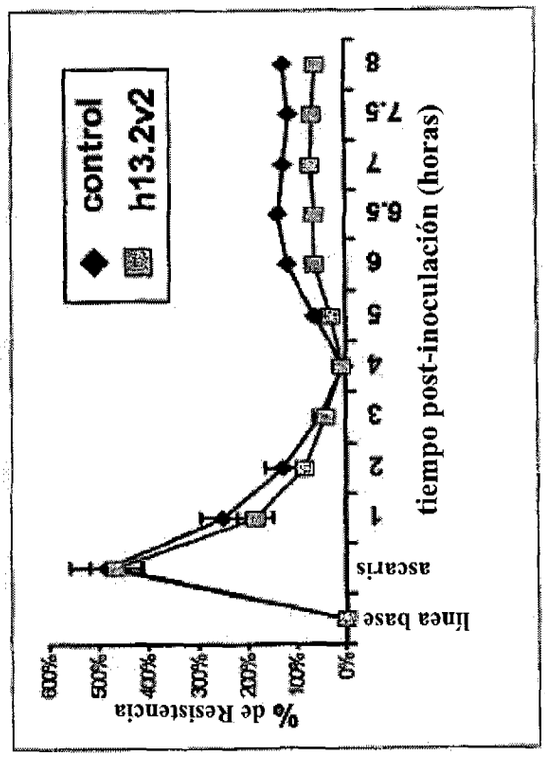


Figura 23B

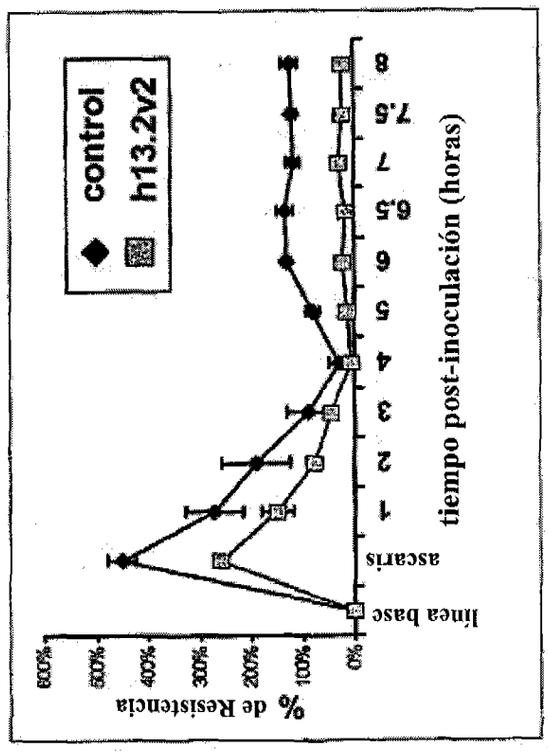


Figura 23A

Figura 24A

Figura 24B

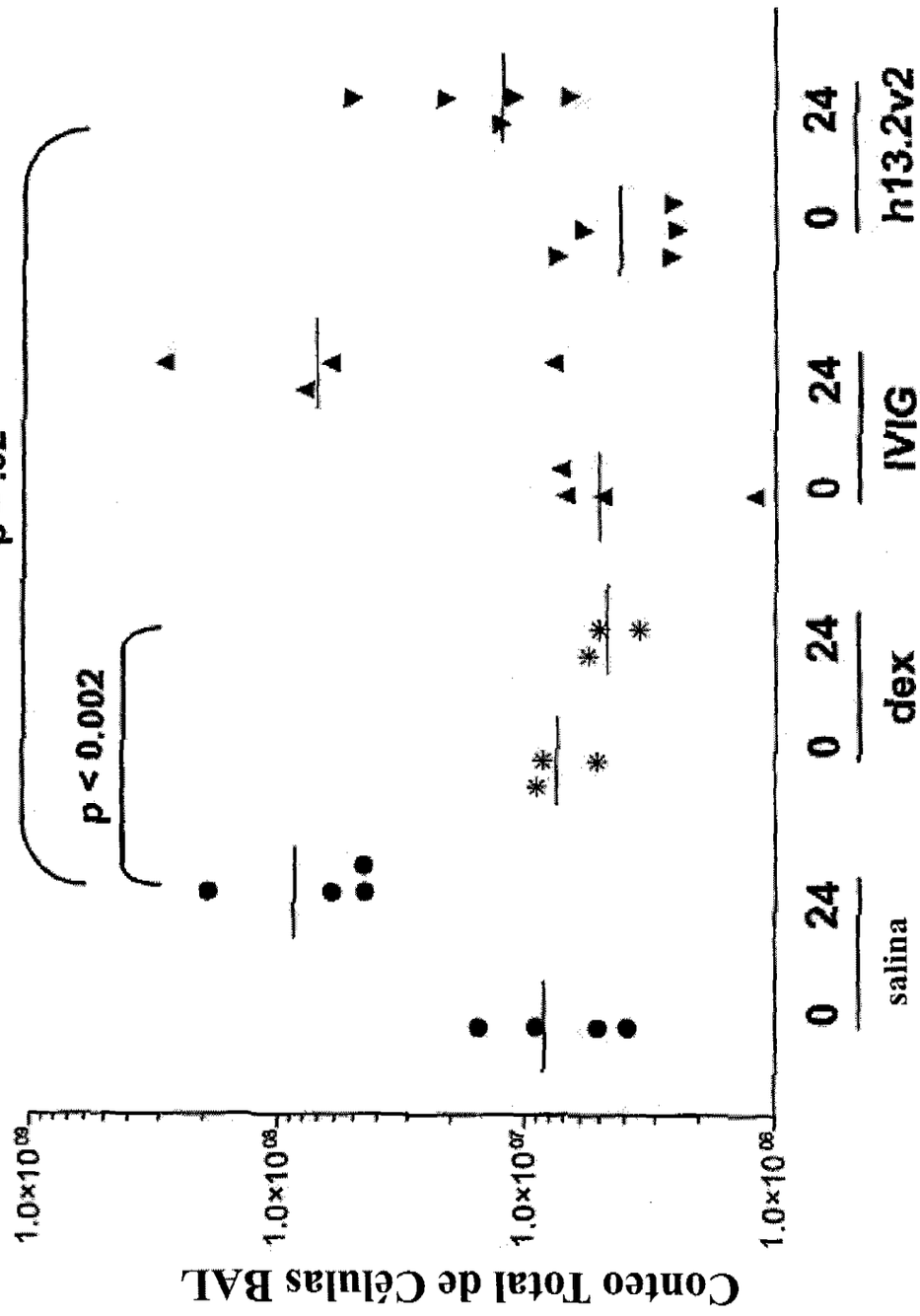

Conteo Total de Células BAL
1.0×10⁸
1.0×10⁸
1.0×10⁷
1.0×10⁶
p = .02
p < 0.002
0 24 0 24 0 24 0 24
salina dex IVIG h13.2v2

Figura 25

VH3	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3
3-07	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	S--YWMS	WVRQAPGKGLEWVA	NIKQ--DGSEKYYVDSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
3-09	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFD	D--YAMH	WVRQAPGKGLEWVS	GISW--NSGSIGYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKD
3-11*	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	D--YYMS	WIRQAPGKGLEWVS	YISS--SGSTIYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
3-13	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	S--YDMH	WVRQATGKGLEWVS	AIG---TAGDTYYPGSVKG	RFTISRENAKNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCAR
3-15	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	N--AWMS	WVRQAPGKGLEWVG	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT
3-20	EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFD	D--YGMS	WVRQAPGKGLEWVS	GINW--NGGSTGYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYHCAR
3-21	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	S--YSMN	WVRQAPGKGLEWVS	SISS--SSSYIYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
3-23	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	S--YAMS	WVRQAPGKGLEWVS	AISG--SGGSTYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
3-30	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	S--YGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VISY--DGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
3-30.3	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	S--YAMH	WVRQAPGKGLEWVA	VISY--DGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
3-30.5	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	S--YGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VISY--DGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
3-33	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	S--YGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VIWY--DGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
3-43	EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFD	D--YTMH	WVRQAPGKGLEWVS	LISW--DGQSTYYADSVKG	RFTISRDNSKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAKD
3-48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	S--YSMN	WVRQAPGKGLEWVS	YISS--SSSTIYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR
3-49	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFG	D--YAMS	WFRQAPGKGLEWVG	FIRSKAYGGTTEYTASVKG	RFTISRDGSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCTR
3-53	EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVS	S--NYMS	WVRQAPGKGLEWVS	VIY---SGGSTYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
3-64	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	S--YAMH	WVRQAPGKGLEYVS	AISS--NGGSTYYANSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMGSLRAEDMAVYYCAR
3-66	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVS	S--NYMS	WVRQAPGKGLEWVS	VIY---SGGSTYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
3-72	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	D--HYMD	WVRQAPGKGLEWVG	RTRNKANSYTTEYAASVKG	RFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCAR
3-73	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFS	G--SAMH	WVRQASGKGLEWVG	RIRSKANSYATAYAASVKG	RFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTR
3-74	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	S--YWMH	WVRQAPGKGLVWVS	RINS--DGSSTSYADSVKG	RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
3-d	EVQLVESRGVLVQPGGSLRLSCAASGFTVS	S--NEMS	WVRQAPGKGLEWVS	SI----SGQSTYYADSRKG	RFTISRDNSKNTLHLQMNSLRAEDTAVYYCKK
DP-61	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFS	S--YAMH	WVRQAPGKGLEWVS	AI---GTGGGTYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDMAVYYCAR
mAb13.2	EVKLVRSGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFI	S--YAMS	WVRQTPEKRLEWVA	SI---SSGGNTYYPDSVKG	RFTISRDNARNILYLQMSSLRSEDTAMYYCAR

Figura 26

CDR1
DP-77 hu ger EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSS
Murino 13.2 EVKLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFI SYAMSWVRQT PEKRLEWVAS
h13.2v3 EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFI SYAMSWVRQA PGKGLEWVSS
CDR2
CDR3
DP-77 hu ger ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAR
Murino 13.2 I.SSGGNTYY PDSVKGRFTI SRDNARNILY LQMSSLRSED TAYYYCARLD
h13.2v3 I.SSGGNTYY PDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARLD
CDR3
DP-77 hu ger
Murino 13.2 GYYFGFAYWG QGTTVTVSS
h13.2v3 GYYFGFAYWG QGTTVTVSS
*Cambios de aminoácidos
No cambiados

Figura 27

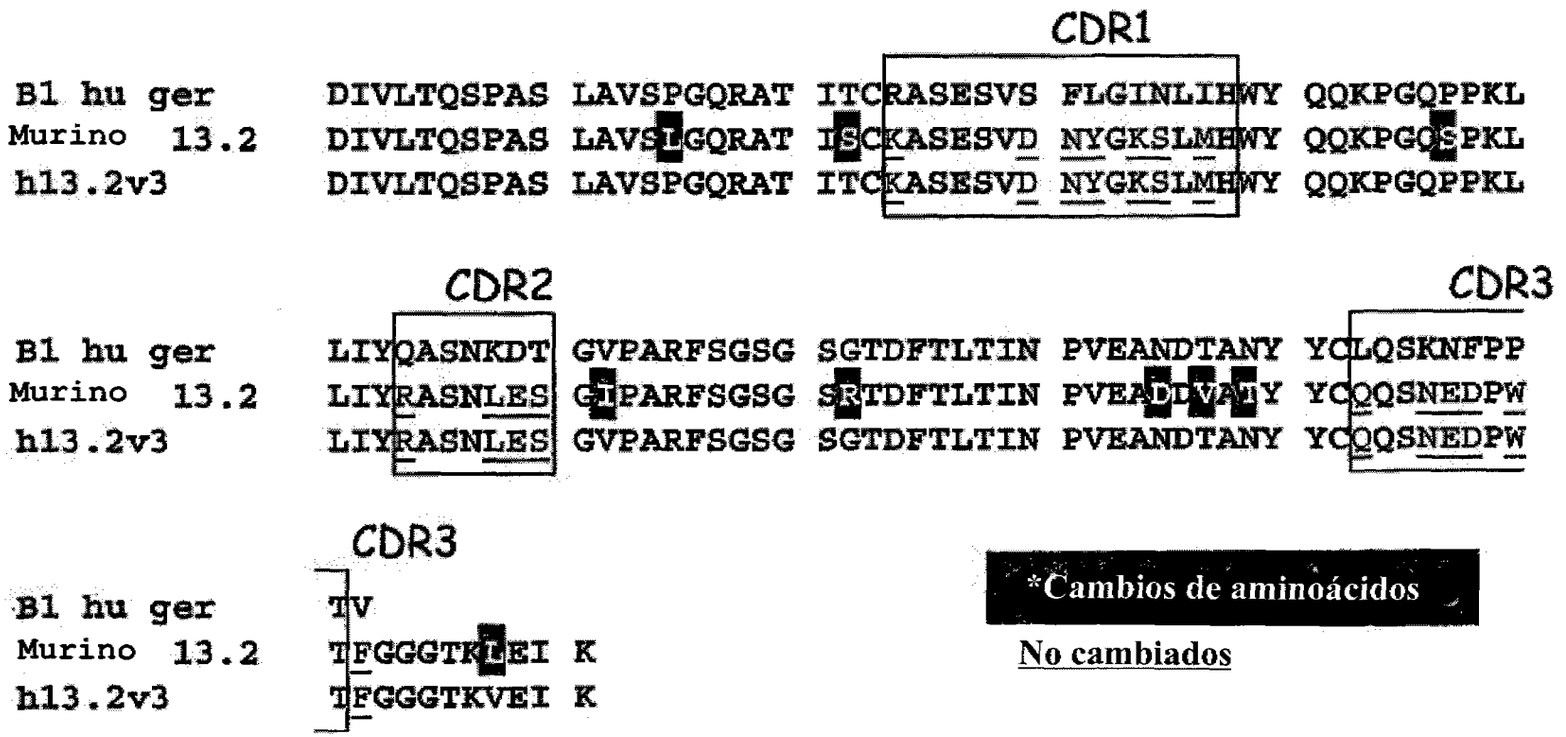

CDR1
B1 hu ger DIVLTQSPAS LAVSPGQRAT ITCRASESVS FLGINLIHWY QQKPGQPPKL
Murino 13.2 DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASESVD NYGKSLMHWY QQKPGQSPKL
h13.2v3 DIVLTQSPAS LAVSPGQRAT ITCKASESVD NYGKSLMHWY QQKPGQPPKL
CDR2
CDR3
B1 hu ger LIYQASNKDT GVPARFSGSG SGTDFTLTIN PVEANDTANY YCLQSKNFPP
Murino 13.2 LIYRASNLES GIPARFSGSG SRTDFTLTIN PVEADDVAIY YCQQSNEDPW
h13.2v3 LIYRASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIN PVEANDTANY YCQQSNEDPW
CDR3
B1 hu ger TV
Murino 13.2 TFGGGTKLEI K
h13.2v3 TFGGGTKVEI K
*Cambios de aminoácidos
No cambiados

Figura 28

Residuo	Número de Secuencia Lineal	Número de Estructura Chotia	Número de Secuencia Kabat
E	1	1	1
V	2	2	2
K	3	3	3
L	4	4	4
V	5	5	5
E	6	6	6
S	7	7	7
G	8	8	8
G	9	9	9
G	10	10	10
L	11	11	11
V	12	12	12
K	13	13	13
P	14	14	14
G	15	15	15
G	16	16	16
S	17	17	17
L	18	18	18
K	19	19	19
L	20	20	20
S	21	21	21
C	22	22	22
A	23	23	23
A	24	24	24
S	25	25	25
G	26	26	26
F	27	27	27
T	28	28	28
F	29	29	29
I	30	30	30
S	31	31	31
Y	32	32	32

Residuo	Número de Secuencia Lineal	Número de Estructura Chotia	Número de Secuencia Kabat
A	33	33	33
M	34	34	34
S	35	35	35
W	36	36	36
V	37	37	37
R	38	38	38
Q	39	39	39
T	40	40	40
P	41	41	41
E	42	42	42
K	43	43	43
R	44	44	44
L	45	45	45
E	46	46	46
W	47	47	47
V	48	48	48
A	49	49	49
S	50	50	50
I	51	51	51
S	52	52	52
S	53	53	53
G	54	54	54
G	55	55	55
N	56	56	56
T	57	57	57
Y	58	58	58
Y	59	59	59
P	60	60	60
D	61	61	61
S	62	62	62
V	63	63	63
K	64	64	64

Residuo	Número de Secuencia Lineal	Número de Estructura Chotia	Número de Secuencia Kabat
G	65	65	65
R	66	66	66
F	67	67	67
T	68	68	68
I	69	69	69
S	70	70	70
R	71	71	71
D	72	72	72
N	73	73	73
A	74	74	74
R	75	75	75
N	76	76	76
I	77	77	77
L	78	78	78
Y	79	79	79
L	80	80	80
Q	81	81	81
M	82	82	82
S	83	82A	82A
S	84	82B	82B
L	85	82C	82C
R	86	83	83
S	87	84	84
E	88	85	85
D	89	86	86
T	90	87	87
A	91	88	88
M	92	89	89
Y	93	90	90
Y	94	91	91
C	95	92	92
A	96	93	93

Residuo	Número de Secuencia Lineal	Número de Estructura Chotia	Número de Secuencia Kabat
R	97	94	94
L	98	95	95
D	99	96	96
G	100	97	97
Y	101	98	98
Y	102	99	99
F	103	100	100
G	104	100A	100A
F	105	100B	100B
A	106	101	101
Y	107	102	102
W	108	103	103
G	109	104	104
Q	110	105	105
G	111	106	106
T	112	107	107
T	113	108	108
V	114	109	109
T	115	110	110
V	116	111	111
S	117	112	112
S	118	113	113

Numeración de Cadena Pesada Variable mAb13.2 De Acuerdo con Esquemas Diferentes

Figura 29

Residuo	Número de Secuencia Lineal	Número de Estructura Chotia	Número de Secuencia Kabat
D	1	1	1
I	2	2	2
V	3	3	3
L	4	4	4
T	5	5	5
Q	6	6	6
S	7	7	7
P	8	8	8
A	9	9	9
S	10	10	10
L	11	11	11
A	12	12	12
V	13	13	13
S	14	14	14
L	15	15	15
G	16	16	16
Q	17	17	17
R	18	18	18
A	19	19	19
T	20	20	20
I	21	21	21
S	22	22	22
C	23	23	23
K	24	24	24
A	25	25	25
S	26	26	26
E	27	27	27
S	28	28	27A
V	29	29	27B
D	30	30	27C
N	31	30A	27D
Y	32	30B	28

Residuo	Número de Secuencia Lineal	Número de Estructura Chotia	Número de Secuencia Kabat
G	33	30C	29
K	34	30D	30
S	35	31	31
L	36	32	32
M	37	33	33
H	38	34	34
W	39	35	35
Y	40	36	36
Q	41	37	37
Q	42	38	38
K	43	39	39
P	44	40	40
G	45	41	41
Q	46	42	42
S	47	43	43
P	48	44	44
K	49	45	45
L	50	46	46
L	51	47	47
I	52	48	48
Y	53	49	49
R	54	50	50
A	55	51	51
S	56	52	52
N	57	53	53
L	58	54	54
E	59	55	55
S	60	56	56
G	61	57	57
I	62	58	58
P	63	59	59
A	64	60	60

Residuo	Número de Secuencia Lineal	Número de Estructura Chotia	Número de Secuencia Kabat
R	65	61	61
F	66	62	62
S	67	63	63
G	68	64	64
S	69	65	65
G	70	66	66
S	71	67	67
R	72	68	68
T	73	69	69
D	74	70	70
F	75	71	71
T	76	72	72
L	77	73	73
T	78	74	74
I	79	75	75
N	80	76	76
P	81	77	77
V	82	78	78
E	83	79	79
A	84	80	80
D	85	81	81
D	86	82	82
V	87	83	83
A	88	84	84
T	89	85	85
Y	90	86	86
Y	91	87	87
C	92	88	88
Q	93	89	89
Q	94	90	90
S	95	91	91
N	96	92	92

Residuo	Número de Secuencia Lineal	Número de Estructura Chotia	Número de Secuencia Kabat
E	97	93	93
D	98	94	94
P	99	95	95
W	100	96	96
T	101	97	97
F	102	98	98
G	103	99	99
G	104	100	100
G	105	101	101
T	106	102	102
K	107	103	103
L	108	104	104
E	109	105	105
I	110	106	106
K	111	107	107

Numeración de Cadena Ligera Variable mAb13.2 De Acuerdo con Esquemas Diferentes

Figura 30

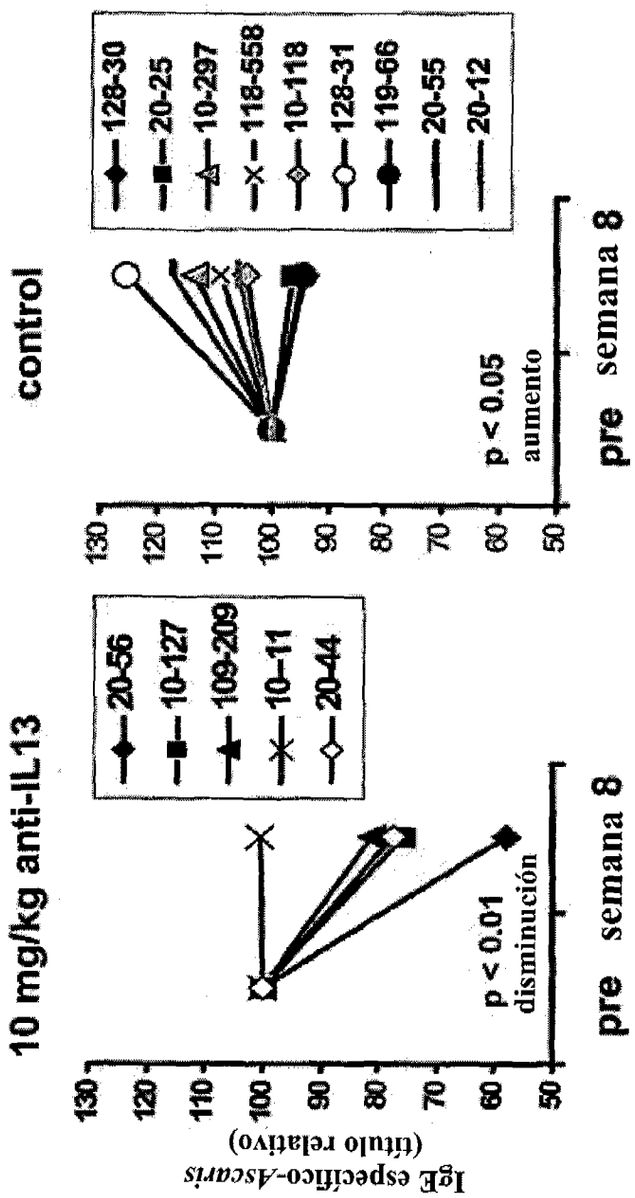


Figura 31A

Figura 31B

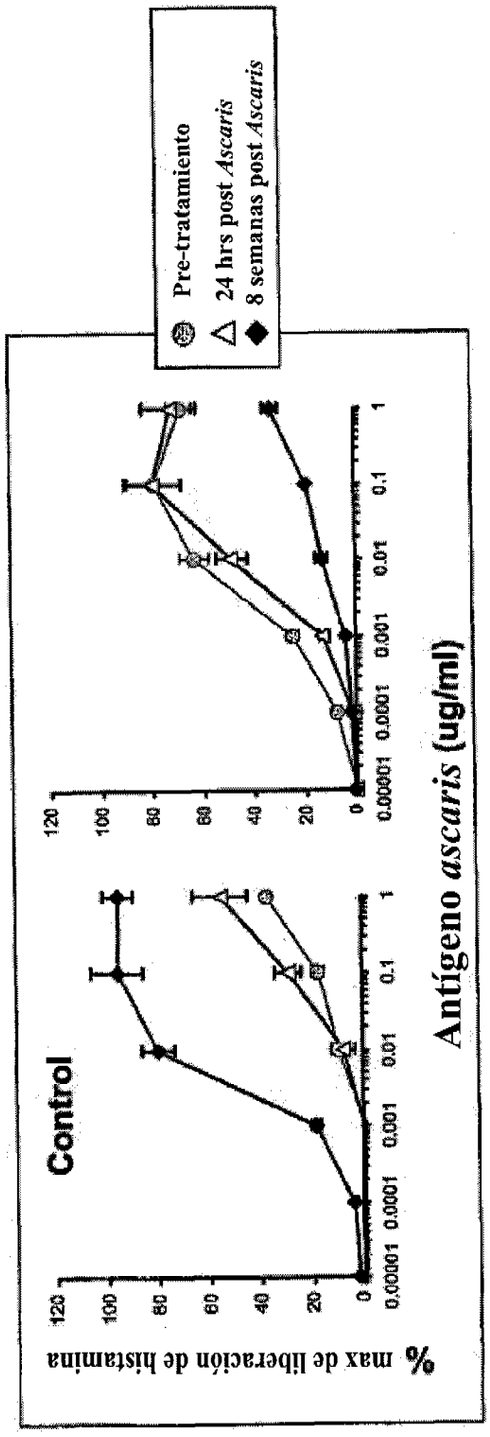

Pre-tratamiento
24 hrs post Ascaris
8 semanas post Ascaris
Control
% max de liberación de histamina
Antígeno ascaris (ug/ml)
120
100
80
60
40
20
0
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1

Figura 32A

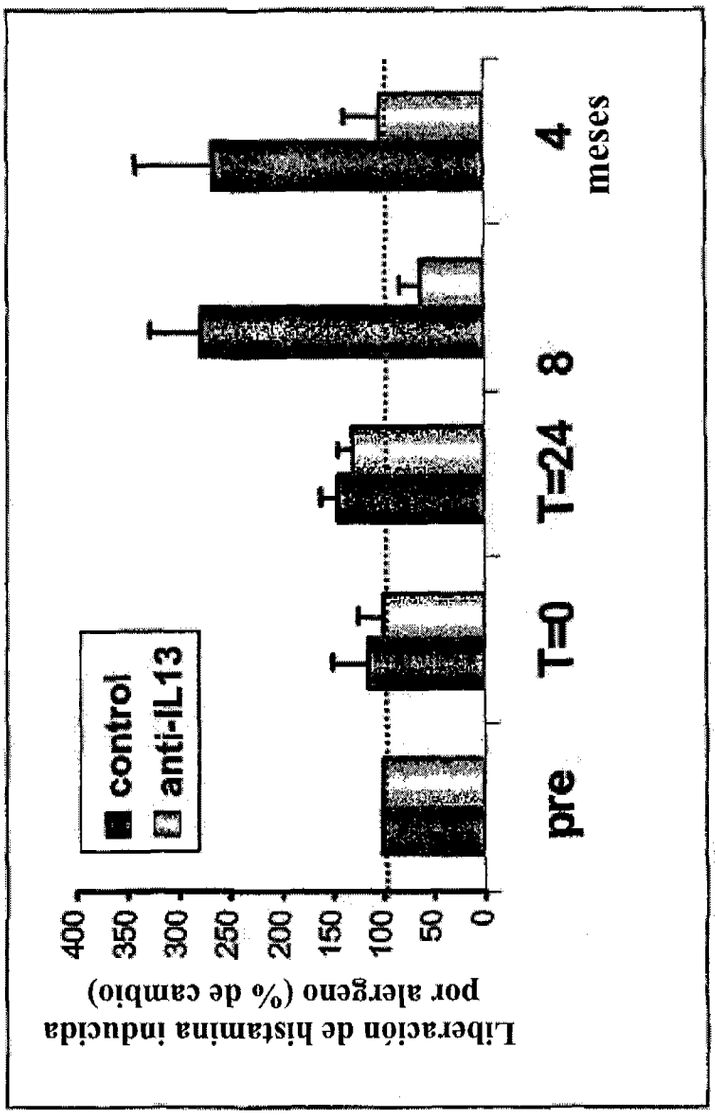

Liberación de histamina inducida
por alergeno (% de cambio)
400
350
300
250
200
150
100
50
0
control
anti-IL13
pre
T=0
T=24
8
4
meses

Figura 32B

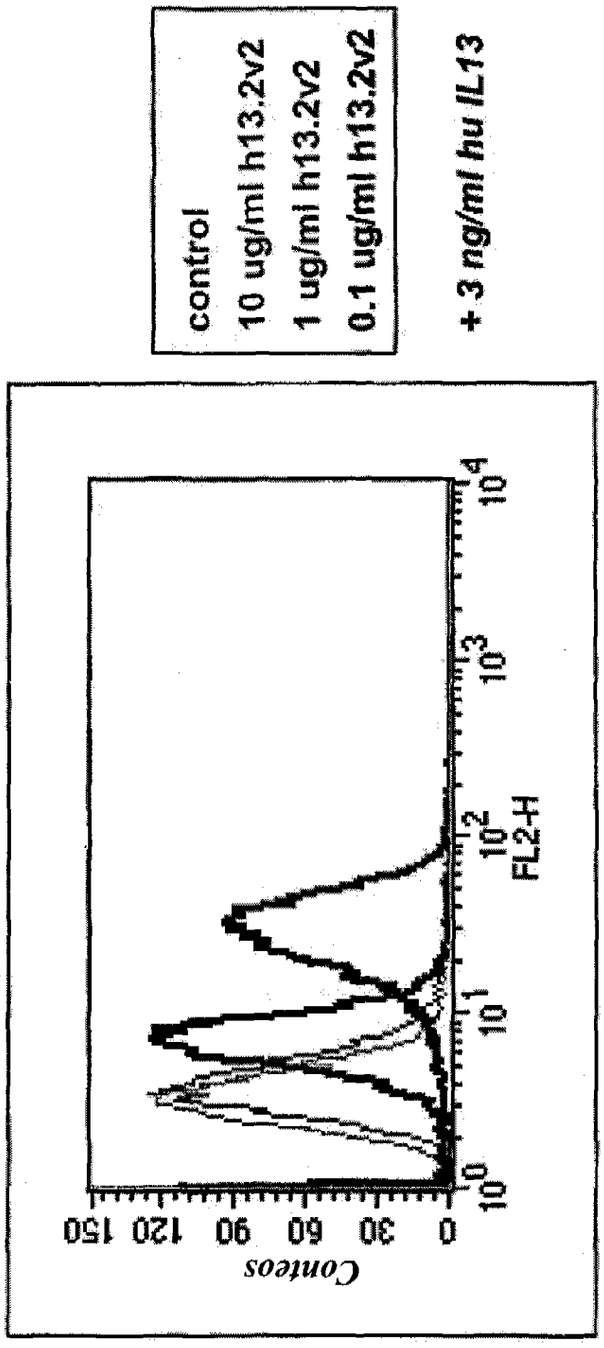

control
10 ug/ml h13.2v2
1 ug/ml h13.2v2
0.1 ug/ml h13.2v2
+ 3 ng/ml hu IL13
Contros
0 30 60 90 120 150
FL2-H
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4

Figura 33

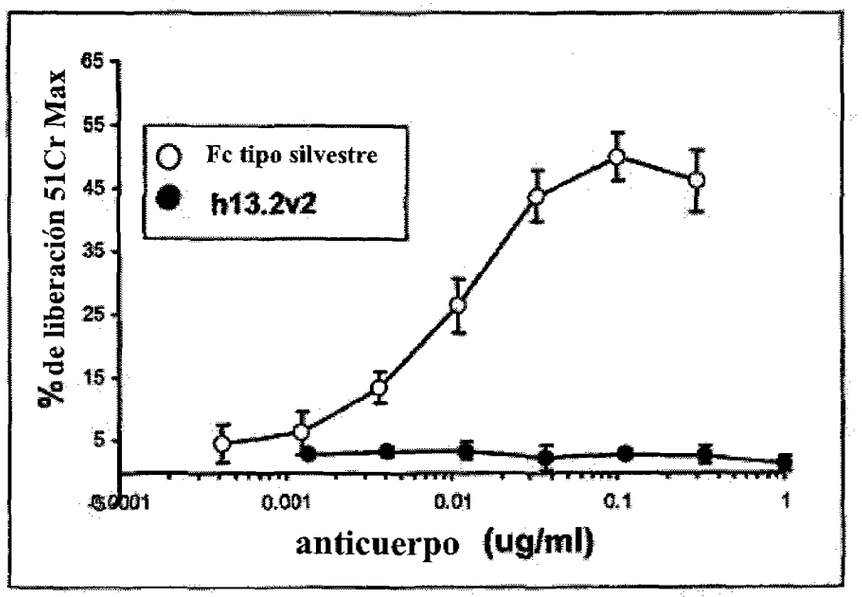


Figura 34A

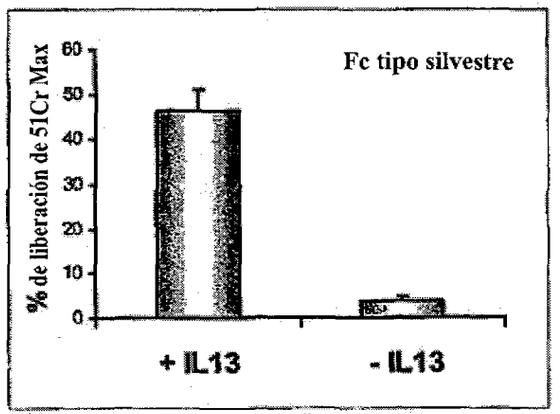


Figura 34B

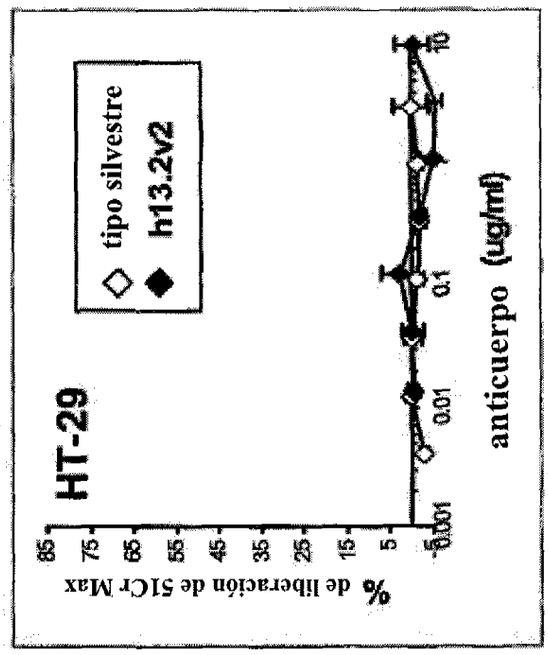


Figura 35B

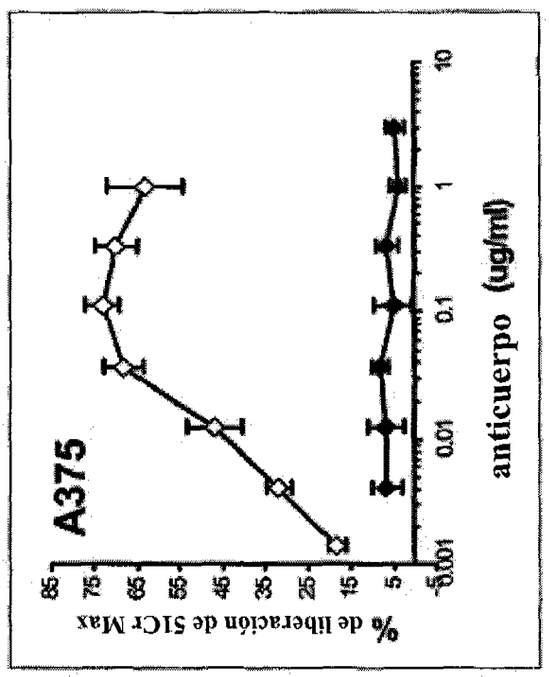


Figura 35A

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> >Wyeth

<120> ANTICUERPOS CONTRA LA INTERLEUQUINA-13 Y USOS DE LOS MISMOS

<130> 16158-048WO1 / AM101493-PCT

<150> US60/578,473
<151> 2004-06-09

<150> US60/581,375
<151> 2004-06-22

<150> US60/578,736
<151> 2004-06-09

<160> 37

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 333

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 1

gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atatcctgca aagccagtga aagtgttgat aattatggca aaagtttaat gcactggtac 120

cagcagaaac caggacagtc acccaaactc ctcatctatc gtgcatccaa cctagaatct 180

gggatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattaat 240

cctgtggagg ctgatgatgt tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtgg 300

acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa 333

<210> 2

<211> 333

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 2

gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atatcctgca aagccagtga aagtgttgat aattatggca aaagtttaat gcactggtac 120

cagcagaaac caggacagtc acccaaactc ctcatctatc gtgcatccaa cctagaatct 180

gggatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattaat 240

cctgtggagg ctgatgatgt tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtgg 300

acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa 333

<210> 3

<211> 333

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cadena liviana del anticuerpo parcialmente humanizado

<400> 3

gacatccagc tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60

atcacttgca aagccagtga agtgttgat aattatggca aaagtctgat gcactggtat 120

cagcagaaac cagggaaagc tcctaagctc ctgatctatc gtgcatccaa cctggaatct 180

ggcgtcccat caaggttcag tggcagtgga tctcgcacag atttcactct caccatcagc 240

gtctgcaac ctgaagattt tgcaacttac tactgtcagc aaagtaatga ggatccctgg 300

accttcggcg gagggaccaa ggtagagatc aaa 333

<210> 4

<211> 333

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cadena liviana del anticuerpo completamente humanizado

<400> 4

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60

atcacttgca aagccagtga agtgttgat aattatggca aaagtctgat gcactggtat 120

cagcagaaac cagggaaagc tcctaagctc ctgatctatc gtgcatccaa cctggaatct 180

ggcgtcccat caaggttcag tggcagtgga tctggcacag atttcactct caccatcagc 240

agtctgcaac ctgaagattt tgcaacttac tactgtcagc aaagtaatga ggatccctgg 300

accttcggcg gagggaccaa ggtagagatc aaa 333

<210> 5

<211> 351

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 5

gaagtgaagc tggtggagtc tgggggaggc ttagtgaaac ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcatt agctatgcca tgtcttgggt tcgtcagact 120

ccagagaaga ggctggagtg ggtcgcatcc attagtagtg gtggtaacac ctactatcca 180

gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagataatg ccaggaacat cctatacctg 240

caaatgagca gtctgaggtc tgaggacacg gccatgtatt actgtgcacg acttgatggt 300

tactactttg gatttgctta ctggggccaa gggactctgg tcgctgtctc t 351

<210> 6

<211> 351

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 6

gaagtgaagc tggtggagtc tgggggaggc ttagtgaaac ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcatt agctatgcca tgtcttgggt tcgtcagact 120

ccagagaaga ggctggagtg ggtcgcatcc attagtagtg gtggtaacac ctactatcca 180

gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagataatg ccaggaacat cctatacctg 240

caaatgagca gtctgaggtc tgaggacacg gccatgtatt actgtgcacg acttgatggt 300

tactactttg gatttgctta ctggggccaa gggactctgg tcgctgtctc t 351

<210> 7

<211> 354

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cadena pesada del anticuerpo parcialmente humanizado

<400> 7

gaggtcaagc tggtggagtc agggggaggc ttagtgcaac ctggagggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcatt agctatgcca tgtcttgggt tcgtcaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtcgcatcc attagtagtg gtggtaacac ctactatcca 180

gacagcgtga agggccgatt caccatctcc agagataatg ccaagaacag cctatacctg 240

caaatgaaca gtctgagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcacg acttgatggt 300

tactactttg gatttgctta ctggggccaa gggaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 8

<211> 354

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cadena pesada del anticuerpo totalmente humanizado

<400> 8

gaggtccagc tggtggagtc agggggaggc ttagtgcaac ctggagggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcatt agctatgcca tgtcttgggt tcgtcaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtcgcatcc attagtagtg gtggtaacac ctactatcca 180

gacagcgtga agggccgatt caccatctcc agagataatg ccaagaacag cctatacctg 240

caaatgaaca gtctgagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcacg acttgatggt 300

tactactttg gatttgctta ctggggccaa gggaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 9

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

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

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

Gly Lys Ser Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
65 70 75 80

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

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 10

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

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

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

Gly Lys Ser Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
65 70 75 80

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

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 11

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena liviana del anticuerpo parcialmente humanizado

<400> 11

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

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

Gly Lys Ser Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

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

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 12

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena liviana del anticuerpo totalmente humanizado

<400> 12

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

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

Gly Lys Ser Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

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

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 13

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ile Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Leu Asp Gly Tyr Tyr Phe Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 14

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ile Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Leu Asp Gly Tyr Tyr Phe Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 15

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena pesada del anticuerpo parcialmente humanizado

<400> 15

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ile Ser Tyr
20 25 30

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

35 40 45

Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Leu Asp Gly Tyr Tyr Phe Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 16

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena pesada del anticuerpo totalmente humanizado

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ile Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Leu Asp Gly Tyr Tyr Phe Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 17

<211> 329

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> La "S" en la posición #1 representa el residuo de aminoácido #119 cuando la secuencia sigue al residuo #118 de, por ejemplo, las SEQ ID NOs:15 ó 16.

En esta representación de la secuencia, los aminoácidos mutados están en los residuos #s 234 y 237 [en vez de 116 y 119, respectivamente].

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> "S" en 1 (como se muestra) - L116A y G119A "S" en 119 -- L234A y G237A

<220>

<221> MUTAGENO

<222> (116)..(116)

<220>

<221> MUTAGENO

<222> (119)..(119)

<400> 17

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
1 5 10 15

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
20 25 30

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
35 40 45

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

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
65 70 75 80

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
85 90 95

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
100 105 110

Ala Pro Glu Ala Leu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
115 120 125

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
130 135 140

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
145 150 155 160

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
165 170 175

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
180 185 190

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
195 200 205

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
210 215 220

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
225 230 235 240

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
245 250 255

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
260 265 270

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
275 280 285

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
290 295 300

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
305 310 315 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 18

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> La "R" en la posición #1 representa al residuo de aminoácido #112 cuando la secuencia sigue al residuo #111 de, por ejemplo, las SEQ ID NOs:11 ó 12.

<400> 18

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Este fragmento corresponde a los residuos 24-38 (lineales) de, por ejemplo,

FIG. 31.

<400> 19

Lys Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Lys Ser Leu Met His
1 5 10 15

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Este fragmento corresponde a los residuos 54-60 (lineales) de, por ejemplo,

FIG. 31.

<400> 20

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Este fragmento corresponde a los residuos 93-101 (lineales) de, por ejemplo, FIG. 31.

<400> 21

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Trp Thr
1 5

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Este fragmento corresponde a los residuos 30-35 (lineales) de, por ejemplo, FIG. 30.

<400> 22

Ile Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 23

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Este fragmento corresponde a los residuos 50-65 (lineales) de, por ejemplo, FIG. 30.

<400> 23

Ser Ile Ser Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Este fragmento corresponde a los residuos 98-107 (lineales) de, por ejemplo, FIG. 30.

<400> 24

Leu Asp Gly Tyr Tyr Phe Gly Phe Ala Tyr
1 5 10 15

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia minima del núcleo de CDR

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Este fragmento corresponde a los residuos 24-38 (lineales) de, por ejemplo, FIG. 31; también corresponde a la SEQ ID NO:19.

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(7)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produzca en forma natural

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produzca en forma natural

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(15)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produzca en forma natural

<400> 25

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Tyr Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia mínima de CDR del núcleo

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Este fragmento corresponde a los residuos 54-60 (lineales) de, por ejemplo, FIG. 31; también corresponde a la SEQ ID NO:20.

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(7)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produzca en forma natural

<400> 26

Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia mínima de CDR del núcleo

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Este fragmento corresponde a los residuos 93-101 de, por ejemplo, FIG. 31; también corresponde a la SEQ ID NO:21.

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produzca en forma natural

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produzca en forma natural

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produzca en forma natural

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produzca en forma natural

<400> 27

Xaa Xaa Xaa Asn Xaa Asp Xaa Trp Xaa
1 5

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia mínima de CDR del núcleo

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Este fragmento corresponde a los residuos 30-35 de, por ejemplo, FIG. 30; también corresponde a SEQ ID NO:22.

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produzca en forma natural

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produzca en forma natural

<400> 28

Ile Ser Xaa Ala Xaa Xaa

1 5

<210> 29

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia mínima de CDR del núcleo

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Este fragmento corresponde a los residuos 50-65 (lineales) de, por ejemplo, FIG. 30; también corresponde a la SEQ ID NO:23.

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produzca en forma natural

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(9)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produzca en forma natural

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(16)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produzca en forma natural

<400> 29

Ser Xaa Ser Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia mínima de CDR del núcleo

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Este fragmento corresponde a los residuos 98-107 (lineales) de, por ejemplo, FIG. 30; también corresponde a la SEQ ID NO:24.

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(10)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produzca en forma natural

<400> 30

Leu Asp Gly Tyr Tyr Phe Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 31

<211> 132

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Met Ala Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly
1 5 10 15

Phe Ala Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu
20 25 30

Ile Glu Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys
35 40 45

Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys
50 55 60

Ala Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu
65 70 75 80

Lys Thr Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala
85 90 95

Gly Gln Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala
100 105 110

Gln Phe Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu
115 120 125

Gly Arg Phe Asn
130

<210> 32

<211> 132

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> mat_péptido

<222> (21)..(132)

<400> 32

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

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

Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala Leu
35 40 45

Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr Gln
50 55 60

Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln Phe
65 70 75 80

Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe Val
85 90 95

Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Arg Phe
100 105 110

Asn

<210> 33

<211> 333

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cadena liviana del anticuerpo totalmente humanizado

<400> 33

gacatcgtgc tcactcagtc tccagcttct ttggctgtgt ctccagggca gagggccacc 60

ataacctgca aagccagtga aagtgttgat aattatggca aaagtttaat gcactggtac 120

cagcagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc gtgcatccaa cctagaatct 180

ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccattaat 240

cctgtggagg ctaatgatac tgcaaactat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtgg 300

acgttcggtg gagggaccaa ggtggaaata aaa 333

<210> 34

<211> 354

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cadena pesada del anticuerpo totalmente humanizado

<400> 34

gaggtccagc tggtggagtc agggggaggc ttagtgaaac ctggagggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcatt agctatgcca tgtcttgggt tcgtcaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagtg gtggtaacac ctactatcca 180

gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagataatg ccaagaacag cctatacctg 240

caaatgaaca gtctgagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcacg acttgatggt 300

tactactttg gatttgctta ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 35

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena liviana del anticuerpo totalmente humanizado

<400> 35

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

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

Gly Lys Ser Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
65 70 75 80

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

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 36

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena pesada del anticuerpo totalmente humanizado

<400> 36

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ile Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Ser Ile Ser Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Leu Asp Gly Tyr Tyr Phe Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 37

<211> 427

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Met Glu Trp Pro Ala Arg Leu Cys Gly Leu Trp Ala Leu Leu Leu Cys
1 5 10 15

Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Pro Thr Glu Thr Gln
20 25 30

Pro Pro Val Thr Asn Leu Ser Val Ser Val Glu Asn Leu Cys Thr Val
35 40 45

Ile Trp Thr Trp Asn Pro Pro Glu Gly Ala Ser Ser Asn Cys Ser Leu
50 55 60

Trp Tyr Phe Ser His Phe Gly Asp Lys Gln Asp Lys Lys Ile Ala Pro
65 70 75 80

Glu Thr Arg Arg Ser Ile Glu Val Pro Leu Asn Glu Arg Ile Cys Leu
85 90 95

Gln Val Gly Ser Gln Cys Ser Thr Asn Glu Ser Glu Lys Pro Ser Ile
100 105 110

Leu Val Glu Lys Cys Ile Ser Pro Pro Glu Gly Asp Pro Glu Ser Ala
115 120 125

Val Thr Glu Leu Gln Cys Ile Trp His Asn Leu Ser Tyr Met Lys Cys
130 135 140

Ser Trp Leu Pro Gly Arg Asn Thr Ser Pro Asp Thr Asn Tyr The Leu
145 150 155 160

Tyr Tyr Trp His Arg Ser Leu Glu Lys Ile His Gln Cys Glu Asn Ile
165 170 175

Phe Arg Glu Gly Gln Tyr Phe Gly Cys Ser Phe Asp Leu Thr Lys Val
180 185 190

Lys Asp Ser Ser Phe Glu Gln His Ser Val Gln Ile Met Val Lys Asp
195 200 205

Asn Ala Gly Lys Ile Lys Pro Ser Phe Asn Ile Val Pro Leu Thr Ser
210 215 220

Arg Val Lys Pro Asp Pro Pro His Ile Lys Asn Leu Ser Phe His Asn
225 230 235 240

Asp Asp Leu Tyr Val Gln Trp Glu Asn Pro Gln Asn Phe Ile Ser Arg
245 250 255

Cys Leu Phe Tyr Glu Val Glu Val Asn Asn Ser Gln Thr Glu Thr His
260 265 270

Asn Val Phe Tyr Val Gln Glu Ala Lys Cys Glu Asn Pro Glu Phe Glu
275 280 285

Arg Asn Val Glu Asn Trh Ser Cys Phe Met Val Pro Gly Val Leu Pro
290 295 300

Asp Thr Leu Asn Thr Val Arg Ile Arg Val Lys Thr Asn Lys Leu Cys
305 310 315 320

Tyr Glu Asp Asp Lys Leu Trp Ser Asn Trp Ser Gln Glu Met Ser Ile
325 330 335

Gly Lys Lys Arg Asn Ser Thr Leu Tyr Ile Thr Met Leu Leu Ile Val
340 345 350

Pro Val Ile Val Ala Gly Ala Ile Ile Val Leu Leu Leu Tyr Leu Lys
355 360 365

Arg Leu Lys Ile Ile Ile Phe Pro Pro Ile Pro Asp Pro Gly Lys Ile

370 375 380

Phe Lys Glu Met Phe Gly Asp Gln Asn Asp Asp Thr Leu His Trp Lys
385 390 395 400

Lys Tyr Asp Ile Tyr Glu Lys Gln Thr Lys Glu Glu Thr Asp Ser Val
405 410 415

Val Leu Ile Glu Asn Leu Lys Lys Ala Ser Gln
420 425