



OPS



Organización y
Digitalización CSA Ltda

OK
DST

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



PCT

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

09-19665

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO **"PROTEÍNAS DE UNIÓN A INTERLEUCINA-13"**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **C07K 14/00**

71. SOLICITANTE **ABBOTT LABORATORIES**

DOMICILIO **ABBOTT PARK, ESTADO DE ILLINOIS,**
ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

74. REPRESENTANTE LEGAL **ALICIA LLOREDA RICAURTE**
T.P. 53.215

BOGOTÁ, D.C.

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-019665- -00000-0000

Fecha: 2009-02-26 16:05:26
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 NUECREACIONE
Eve: 379 FASENACIONALII
Folios: 248

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Capítulo I.

☒ Capítulo II.

②

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: **ABBOTT LABORATORIES**

Dirección: 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064, Estados Unidos de América.

Nacionalidad o Domicilio: Abbott Park, Estado de Illinois, Estados Unidos de América.

Lugar de Constitución: Estado de Illinois, Estados Unidos de América.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º, Bogotá, Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

**INVENTOR(ES)
(72)**

Nombre: WU, Chengbin; DIXON, Richard, W.; BELK, Jonathan, P.; YING, Hua; ARGIRIADI, Maria, A.; CUFF, Carolyn, A.; HINTON, Paul, R.; KUMAR, Shankar; MELIM, Terry, L. y CHEN, Yan.

Dirección: 386 Prospect Street, Shrewsbury, MA 01545; 19 Nottingham Drive, Jefferson, MA 01522; 89 Beaman Road, Sterling, MA 01564; 15 Tyler Drive, Holden, MA 01520; 273 Main Street, Wayland, MA 01778; 23 Elliot Trail, Grafton, MA 01519; 321 Dunsmuir Terrace #4, Sunnyvale, CA 94085; 3930 Kral Place, Pleasanton, CA 94588; 16b Sunnyside Lane, Derry, NH 03038 y 4861 Central Avenue, Apt. 201, Fremont, CA 94536.

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2007/019660

Fecha: 07/09/07

Publicación Internacional No. WO 2008/127271 A2

Fecha: 23/10/08

⑥

Título (54)

"PROTEÍNAS DE UNIÓN A INTERLEUCINA-13"

⑦

Clasificación Internacional (51) C07K 14/00

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

08/09/06

(31) Número de Solicitud

60/843,249

⑨

Comprobante de Pago No. 09-8,272

Fecha: 3 de Febrero de 2009

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones)
- ☐ 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.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: publicación y listado de secuencias.

11

FIGURA CARACTERISTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713

T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-019665- -00000-0000

Fecha: 2009-02-26 16:05:26 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 248

LIBRO OFICIAL DE CAJA : 09 - 8,272
CHA : FEBRERO 3 DE 2009

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLORED Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	10530343	03/02/2009	5,640,000.00

***** CONCEPTO *****

CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN
	TOTAL : \$ 540,000.00

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores ALICIA LLOREDADA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.



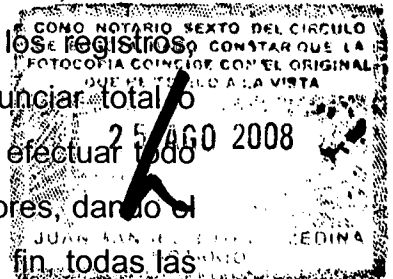
ALICIA LLOREDADA RICAURTE

T.P. No. 53.215

TRADUCCION OFICIAL No. 2008-05-16-324
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

Los abajo firmados, **ABBOTT LABORATORIES**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes del Estado de Illinois, Estados Unidos de América, con domicilio en 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064 USA nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes y los registros; presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses; y adicionalmente quedan facultados para tomar intervención como demandantes o



demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir, conciliar y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

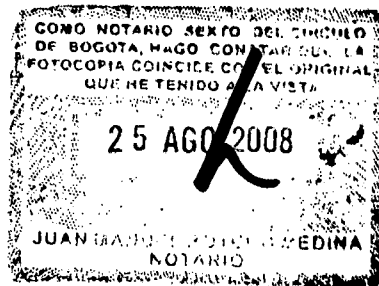
Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado el 12 de julio de 2004

(firma: ilegible)

Laura J. Schumacher

Vicepresidente, Secretaria y Asesor Legal General Asistente



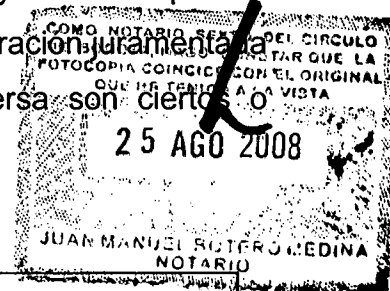
CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Estados Unidos de América)
Estado de) ss:
Condado de)

En este día 12 de julio de 2004, compareció Laura J. Schumacher, a quien conozco y de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que ella es la Vicepresidenta, Secretaria y Asesora de ABBOTT LABORATORIES, la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes del Estado de Illinois, Estados Unidos de América, domiciliada en la ciudad de Abbott Park, Condado de Lake, Estado de Illinois, Estados Unidos de América, legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social conforme a las leyes del Estado de Illinois, Estados Unidos de América; que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en Chicago, Estado de Illinois, con fecha 12 de septiembre de 2003, y certifica que de conformidad con la legislación de dicho Estado la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

(firma: ilegible)
Notario Público



SELLO OFICIAL
Trina Lee Ruiz
Notario Público, Estado de Illinois
Mi Comisión Expira el 6-11-2007

Estado de Illinois
Secretario de Estado
Springfield, Illinois

Apostilla

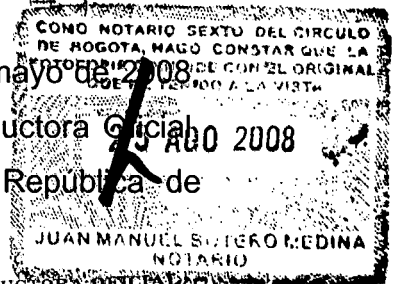
(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
- Este documento público
3. ha sido firmado por Trina Lee Ruiz
3. actuando como Notario Público, Condado de Lake
4. lleva el sello/estampilla del Estado de Illinois

Certificado

5. en Springfield, Illinois
6. el día 20 de julio de 2004
7. por el Secretario de Estado, Estado de Illinois
8. No. S04VB11001
9. Sello/Estampilla
10. Firma (ilegible)
- Jesse White
- Secretario de Estado
- Estado de Illinois

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 16 de mayo de 2008
en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial,
Res. 2177 del 15 de agosto de 1989, Ministerio de Justicia, República de
Colombia.



TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA
Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

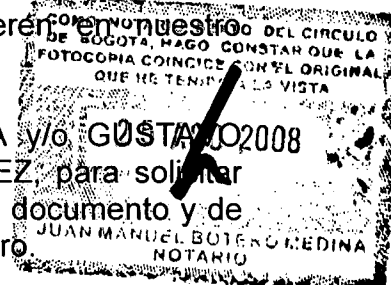
Los abajo firmados, **ABBOTT LABORATORIES**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes del Estado de Illinois, Estados Unidos de América,

con domicilio en 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064 USA

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes y los registros, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y adicionalmente quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir, conciliar y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.



Dado y firmado el 12 de Julio de 2004

The undersigned, **ABBOTT LABORATORIES**, a corporation organized and existing under the laws of the State of Illinois, United States of America,

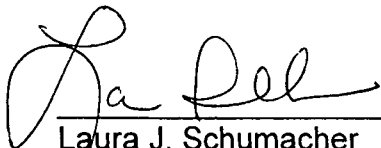
domiciled at 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064 USA

hereby appoint, ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

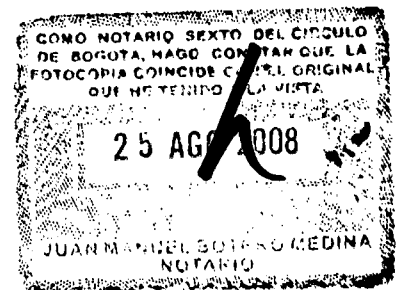
Doctors ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications and registrations, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and additionally we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to conciliate, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this 12th day of July, 2004



Laura J. Schumacher
Vice President, Secretary and Deputy General
Counsel



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Estados Unidos de América
 Estado de {ss
 Condado de
 Hoy 12 de Julio de 2004, compareció
 Laura J. Schumacher, a quien conozco y
 de quien me consta que firmó el anterior documento,
 y quien debidamente juramentado declaró y dijo que
 éles Vice Presidenta, Secretaria y Asesora
 de ABBOTT

LABORATORIES, la compañía nombrada en el
 documento que antecede, una sociedad
 debidamente organizada y existente conforme a las
 leyes del Estado de Illinois, Estados
 Unidos de América, domiciliada en la ciudad de
 Abbott Park, Condado de Lake
 Estado de Illinois, Estados Unidos de
 América, legalmente constituida para un período de
 duración que aún no ha terminado, que ejerce su
 objeto social conforme a las leyes del Estado de
 Illinois, Estados Unidos de América;
 que el declarante está autorizado por dicha
 Compañía para conferir este poder; que el sello
 estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en
 representación de la expresada Compañía, es el
 sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se
 confiere este instrumento está comprendido dentro
 del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de
 incorporación firmados en Chicago
 Estado de Illinois, con fecha Sep. 12, 2003,
 y certifica que de conformidad con la legislación de
 dicho Estado la anterior declaración juramentada es
 prueba suficiente de que los hechos sobre que ella
 versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

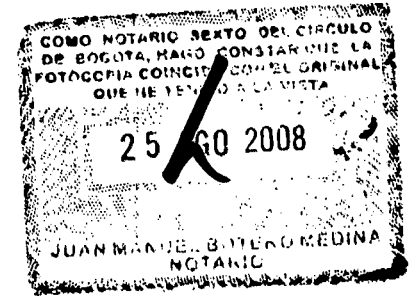
United States of America
 State of {ss
 County of
 On this 12th day of July, 2004,
 personally
 came
 to me known, and known to me to be the person who
 signed the foregoing instrument, who being by me
 duly sworn did depose and say that he is the Vice President
 Secretary and Deputy
 General Counsel
 of ABBOTT

LABORATORIES, the company named within, a
 Corporation organized and existing under the laws of
 the State of Illinois, United
 States of America, domiciled at the City of Abbott Park
 County of Lake

State of Illinois, United States of America,
 legally constituted for a period of tenure not yet
 expired, which exercises its corporate purposes
 according to the laws of the State of Illinois,
 United States of America; that the deponent is
 authorized by said Company to confer this power of
 attorney; that the seal affixed hereunto by the
 deponent in the name and on behalf of said
 Corporation is the corporate seal thereof; and that the
 purpose for which this instrument is granted is
 included within the corporate purposes of the
 Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles
 of Incorporation of said Corporation executed at
 Chicago, State of Illinois, under date of
 September 12, 2003, and hereby
 certifies that under the laws of said State the
 foregoing acknowledgment is sufficient proof that the
 facts therein contained are true, which he attests.

[Handwritten Signature]





SPRINGFIELD, ILLINOIS

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
- This public document
2. has been signed by TRINA LEE RUIZ
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC, LAKE COUNTY
4. bears the seal/stamp of STATE OF ILLINOIS

Certified

5. Springfield, Illinois
6. JULY 20, 2004
7. by the Secretary of State, State of Illinois

8. No. S04VB11001

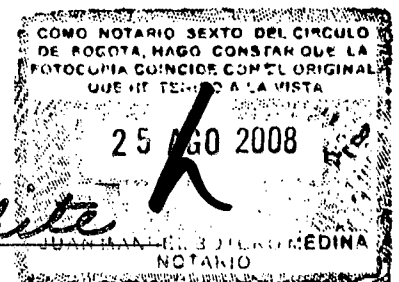
9. Seal/Stamp:

10. Signature:



Jesse White

JESSE WHITE
SECRETARY OF STATE
STATE OF ILLINOIS



(21) N° de solicitud:				(51) Int Cl: C07K 14/00
(22) Fecha de solicitud: 26-02-09				(71) Solicitante(s): ABBOTT LABORATORIES
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País	(72) Inventor(es): WU, Chengbin; DIXON, Richard, W.; BELK, Jonathan, P.; YING, Hua; ARGIRIADI, Maria, A.; CUFF, Carolyn, A.; HINTON, Paul, R.; KUMAR, Shankar; MELIM, Terry, L. y CHEN, Yan.
	60/843,249	08-09-06	US	(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 08-04-09				(87) Publicación internacional
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT				Fecha: 23-10-08
Fecha de presentación de la solicitud: 07-09-07				N° publicación: WO 2008/127271 A2
No. de solicitud: PCT/US2007/019660				
(54) Titulo: PROTEÍNAS DE UNIÓN A INTERLEUCINA-13				

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1.-

Una proteína de unión que comprende un dominio de unión a antígeno, siendo dicha proteína de unión capaz de unirse a IL- 13, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de:

CDR-H1. X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇ (ID de SEC No: 64), en donde;

X₁ es T, D, G, o S;

X₂ es S;

X₃ es D;

X₄ es M, S, Y, L, o H;

X₅ es G, W, Y, A, S, o N;

X₆ es V, I, o M; y

X₇ es D, H, S, Y, N, o G;

CDR- H2. X₁-X₂-X₃-X₄- X₅- X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-X₁₅-X₁₆-X₁₇

(ID de SEC No: 65), en donde;

X₁ es M, E, H, R, S, G, o L;

X₂ es I o no está presente;

X₃ es H, Y, A, D, S, o W;

X₄ es P, S, W, o G;

X₅ es S, G, E, o D;

X₆ es D, G, S, E, o N;

X₇ es S, Y o G;

X₈ es E, N, Y, V, o R;

X₁₂ es Q;

X₁₃ es K, F, N, E, o S;

X₁₄ es N, T, o S;

X₁₅ es Y, o F;

X₁₆ es L, A, o M; y

X₁₇ es A, D, E, H, o N

CDR-L2. X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇ (ID de SEC No: 68), en donde;

X₁ es L, S, K, T, W, o Y;

X₂ es V, T, o A;

X₃ es S, o N;

X₄ es N, K, T, M, o R;

X₅ es R, K, o L;

X₆ es F, D, E, H, P, o A; y

X₇ es S, R, o P;

y

CDR-L3. X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉ (ID de SEC No: 69), en donde;

X₁ es F, W, Q o A;

X₂ es Q o L;

X₃ es H, G, Y, W, o N;

X₄ es N, S, T, L, o Y;

X₅ es Y, T, S, E, o H;

X₆ es L, V, F, Y, N, G, P, o D;

X₇ es P, o, H;

X₈ es L, F, Y, W, o R; y

X₉ es T, o V.

PATENTE DE INVENCION ____ PCT X MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud: 26-02-09

(51) Clasificación Internacional: C07K 14/00

(71) Solicitante(s): **ABBOTT LABORATORIES**

(72) Inventor(es): WU, Chengbin; DIXON, Richard, W.; BELK, Jonathan, P.; YING, Hua; ARGIRIADI, Maria, A.; CUFF, Carolyn, A.; HINTON, Paul, R.; KUMAR, Shankar; MELIM, Terry, L. y CHEN, Yan.

(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(30) Prioridad	(31) <i>No. Prioridad</i>	(32) <i>Fecha</i>	(33) <i>País</i>
	60/843,249	08-09-06	US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 08-04-09

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: **23-10-08**

Fecha de presentación de la solicitud: 07-09-07

N° publicación: **WO 2008/127271 A2**

No. de solicitud: **PCT/US2007/019660**

(54) Título: **PROTEÍNAS DE UNIÓN A INTERLEUCINA-13**

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
23 October 2008 (23.10.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/127271 A2

(51) International Patent Classification:

C07K 14/00 (2006.01) C12N 5/04 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01) C12N 1/15 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01) C12N 5/06 (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01) C12N 1/16 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) C12P 21/00 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

94085 (US). KUMAR, Shankar [US/US]; 3930 Kral Place, Pleasanton, CA 94588 (US). MELIM, Terry, L. [US/US]; 16b Sunnyside Lane, Derry, NH 03038 (US). CHEN, Yan [CN/US]; 4861 Central Avenue, Apt. 201, Fremont, CA 94536 (US).

(21) International Application Number:

PCT/US2007/019660

(22) International Filing Date:

7 September 2007 (07.09.2007)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

60/843,249 8 September 2006 (08.09.2006) US

(71) Applicant (for all designated States except US): ABBOTT LABORATORIES [US/US]; 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): WU, Chengbin [CN/US]; 386 Prospect Street, Shrewsbury, MA 01545 (US). DIXON, Richard, W. [US/US]; 19 Nottingham Drive, Jefferson, MA 01522 (US). BELK, Jonathan, P. [US/US]; 89 Beaman Road, Sterling, MA 01564 (US). YING, Hua [US/US]; 15 Tyler Drive, Holden, MA 01520 (US). ARGIRIADI, Maria, A. [US/US]; 273 Main Street, Wayland, MA 01778 (US). CUFF, Carolyn, A. [US/US]; 23 Elliot Trail, Grafton, MA 01519 (US). HINTON, Paul, R. [US/US]; 321 Dunsmuir Terrace #4, Sunnyvale, CA

(74) Agents: SESHADRI, Tara et al.; Abbott Bioresearch Center, 100 Research Drive, Worcester, MA 01605-4314 (US).

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

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, 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
- with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

(54) Title: INTERLEUKIN -13 BINDING PROTEINS

(57) Abstract: The present invention encompasses IL- 13 binding proteins. Specifically, the invention relates to antibodies that are chimeric, CDR grafted and humanized antibodies. Preferred antibodies have high affinity for hIL-13 and neutralize hIL-13 activity in vitro and in vivo. An antibody of the invention can be a full-length antibody or an antigen-binding portion thereof. Method of making and method of using the antibodies of the invention are also provided. The antibodies, or antibody portions, of the invention are useful for detecting hIL-13 and for inhibiting hIL-13 activity, e.g., in a human subject suffering from a disorder in which hIL-13 activity is detrimental.

WO 2008/127271 A2

PROTEÍNAS DE UNIÓN A INTERLEUCINA-13

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

- 5 La presente invención abarca proteínas de unión a IL-13. Específicamente, la invención se relaciona con anticuerpos que son quiméricos, tienen injertos de CDR y anticuerpos humanizados. Los anticuerpos preferidos tienen alta afinidad por hIL-13 y neutralizan la actividad de hIL-13 *in vitro* e *in vivo*. Un anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo de longitud total o una porción de unión a
- 10 antígeno del mismo. También se provee el método para hacer y el método para usar los anticuerpos de la invención. Los anticuerpos, o porciones de anticuerpo, de la invención son útiles para detectar hIL-13 y para inhibir la actividad de hIL-13, e.g., en un sujeto humano que sufre de un trastorno en el cual la actividad de hIL-13 es perjudicial.

15

17

PROTEÍNAS DE UNIÓN A INTERLEUCINA-13

Referencia cruzada a la solicitud relacionada

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de U.S. 60/843,249 presentada en Septiembre 8, 2006.

5 Campo de la Invención

La presente invención se relaciona con proteínas de unión a IL-13, y específicamente con sus usos en la prevención y/o tratamiento de diversas enfermedades incluyendo asma, alergia, EPOC, fibrosis y cáncer.

Referencia al acuerdo de investigación conjunta

- 10 Los contenidos de esta solicitud se encuentran bajo un acuerdo de investigación conjunta suscrito por y entre Protein Design Labs, Inc. y Abbott Laboratories en Diciembre 14, 2005, y dirigida a anticuerpos modificados mediante ingeniería recombinante a IL-13.

Antecedentes de la Invención

- 15 La IL-13 humana es una glicoproteína de 17 kDa clonada a partir de células T activadas (Zurawski y de Vries 1994, Immunol Today 15 19-26), y es producida por células T activadas del linaje Th2, aunque las células T CD4+ Th0 y Th1, células T CD8+, y varias poblaciones de células no T tales como mastocitos también producen IL-13 (Zurawski y de Vries 1994, Immunol Today 15 19-26). La
- 20 función de IL-13 incluye el cambio del isotipo de inmunoglobulina a IgE en células B humanas (Punnonen, Aversa y cols. 1993 Proc Natl Acad Sci USA 90 3730-4) y la supresión de la producción de citoquinas inflamatorias en humanos y ratones (de Waal Malefyt, Figdor y cols. 1993 J Immunol 151 6370-81; Doherty, Kastelein y cols. 1993 J Immunol 151 7151-60). La IL-13 se une a sus receptores de
- 25 superficie celular, IL-13Ralfa1 e IL-13Ralfa2. El IL-13Ralfa1 interactúa con la IL-13 con baja afinidad (KD ~10nM), seguida del reclutamiento de IL-4Ra para formar el complejo receptor heterodimérico de señalización de alta afinidad (KD~0.4nM) (Aman, Tayebi y cols. 1996 J Biol Chem 271 29265-70; Hilton, Zhang y cols. 1996 Proc Natl Acad Sci USA 93 497-501). El complejo IL-4R/IL13Ralpha1 se expresa
- 30 en muchos tipos celulares tales como células B, monocito/macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, basófilos, fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales de las vías aéreas, y células del musculo liso de las vías aéreas (Graber, Gretener y cols. 1998 Eur J Immunol 28 4286-98; Murata, Husain y cols. 1998 Int Immunol 10 1103-10; Akaiwa, Yu y cols. 2001 Cytokine 13 75-84).

Cuando se liga el complejo receptor IL-13R α 1/IL-4R el resultado es la activación de una variedad de vías de transducción de señal incluyendo el transductor de señal y el activador de transcripción (STAT6) y las vías de sustrato-2 receptor de insulina (IRS-2) (Wang, Michieli y cols. 1995 Blood 86 4218-27; Takeda, Kamanaka y cols. 1996 J Immunol 157 3220-2). La cadena IL-13R α 2 por sí sola, tiene una alta afinidad (KD~0.25-0.4nM) a IL-13, y funciona como un receptor señuelo que regula negativamente la unión a IL-13 (Donaldson, Whitters y cols. 1998 J Immunol 161 2317-24), y como un receptor de señalización que induce la síntesis de TGF- β y la fibrosis por la vía AP-1 en macrófagos y posiblemente otros tipos celulares (Fichtner-Feigl, Strober y cols. 2006 Nat Med 12 99-106).

Diversos estudios realizados en modelos animales preclínicos para el asma, indican que la IL-13 juega un papel importante en el asma. Estos datos incluyen resistencia al asma en ratones knock-out de IL-13 así como la inhibición del fenotipo del asma con antagonistas de IL-13 (receptores solubles de IL-13, mAbs anti IL-13, etc.) en varios modelos de ratón (Sela 1999 Harefuah 137 317-9; Wills-Karp y Chiaramonte 2003 Curr Opin Pulm Med 9 21-7; Wills-Karp 2004 Immunol Rev 202 175-90). Múltiples estudios han demostrado que la administración farmacológica de IL-13 recombinante a los pulmones de los ratones así como de conejillos de indias induce hiper-secreción de moco en las vías aéreas, eosinofilia y AHR¹ (Grunig, Warnock y cols. 1998 Science 282 2261-3; Wills-Karp, Luyimbazi y cols. 1998 Science 282 2258-61; Kibe, Inoue y cols. 2003 Am J Respir Crit Care Med 167 50-6; Vargaftig y Singer 2003 Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 284 L260-9; Vargaftig y Singer 2003 Am J Respir Cell Mol Biol 28 410-9). Estos efectos de la IL-13 se reproducen en sistemas de ratones transgénicos con expresión constitutiva o inducible de IL-13 (Zhu, Homer y cols. 1999 J Clin Invest 103 779-88; Zhu, Lee y cols. 2001 Am J Respir Crit Care Med 164 S67- 70; Lanone, Zheng y cols. 2002 J Clin Invest 110 463-74). La sobre expresión crónica transgénica de IL-13 también induce fibrosis subepitelial y enfisema. Los ratones deficientes en la molécula de señalización STAT6 de IL-13 (y de IL-4) no desarrollan AHR inducida por alérgeno ni sobreproducción de moco (Kuperman, Huang y cols. 2002 Nat Med 8 885-9). Los estudios que utilizan la proteína de fusión al receptor de IL-13 (sIL-13R α 2Fc) han demostrado el papel de gran importancia de esta citoquina en la enfermedad de las vías aéreas inducida por el alérgeno ovoalbúmina (OVA) experimental (Grunig, Warnock y cols. 1998 Science

¹ AHR, por las siglas en ingles de hiperreactividad de las vías aéreas

282 2261-3; Wills-Karp, Luyimbazi y cols. 1998 Science 282 2258-61; Taube, Duez y cols. 2002 J Immunol 169 6482-9). También se demostró la eficacia del tratamiento con anti- IL-13 en un modelo crónico de asma murino. Además de las características exhibidas de la hipersecreción de moco y AHR, este modelo de asma crónica demuestra varias marcaciones típicas de la enfermedad humana que no se presentan en los modelos más agudos. Éstas incluyen eosinofilia del tejido pulmonar localizado en espacios interepiteliales así como fibrosis del músculo liso medida mediante los incrementos en la deposición de colágeno. El modelo de asma crónica se induce con desafíos repetidos de aerosol con OVA en ratones sensibilizados a OVA 1x/semana para un total de 4 semanas. El anticuerpo anti-IL-13 administrado durante las 2 semanas finales de los desafíos con OVA (a partir del día 36 con lecturas de eficacia evaluadas en el día 53 del estudio) inhibió significativamente la AHR, la inflamación pulmonar, la hiperplasia de células calciformes, la hipersecreción de moco, y la fibrosis de las vías aéreas (Yang, Li y cols. 2005 J Pharmacol Exp Ther). Adicionalmente, el efecto terapéutico del antagonista de IL-13 también demostró la inhibición de AHR en un modelo primate de asma [Abstract, American Thoracic Society 2005].

Se ha implicado a la IL-13 en la patogénesis del asma humana dado que se han detectado niveles elevados de mRNA de IL-13 y proteína en los pulmones de pacientes asmáticos, lo que se correlaciona con la severidad de la enfermedad (Huang, Xiao y cols. 1995 J Immunol 155 2688-94). Adicionalmente, los polimorfismos genéticos de la IL-13 humana, que llevan a niveles elevados de IL-13, se han identificado y están asociados con asma y atopía (Heinzmann, Mao y cols. 2000 Hum Mol Genet 9 549-59; Hoerauf, Kruse y cols. 2002 Microbes Infect 4 37-42; Vercelli 2002 Curr Opin Allergy Clin Immunol 2 389-93; Heinzmann, Jerkic y cols. 2003 J Allergy Clin Immunol 112 735-9; Chen, Ericksen y cols. 2004 J Allergy Clin Immunol 114 553-60; Vladich, Brazille y cols. 2005 J Clin Invest), y se han detectado niveles elevados de IL-13 en los pulmones de pacientes con asma (Huang, Xiao y cols. 1995 J Immunol 155 2688-94; Arima, Umeshita-Suyama y cols. 2002 J Allergy Clin Immunol 109 980-7; Berry, Parker y cols. 2004 J Allergy Clin Immunol 114 1106-9). También se ha demostrado un vínculo genético entre la IL-13 y el asma puesto que individuos con un polimorfismo en el gen de IL-13 que causa niveles mayores de IL-13 en plasma tienen un riesgo incrementado de atopía y asma (Wills-Karp 2000 Respir Res 1 19-23).

Debido al papel de la IL-13 humana en una variedad de trastornos humanos, se han diseñado estrategias terapéuticas para inhibir o contrarrestar la actividad de la IL-13. En particular, se han buscado los anticuerpos que se unen a, y

neutralizan la IL-13, como un medio para inhibir la actividad de la IL-13. Sin embargo, existe una necesidad en el estado del arte de anticuerpos mejorados capaces de unirse a la IL-13. Preferiblemente los anticuerpos se unen a IL-13. Preferiblemente los anticuerpos son capaces de neutralizar la IL-13 humana. La presente invención provee una novedosa familia de proteínas de unión, anticuerpos con injertos de CDR, anticuerpos humanizados, y fragmentos de los mismos, capaces de unirse a IL-13 humana, unirse con alta afinidad, y unirse y neutralizar la IL-13 humana.

Resumen de la Invención

Esta invención se relaciona con proteínas de unión a IL-13. Las proteínas de unión de las invenciones incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, porciones de unión a antígeno, y otras proteínas de unión a antígeno capaces de unirse a la IL-13 humana. Adicionalmente, la invención provee métodos para hacer y usar las proteínas de unión a IL-13.

Un aspecto de la invención se relaciona con una proteína de unión capaz de unirse a IL-13. En una realización preferida, la proteína de unión se une a IL-13 humana. Preferiblemente la proteína de unión es capaz de modular una función biológica de IL-13. Más preferiblemente la proteína de unión es capaz de neutralizar la IL-13.

En un aspecto de la invención, la proteína de unión es capaz de unirse a IL-13, y prevenir la unión de IL-13 al receptor IL-13 α 1. En otro aspecto de la invención, la proteína de unión es capaz de unirse a IL-13, y prevenir la unión de IL-13 al receptor IL-13 α 2. En una realización preferida, la proteína de unión es capaz de unirse a IL-13 y, prevenir la unión de IL-13 tanto al receptor IL-13 α 1 como al receptor IL-13 α 2.

Una realización of la invención provee un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a la IL-13 humana e inhibe la unión de dicha IL-13 al receptor IL-13 α 2 en un ensayo de unión basado en superficie celular con un IC₅₀ seleccionado del grupo que consiste de aproximadamente 1.5×10^{-8} a 1×10^{-8} M, 1×10^{-8} a 1×10^{-9} M, 10^{-9} a 10^{-10} M y 10^{-10} a 10^{-11} M o en un ensayo de unión a receptor basado en ELISA con un IC₅₀ seleccionado del grupo que consiste de aproximadamente 1.8×10^{-8} a 1×10^{-8} M, 1×10^{-8} a 1×10^{-9} M, 10^{-9} a 10^{-10} M y 10^{-10} a 10^{-11} M. Preferiblemente el anticuerpo se une a IL-13 humana e inhibe la unión de dicha IL-13 al receptor IL-13 α 2 en un ensayo de unión a receptor basado en

superficie celular con un IC_{50} de 2.7×10^{-9} M y en un ensayo de unión a receptor basado en ELISA con un IC_{50} of 1.1×10^{-9} M. Preferiblemente el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a IL-13 e inhibe la unión de dicha IL-13 al receptor IL-13 α 2 en un ensayo de unión a receptor basado en superficie celular o en un ensayo de unión a receptor basado en ELISA en aproximadamente 70-100% a una concentración de 100nM. Preferiblemente el anticuerpo es 13C5.5. Más preferiblemente el anticuerpo no es BAK502G9, mAb13.2 o MJ2-7.

En otro aspecto, la invención provee un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a IL-13 humana e inhibe la AHR en aproximadamente 50 %, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% en un modelo de asma inducida por IL-13 humana. Preferiblemente, el anticuerpo inhibe la AHR en más del 86% en un modelo de asma inducida por IL-13 humana. En otra realización, el anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une a IL-13 humana e inhibe la AHR en aproximadamente 50 %, 60%, 70%, 80% 90% o 100% e inhibe la producción de moco en aproximadamente 40%, 50 %, 60%, 70%, 80% 90% o 100% en un modelo de asma inducida por IL-13 humana. Preferiblemente el anticuerpo es 13C5.5. Más preferiblemente el anticuerpo no es BAK502G9, mAb13.2 o MJ2-7.

En una realización, la proteína de unión tiene una constante de velocidad de asociación (k_{on}) a IL-13 de por lo menos aproximadamente $10^2 M^{-1}s^{-1}$; por lo menos aproximadamente $10^3 M^{-1}s^{-1}$; por lo menos aproximadamente $10^4 M^{-1}s^{-1}$; por lo menos aproximadamente $10^5 M^{-1}s^{-1}$; or por lo menos aproximadamente $10^6 M^{-1}s^{-1}$, medida por resonancia de plasmon de superficie. Preferiblemente, la proteína de unión de la invención tiene una constante de velocidad de asociación (k_{on}) a IL-13 entre $10^2 M^{-1}s^{-1}$ y $10^3 M^{-1}s^{-1}$; entre $10^3 M^{-1}s^{-1}$ y $10^4 M^{-1}s^{-1}$; entre $10^4 M^{-1}s^{-1}$ y $10^5 M^{-1}s^{-1}$; o entre $10^5 M^{-1}s^{-1}$ y $10^6 M^{-1}s^{-1}$, medida por resonancia de plasmon de superficie.

En otra realización, la proteína de unión de la invención tiene una constante de velocidad de disociación (k_{off}) a IL-13 de máximo aproximadamente $10^{-3}s^{-1}$; máximo aproximadamente $10^{-4}s^{-1}$; máximo aproximadamente $10^{-5}s^{-1}$; o máximo aproximadamente $10^{-6}s^{-1}$, medida por resonancia de plasmon de superficie. Preferiblemente, la proteína de unión de la invención tiene una constante de

velocidad de disociación (k_{off}) a IL-13 de 10^{-3}s^{-1} a 10^{-4}s^{-1} ; de 10^{-4}s^{-1} a 10^{-5}s^{-1} ; o de 10^{-5}s^{-1} a 10^{-6}s^{-1} medida por resonancia de plasmon de superficie.

En otra realización, la proteína de unión de la invención tiene una constante de disociación (K_D) a IL-13 de máximo aproximadamente 10^{-7}M ; máximo aproximadamente 10^{-8}M ; máximo aproximadamente 10^{-9}M ; máximo aproximadamente 10^{-10}M ; máximo aproximadamente 10^{-11}M ; máximo aproximadamente 10^{-12}M ; o máximo aproximadamente 10^{-13}M . Preferiblemente, la proteína de unión de la invención tiene una constante de disociación (K_D) a IL-13 de 10^{-7}M a 10^{-8}M ; de 10^{-8}M a 10^{-9}M ; de 10^{-9}M a 10^{-10}M ; de 10^{-10}M a 10^{-11}M ; de 10^{-11}M a 10^{-12}M ; o de 10^{-12}M a 10^{-13}M .

Preferiblemente el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une a IL-13 con características de unión seleccionadas del grupo que consiste de: a) una constante de velocidad de asociación (k_{on}) entre aproximadamente $10^5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o aproximadamente $10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $10^7\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, o b) una constante de velocidad de disociación (k_{off}) de aproximadamente 10^{-4}s^{-1} a 10^{-5}s^{-1} ; o de aproximadamente 10^{-5}s^{-1} a 10^{-6}s^{-1} , medida por resonancia de plasmon de superficie; o c) una constante de disociación (K_D) de aproximadamente 1.5×10^{-10} a $1 \times 10^{-10}\text{M}$ o aproximadamente 10^{-10} a 10^{-11}M . Preferiblemente el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una constante de asociación (k_{on}) a IL-13 seleccionada del grupo que consiste de: $6.68 \times 10^5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $7.86 \times 10^5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $8.35 \times 10^5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $8.69 \times 10^5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $9.15 \times 10^5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $1.26 \times 10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $1.7 \times 10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, y $2.51 \times 10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Preferiblemente el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una constante de disociación (k_{off}) a IL-13 seleccionada del grupo que consiste de: $1.23 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$; $1.76 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$; $4.74 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$; $1.91 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$; $2.14 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$, $3.82 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$; $8.81 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$ y $9.65 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$, medida por resonancia de plasmon de superficie. Preferiblemente el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una constante de disociación (K_D) a IL-13 seleccionada del grupo que consiste de: $1.05 \times 10^{-10}\text{M}$; $7.10 \times 10^{-10}\text{M}$; $1 \times 10^{-11}\text{M}$; $2.20 \times 10^{-11}\text{M}$; $2.72 \times 10^{-11}\text{M}$; $4.17 \times 10^{-11}\text{M}$; $5.68 \times 10^{-11}\text{M}$; $7.01 \times 10^{-11}\text{M}$; $7.10 \times 10^{-11}\text{M}$; y $9.79 \times 10^{-11}\text{M}$.

Un aspecto de la invención se relaciona con proteínas de unión capaces de un epítoto específico sobre IL-13. Preferiblemente el epítoto específico comprende la región Hélice D C-terminal de IL-13 humana. Más preferiblemente, el epítoto específico comprende la secuencia de aminoácidos VRDTK IEVAQ FVKDL LL HLK KLFRE GR, que corresponde a la secuencia de aminoácidos 104-130 de ID de SEC No. 1. En otro aspecto el anticuerpo o porción de unión a antígeno, se

une a un epítoto que comprende la region Hélice D C-terminal y la región Hélice A N-terminal de IL-13 humana. Preferiblemente el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a IL-13 humana de tal manera que la IL-13 con dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, unidos al epítoto definido por las regiones topográficas Ser26-Thr27-Ala28-Leu29-Arg30-Glu31-Leu32-Ile33-Glu34-Glu35-Leu36-Val37-Asn38 y Lys123-Lys124-Leu125-Phe126-Arg127-Glu-128-Gly129-Arg130 de ID de SEC No. 1 presenta inhibición de la unión al receptor de IL-13. Preferiblemente el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a IL-13 humana de tal manera que la IL-13 con dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, unidos al epítoto definido por las regiones topográficas Arg30-Glu31-Leu32-Ile33-Glu34-Glu35-Leu36-Val37-Asn38 y Lys123-Lys124-Leu125-Phe126-Arg127 de ID de SEC No. 1 presenta inhibición de la unión al receptor de IL-13. Preferiblemente el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a IL-13 humana de tal manera que la IL-13 con dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, unidos al epítoto definido por las regiones topográficas Ser26-Thr27-Ala28-Leu29-Arg30-Glu31-Leu32-Ile33-Glu34-Glu35-Leu36-Val37-Asn38 y Lys123-Lys124-Leu125-Phe126-Arg127-Glu-128-Gly129-Arg130 de ID de SEC No. 1 presenta inhibición de la unión al receptor IL-13 α 2. Más preferiblemente el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a IL-13 humana de modo que la IL-13 con dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, unido al epítoto definido por las regiones topográficas Ser26-Thr27-Ala28-Leu29-Arg30-Glu31-Leu32-Ile33-Glu34-Glu35-Leu36-Val37-Asn38 y Lys123-Lys124-Leu125-Phe126-Arg127-Glu-128-Gly129-Arg130 de ID de SEC No. 1 presenta inhibición de la unión al receptor IL-13 α 2, con la condición que dicho anticuerpo no sea BAK502G9 o MJ2-7. Más preferiblemente el anticuerpo es 13C5.5.

En un aspecto el anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une a la IL-13 y previene la unión de IL-13 al receptor IL-13 α 2 con características de unión seleccionadas del grupo que consiste de unión a un epítoto en IL-13 incluyendo las Hélices A y D; una constante de velocidad de asociación (k_{on}) entre aproximadamente $10^5 M^{-1} s^{-1}$ a $10^6 M^{-1} s^{-1}$ o aproximadamente $10^6 M^{-1} s^{-1}$ a $10^7 M^{-1} s^{-1}$; una constante de velocidad de disociación (k_{off}) de aproximadamente $10^{-4} s^{-1}$ a $10^{-5} s^{-1}$; o de aproximadamente $10^{-5} s^{-1}$ a $10^{-6} s^{-1}$, medida por resonancia de plasmon de superficie; y una constante de disociación (K_D) de aproximadamente 1.5×10^{-10} a 1×10^{-10} M o aproximadamente 10^{-10} a 10^{-11} M. En otro aspecto el anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se

une a la IL-13 variante y previene la unión de la IL-13 variante al receptor IL-13 α 2 con características de unión seleccionadas del grupo que consiste de unión a un epítotope en IL-13 incluyendo las Hélices A y D; una constante de velocidad de asociación (k_{on}) entre aproximadamente $10^5 M^{-1} s^{-1}$ a $10^6 M^{-1} s^{-1}$ o aproximadamente $10^6 M^{-1} s^{-1}$ a $10^7 M^{-1} s^{-1}$; una constante de velocidad de disociación (k_{off}) de aproximadamente $10^{-4} s^{-1}$ a $10^{-5} s^{-1}$; o de aproximadamente $10^{-5} s^{-1}$ a $10^{-6} s^{-1}$, medida por resonancia de plasmon de superficie; y una constante de disociación (K_D) de aproximadamente 1.5×10^{-10} a 1×10^{-10} M o aproximadamente 10^{-10} a 10^{-11} M.

En un aspecto de la invención la proteína de unión es capaz de unirse a IL-13, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de:

CDR-H1 . $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7$ (ID de SEC No:64), en donde;

X_1 es T, D, G, o S ;

X_2 es S ;

X_3 es D;

X_4 es M, S , Y, L, o H;

X_5 es G, W, Y, A, S, o N;

X_6 es V, I, o M; y

X_7 es D, H, S, Y, N, o G;

CDR- H2. $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-$

(ID de SEC No.: 65) , en donde;

X_1 es M, E, H, R, S, G, o L;

X_2 es I o no está presente;

X_3 es H, Y, A, D, S, o W;

X_4 es P, S, W, o G;

X_5 es S, G, E, o D;

X_6 es D, G, S, E, o N;

X_7 es S, Y o G;

X_8 es E, N, Y, V, o R;

X_9 es T, I, o K;

5 X_{10} es R, Y, I, D, o A;

X_{11} es L, Y, D, o F;

X_{12} es N, P, S, o D;

X_{13} es Q, E, D, P, o S;

X_{14} es K, M, S, T, A, o V;

10 X_{15} es F, L, V, o M;

X_{16} es K, R, o Q; y

X_{17} es D, G, o S;

CDR-H3. X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} (ID de SEC No.:66) ,
en donde;

15 X_1 es W, T, G, Y, D, o I;

X_2 es R, A, S, G, o V;

X_3 es T, F, Y, o S;

X_4 es S, T, o Y;

X_5 es Y, F, o G;

20 X_5 es F, o Y;

X_7 es S, Y, I, o F;

X_8 es D, L, Y, o P;

X_9 es Y;

X_{10} es G;

X_{11} es Y, A, P, or E;

X_{12} es F, M, S, L, o I;

X_{13} es D, V, N, or K; y

5 X_{14} es Y, o F;

CDR-L1 . X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} X_{16} - X_{17}

(ID de SEC No.: 67) , en donde;

X_1 es K, o R;

X_2 es S, or A;

10 X_3 es S o T;

X_4 es Q, K, o I;

X_5 es N, S, T, G, o E;

X_6 es L, T, o S;

X_7 es L, Q, or V;

15 X_8 es Y, N, H, D, o T;

X_9 es S, I, o T;

X_{10} es S, D, N, H, o Y;

X_{11} es N, o G;

X_{12} es Q;

20 X_{13} es K, F, N, E, o S;

X_{14} es N, T, o S;

X_{15} es Y, o F;

X_{16} es L, A, o M; y

X_{17} es A, D, E, H, o N

CDR-L2. X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 (ID de SEC No.: 68) , en donde;

X_1 es L, S, K, T, W, o Y;

X_2 es V, T, o A;

5 X_3 es S, o N;

X_4 es N, K, T, M, o R;

X_5 es R, K, o L;

X_6 es F, D, E, H, P, o A; y

X_7 es S, R, o P;

10 y

CDR-L3. X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 (ID de SEC No.: 69) , en donde;

X_1 es F, W, Q o A;

X_2 es Q o L;

X_3 es H, G, Y, W, o N;

15 X_4 es N, S, T, L, o Y;

X_5 es Y, T, S, E, o H;

X_6 es L, V, F, Y, N, G, P, o D;

X_7 es P, o, H;

X_8 es L, F, Y, W, o R;y

20 X_9 es T, o V.

Preferiblemente, el dominio de unión a antígeno comprende al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de:

residuos 31-35 de ID de SEC No.:32;
 residuos 50-66 de ID de SEC No.:32;
 residuos 99-105 de ID de SEC No.:32;
 residuos 24-39 de ID de SEC No.:33;
 5 residuos 55-61 de ID de SEC No.:33;
 residuos 94-102 de ID de SEC No.:33;
 residuos 31-35 de ID de SEC No.:34;
 residuos 50-66 de ID de SEC No.:34;
 residuos 99-105 de ID de SEC No.:34;
 10 residuos 24-39 de ID de SEC No.:35;
 residuos 55-61 de ID de SEC No.:35;
 residuos 94-102 of ID de SEC No.:35;
 residuos 31-35 de ID de SEC No.:36;
 residuos 50-66 de ID de SEC No.:36;
 15 residuos 99-109 de ID de SEC No.:36;
 residuos 24-39 de ID de SEC No.:37;
 residuos 55-61 de ID de SEC No.:37;
 residuos 94-102 de ID de SEC No.:37;
 residuos 31-35 de ID de SEC No.:38;
 20 residuos 50-66 de ID de SEC No.:38;
 residuos 99-109 de ID de SEC No.:38;
 residuos 31-35 de ID de SEC No.:39;
 residuos 50-66 de ID de SEC No.:39;
 residuos 99-112 de ID de SEC No.:39;
 25 residuos 24-39 de ID de SEC No.:40;
 residuos 55-61 de ID de SEC No.:40;
 residuos 94-102 de ID de SEC No.:40;
 residuos 31-35 de ID de SEC No.:41;
 residuos 50-66 of ID de SEC No.:41;
 30 residuos 99-112 de ID de SEC No.:41;
 residuos 31-35 de ID de SEC No.:42;
 residuos 50-66 de ID de SEC No.:42;
 residuos 99-100 de ID de SEC No.:42;
 residuos 24-39 de ID de SEC No.:43;
 35 residuos 55-61 de ID de SEC No.:43;
 residuos 94-102 de ID de SEC No.:43;
 residuos 31-35 de ID de SEC No.:44;
 residuos 50-65 de ID de SEC No.:44;
 residuos 98-106 de ID de SEC No.:44;
 40 residuos 24-40 de ID de SEC No.:45;
 residuos 56-62 de ID de SEC No.:45;
 residuos 95-103 de ID de SEC No.:45;
 residuos 32-38 de ID de SEC No.:46;
 residuos 52-67 de ID de SEC No.:46;
 45 residuos 100-112 de ID de SEC No.:46;

residuos 52-67 de ID de SEC No.:48;
 residuos 100-112 de ID de SEC No.:48;
 residuos 24-34 de ID de SEC No.:49;
 residuos 50-56 de ID de SEC No.:49;
 residuos 89-97 de ID de SEC No.:49;
 residuos 31-37 de ID de SEC No.:50;
 residuos 52-67 de ID de SEC No.:50;
 residuos 100-112 de ID de SEC No.:50;
 residuos 24-34 de ID de SEC No.:51;
 residuos 60-66 de ID de SEC No.:51;
 residuos 89-97 de ID de SEC No.:51;
 residuos 31-35 de ID de SEC No.:52;
 residuos 50-66 de ID de SEC No.:52;
 residuos 99-107 de ID de SEC No.:52;
 residuos 23-36 de ID de SEC No.:53;
 residuos 52-58 de ID de SEC No.:53;
 residuos 91-99 de ID de SEC No.:53;
 residuos 31-35 de ID de SEC No.:54;
 residuos 50-65 de ID de SEC No.:54;
 residuos 98-107 de ID de SEC No.:54;
 residuos 24-38 de ID de SEC No.:55;
 residuos 54-60 de ID de SEC No.:55;
 residuos 93-101 de ID de SEC No.:55;
 residuos 31-35 de ID de SEC No.:56;
 residuos 50-65 of ID de SEC No.:56;
 residuos 98-107 de ID de SEC No.:56;
 residuos 24-38 de ID de SEC No.:57;
 residuos 54-60 de ID de SEC No.:57;
 residuos 93-101 de ID de SEC No.:57;
 residuos 31-35 de ID de SEC No.:58;
 residuos 50-65 de ID de SEC No.:58;
 residuos 98-107 de ID de SEC No.:58;
 residuos 24-38 de ID de SEC No.:59;
 residuos 54-60 de ID de SEC No.:59;
 residuos 93-101 de ID de SEC No.:59;
 residuos 31-35 de ID de SEC No.:60;
 residuos 50-65 de ID de SEC No.:60;
 residuos 98-107 de ID de SEC No.:60;
 residuos 24-38 de ID de SEC No.:61;
 residuos 54-60 de ID de SEC No.:61;
 residuos 93-101 de ID de SEC No.:61;
 residuos 31-35 de ID de SEC No.:62;
 residuos 50-65 de ID de SEC No.:62;
 residuos 98-107 de ID de SEC No.:62;
 residuos 24-38 de ID de SEC No.:63;

residuos 24-34 de ID de SEC No.:47;
residuos 50-56 de ID de SEC No.:47;
residuos 89-97 de ID de SEC No.:47;
residuos 31-37 de ID de SEC No.:48;

residuos 54-60 de ID de SEC No.:63;
y
residuos 93-101 de ID de SEC No.:63.

- 5 En una realización preferida, la proteína de unión comprende al menos 3 CDRs seleccionadas de un conjunto de CDR de dominios variables que consiste de:

Conjunto de CDR VH 25C8	
VH 25C8 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.:32
VH 25C8 CDR-H2	Residuos 50-66 de ID de SEC No.:32
VH 25C8 CDR-H3	Residuos 99-105 de ID de SEC No.:32
Conjunto de CDR VL 25C8	
VL 25C8 CDR-L1	Residuos 24-39 de ID de SEC No.:33
VL 25C8 CDR-L2	Residuos 55-61 de ID de SEC No.:33
VL 25C8 CDR-L3	Residuos 94-102 de ID de SEC No.:33
Conjunto de CDR VH 9C11	
VH 9C11 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.:34
VH 9C11 CDR-H2	Residuos 50-66 de ID de SEC No.:34
VH 9C11 CDR-H3	Residuos 99-105 de ID de SEC No.:34
Conjunto de CDR VL 9C11	
VL 9C11 CDR-L1	Residuos 24-39 de ID de SEC No.:35
VL 9C11 CDR-L2	Residuos 55-61 de ID de SEC No.:35
VL 9C11 CDR-L3	Residuos 94-102 de ID de SEC No.:35
Conjunto de CDR VH 21D9	
VH 21D9 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.:36
VH 21D9 CDR-H2	Residuos 50-66 de ID de SEC No.:36
VH 21D9 CDR-H3	Residuos 99-109 de ID de SEC No.:36
Conjunto de CDR VL 21D9	
VL 21D9 CDR-L1	Residuos 24-39 de ID de SEC No.:37
VL 21D9 CDR-L2	Residuos 55-61 de ID de SEC No.: 37
VL 21D9 CDR-L3	Residuos 94-102 de ID de SEC No.: 37
Conjunto de CDR VH 22D10	
VH 22D10 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.:38
VH 22D10 CDR-H2	Residuos 50-66 de ID de SEC No.:38
VH 22D10 CDR-H3	Residuos 99-109 de ID de SEC No.:38
Conjunto de CDR VL 22D10	
VL 22D10 CDR-L1	Residuos 24-39 de ID de SEC No.:37

VL 22D10 CDR-L2	Residuos 55-61 de ID de SEC No.: 37
VL 22D10 CDR-L3	Residuos 94-102 de ID de SEC No.: 37
Conjunto de CDR VH 5F1	
VH 5F1 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.:39
VH 5F1 CDR-H2	Residuos 50-66 de ID de SEC No.:39
VH 5F1 CDR-H3	Residuos 99-112 de ID de SEC No.:39
Conjunto de CDR VL 5F1	
VL 5F1 CDR-L1	Residuos 24-39 de ID de SEC No.:40
VL 5F1 CDR-L2	Residuos 55-61 de ID de SEC No.:40
VL 5F1 CDR-L3	Residuos 94-102 de ID de SEC No.:40
Conjunto de CDR VH 5G1	
VH 5G1 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.:41
VH 5G1 CDR-H2	Residuos 50-66 de ID de SEC No.:41
VH 5G1 CDR-H3	Residuos 99-112 de ID de SEC No.:41
Conjunto de CDR VL 5G1	
VL 5G1 CDR-L1	Residuos 24-39 de ID de SEC No.:40
VL 5G1 CDR-L2	Residuos 55-61 de ID de SEC No.:40
VL 5G1 CDR-L3	Residuos 94-102 de ID de SEC No.:40
Conjunto de CDR VH 3H7	
VH 3H7 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.:42
VH 3H7 CDR-H2	Residuos 50-66 de ID de SEC No.:42
VH 3H7 CDR-H3	Residuos 99-100 de ID de SEC No.:42
Conjunto de CDR VL 3H7	
VL 3H7 CDR-L1	Residuos 24-39 de ID de SEC No.:43
VL 3H7 CDR-L2	Residuos 55-61 de ID de SEC No.:43
VL 3H7 CDR-L3	Residuos 94-102 de ID de SEC No.:43
Conjunto de CDR VH 14B2	
VH 14B2 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.:44
VH 14B2 CDR-H2	Residuos 50-65 de ID de SEC No.:44
VH 14B2 CDR-H3	Residuos 98-106 de ID de SEC No.:44
Conjunto de CDR VL 14B2	
VL 14B2 CDR-L1	Residuos 24-40 de ID de SEC No.:45
VL 14B2 CDR-L2	Residuos 56-62 de ID de SEC No.:45
VL 14B2 CDR-L3	Residuos 95-103 de ID de SEC No.:45
Conjunto de CDR VH 13C5	
VH 13C5 CDR -H1	Residuos 32-38 de ID de SEC No.:46

VH 13C5 CDR -H2	Residuos 52-67 de ID de SEC No.:46
VH 13C5 CDR -H3	Residuos 100-112 de ID de SEC No.:46
Conjunto CDR de VL 13C5	
VL 13C5 CDR-L1	Residuos 24-34 de ID de SEC No.:47
VL 13C5 CDR-L2	Residuos 50-56 de ID de SEC No.:47
VL 13C5 CDR-L3	Residuos 89-97 de ID de SEC No.:47
Conjunto de CDR VH 29G5	
VH 29G5 CDR-H1	Residuos 31-37 de ID de SEC No.:48
VH 29G5 CDR-H2	Residuos 52-67 de ID de SEC No.:48
VH 29G5 CDR-H3	Residuos 100-112 de ID de SEC No.:48
Conjunto de CDR VL 29G5	
VL 29G5 CDR-L1	Residuos 24-34 de ID de SEC No.:49
VL 29G5 CDR-L2	Residuos 50-56 de ID de SEC No.:49
VL 29G5 CDR-L3	Residuos 89-97 de ID de SEC No.:49
Conjunto de CDR VH 33C3	
VH 33C3 CDR-H1	Residuos 31-37 de ID de SEC No.:50
VH 33C3 CDR-H2	Residuos 52-67 de ID de SEC No.:50
VH 33C3 CDR-H3	Residuos 100-112 de ID de SEC No.:50
Conjunto de CDR VL 33C3	
VL 33C3 CDR-L1	Residuos 24-34 de ID de SEC No.:51
VL 33C3 CDR-L2	Residuos 60-66 de ID de SEC No.:51
VL 33C3 CDR-L3	Residuos 89-97 de ID de SEC No.:51
Conjunto de CDR VH 4A8	
VH 4A8 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.:52
VH 4A8 CDR-H2	Residuos 50-66 de ID de SEC No.:52
VH 4A8 CDR-H3	Residuos 99-107 de ID de SEC No.:52
Conjunto de CDR VL 4A8	
VL 4A8 CDR-L1	Residuos 23-36 de ID de SEC No.:53
VL 4A8 CDR-L2	Residuos 52-58 de ID de SEC No.:53
VL 4A8 CDR-L3	Residuos 91-99 de ID de SEC No.:53
Conjunto de CDR VH 1B6	
VH 1B6 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.:54
VH 1B6 CDR-H2	Residuos 50-65 de ID de SEC No.:54
VH 1B6 CDR-H3	Residuos 98-107 de ID de SEC No.:54
Conjunto de CDR VL 1B6	
VL 1B6 CDR-L1	Residuos 24-38 de ID de SEC No.:55

VL 1B6 CDR-L2	Residuos 54-60 de ID de SEC No.:55
VL 1B6 CDR-L3	Residuos 93-101 de ID de SEC No.:55
Conjunto de CDR VH 3E5	
VH 3E5 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.:56
VH 3E5 CDR-H2	Residuos 50-65 de ID de SEC No.:56
VH 3E5 CDR-H3	Residuos 98-107 de ID de SEC No.:56
Conjunto de CDR VL 3E5	
VL 3E5 CDR-L1	Residuos 24-38 de ID de SEC No.:57
VL 3E5 CDR-L2	Residuos 54-60 de ID de SEC No.:57
VL 3E5 CDR-L3	Residuos 93-101 de ID de SEC No.:57
Conjunto de CDR VH 6C8	
VH 6C8 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.:58
VH 6C8 CDR-H2	Residuos 50-65 de ID de SEC No.:58
VH 6C8 CDR-H3	Residuos 98-107 de ID de SEC No.:58
Conjunto de CDR VL 6C8	
VL 6C8 CDR-L1	Residuos 24-38 de ID de SEC No.:59
VL 6C8 CDR-L2	Residuos 54-60 de ID de SEC No.:59
VL 6C8 CDR-L3	Residuos 93-101 de ID de SEC No.:59
Conjunto de CDR VH 5D3	
VH 5D3 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.:60
VH 5D3 CDR-H2	Residuos 50-65 de ID de SEC No.:60
VH 5D3 CDR-H3	Residuos 98-107 de ID de SEC No.:60
Conjunto de CDR VL 5D3	
VL 5D3 CDR-L1	Residuos 24-38 de ID de SEC No.:61
VL 5D3 CDR-L2	Residuos 54-60 de ID de SEC No.:61
VL 5D3 CDR-L3	Residuos 93-101 de ID de SEC No.:61
Conjunto VH 8B6 CDR	
VH 8B6 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.:62
VH 8B6 CDR-H2	Residuos 50-65 de ID de SEC No.:62
VH 8B6 CDR-H3	Residuos 98-107 de ID de SEC No.:62
Conjunto de CDR VL 8B6	
VL 8B6 CDR-L1	Residuos 24-38 de ID de SEC No.:63
VL 8B6 CDR-L2	Residuos 54-60 de ID de SEC No.:63
VL 8B6 CDR-L3	Residuos 93-101 de ID de SEC No.:63

Preferiblemente la proteína de unión comprende al menos dos conjuntos de CDR con dominios variables. Preferiblemente al menos dos conjuntos de CDR con dominios variables se seleccionan de un grupo que consiste en:

- | | | | |
|----|-----------------------|---|------------------------|
| 5 | Conjunto CDR VH 25C8 | & | Conjunto CDR VL 25C8; |
| | Conjunto CDR VH 9C11 | & | Conjunto CDR VL 9C11; |
| | Conjunto CDR VH 21D9 | & | Conjunto CDR VL 21D9; |
| | Conjunto CDR VH 22D10 | & | Conjunto CDR VL 22D10; |
| | Conjunto CDR VH 5F1 | & | Conjunto CDR VL SF1; |
| | Conjunto CDR VH 5G1 | & | Conjunto CDR VL 5G1; |
| 10 | Conjunto CDR VH 3H7 | & | Conjunto CDR VL 3H7; |
| | Conjunto CDR VH 14B2 | & | Conjunto CDR VL 14B2; |
| | Conjunto CDR VH 13C5 | & | Conjunto CDR VL 13C5; |
| | Conjunto CDR VH 29G5 | & | Conjunto CDR VL 29G5; |
| | Conjunto CDR VH 33C3 | & | Conjunto CDR VL 33C3; |
| 15 | Conjunto CDR VH 4A8 | & | Conjunto CDR VL 4A8; |
| | Conjunto CDR VH 1B6 | & | Conjunto CDR VL 1B6; |
| | Conjunto CDR VH 3E5 | & | Conjunto CDR VL 3E5; |
| | Conjunto CDR VH 6C8 | & | Conjunto CDR VL 6C8; |
| | Conjunto CDR VH 5D3 | & | Conjunto CDR VL 5D3; y |
| 20 | Conjunto CDR VH 8B6 | & | Conjunto CDR VL 8B6. |

En otra realización la proteína de unión revelada anteriormente comprende adicionalmente un marco aceptor humano. Preferiblemente el marco aceptor humano comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de:

- | | | | |
|----|-------------------|-------------------|-------------------|
| 25 | ID de SEC No.:6 | ID de SEC No.: 16 | ID de SEC No.:26 |
| | ID de SEC No.: 7 | ID de SEC No. :17 | ID de SEC No. :27 |
| | ID de SEC No.: 8 | ID de SEC No. :18 | ID de SEC No. :28 |
| | ID de SEC No.: 9 | ID de SEC No. :19 | ID de SEC No. :29 |
| | ID de SEC No.:10 | ID de SEC No. :20 | ID de SEC No. :30 |
| 30 | ID de SEC No.: 11 | ID de SEC No. :21 | y |
| | ID de SEC No.: 12 | ID de SEC No.:22 | ID de SEC No.:31 |
| | ID de SEC No.: 13 | ID de SEC No. :23 | |
| | ID de SEC No.: 14 | ID de SEC No. :24 | |
| | ID de SEC No. :15 | ID de SEC No. :25 | |

En una realización preferida la proteína de unión es un anticuerpo con injerto de CDR o una porción de unión a antígeno del mismo capaz de unirse a IL-13. Preferiblemente el anticuerpo con injerto de CDR o la porción de unión a antígeno del mismo comprende una o más CDR reveladas anteriormente. Preferiblemente el anticuerpo con injerto de CDR o la porción de unión al antígeno del mismo comprende un marco aceptor humano. Más preferiblemente el marco aceptor humano es cualquiera de los marcos aceptores humanos revelados anteriormente.

En una realización preferida la proteína de unión es un anticuerpo humanizado o una porción de unión a antígeno del mismo capaz de unirse a IL-13. Preferiblemente el anticuerpo humanizado o porción de unión a antígeno del mismo comprende una o más CDRs reveladas anteriormente incorporadas a un dominio variable de anticuerpo humano de un marco aceptor humano. Preferiblemente el dominio variable de anticuerpo humano es un dominio variable humano de consenso. Más preferiblemente el marco aceptor humano comprende al menos una sustitución de aminoácido en la Región Marco en un residuo clave, en donde el residuo clave es seleccionado del grupo que consiste en un residuo adyacente a una CDR; un residuo en el sitio de glicosilación; un residuo raro; un residuo capaz de interactuar con la IL-13 humana; un residuo capaz de interactuar con una CDR; un residuo canónico; un residuo de contacto entre la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena liviana; un residuo dentro de una zona de Vernier; y un residuo en una región que se superpone entre una CDR1 variable de cadena pesada definida por Chothia y un primer marco de cadena pesada definido por Kabat. Preferiblemente el marco aceptor humano comprende al menos una sustitución de aminoácido en la Región Marco, en donde la secuencia de aminoácidos del marco es idéntica en por lo menos un 65% a la secuencia de dicho marco aceptor humano y comprende por lo menos 70 residuos de aminoácidos idénticos a dicho marco aceptor humano. Preferiblemente la sustitución de aminoácidos en la Región Marco en un residuo clave es seleccionada del grupo que consiste en: 2L, 15L, 22L, 41L, 42L, 44L, 49L, 50L, 51L, 62L, 71L, 73L, 10H, 44H, 46H, 48H, 67H, 68H, 70H, 72H, 74H, 76H, 83H, 84H, 86H, 87H, y 97H.

En una realización preferida la proteína de unión es un anticuerpo humanizado o porción de unión a antígeno del mismo capaz de unirse a IL-13. Preferiblemente el anticuerpo humanizado, o porción de unión a antígeno del mismo, comprende una o más CDR reveladas anteriormente. Más preferiblemente el anticuerpo

humanizado, o la porción de unión a antígeno del mismo, comprende tres o más CDR reveladas anteriormente. De la manera más preferible el anticuerpo humanizado, o porción de unión a antígeno del mismo, comprende seis CDR reveladas anteriormente.

- 5 En otra realización de la invención reivindicada, el anticuerpo humanizado o porción de unión a antígeno del mismo comprende al menos un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

ID de SEC No.:70 ID de SEC No.:77 ID de SEC No.:84

ID de SEC No.:71 ID de SEC No.:78 ID de SEC No.:85

- 10 ID de SEC No.:72 ID de SEC No.:79 ID de SEC No.:92

ID de SEC No.:73 ID de SEC No.:80 ID de SEC No.:93

ID de SEC No.:74 ID de SEC No.:81 y

ID de SEC No.:75 ID de SEC No.:82 ID de SEC No.:94

ID de SEC No.:76 ID de SEC No.:83

- 15 Más preferiblemente el anticuerpo humanizado o porción de unión a antígeno del mismo comprende dos dominios variables seleccionados del grupo revelado anteriormente. Más preferiblemente, la proteína de unión comprende dos dominios variables, en donde dichos dos dominios variables tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:

- 20 ID de SEC No.:70 & ID de SEC No.: 71,

ID de SEC No.:72 & ID de SEC No.: 73,

ID de SEC No.:74 & ID de SEC No.: 75,

ID de SEC No.:76 & ID de SEC No.: 77,

ID de SEC No.:78 & ID de SEC No.: 79,

- 25 ID de SEC No.:80 & ID de SEC No.: 81,

ID de SEC No.:82 & ID de SEC No.: 83,

ID de SEC No.:84 & ID de SEC No.: 85

ID de SEC No.:80 & ID de SEC No.: 92,

ID de SEC No.:80 & ID de SEC No.: 93, y

- 30 ID de SEC No.:80 & ID de SEC No.: 94.

Una realización de la invención provee un constructo de anticuerpo que comprende cualquiera de las proteínas de unión reveladas anteriormente y un polipéptido enlazante o una inmunoglobulina. En una realización preferida el constructo de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en una molécula de

inmunoglobulina, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo con injerto de CDR, un anticuerpo humanizado, un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un Fv, un Fv unido por disulfuro, un scFv, un anticuerpo de dominio sencillo, un diacuerpo, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo específico dual, y un anticuerpo biespecífico. En una realización preferida el constructo de anticuerpo comprende un dominio constante de inmunoglobulina de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste de un dominio constante de IgM humana, un dominio constante de IgG1 humana, un dominio constante de IgG2 humana, un dominio constante de IgG3 humana, un dominio constante de IgG4 humana, un dominio constante de IgGE humana, y un dominio constante de IgA humana. Más preferiblemente, el constructo de anticuerpo comprende ID de SEC No.:2; ID de SEC No.:3; ID de SEC No.:4; e ID de SEC No.:5. En otra realización la invención provee un conjugado de anticuerpo que comprende el constructo de anticuerpo revelado anteriormente y un agente seleccionado del grupo que consiste de: una molécula de inmunoadhesión, un agente de aplicaciones de imagen un agente terapéutico, y un agente citotóxico. En una realización preferida el agente de aplicaciones de imagen se selecciona del grupo que consiste de una radiomarcación, una enzima, una marcación fluorescente, una marcación luminiscente, una marcación bioluminiscente, una marcación magnética, y biotina. Más preferiblemente el agente de aplicaciones de imagen es una radiomarcación seleccionada del grupo que consiste de ³H, ¹⁴C, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁷⁷Lu, ¹⁶⁶Ho, y ¹⁵³Sm. En una realización preferida el agente terapéutico o citotóxico es seleccionado del grupo que consiste de: un anti-metabolito, un agente alquilante un antibiótico, un factor de crecimiento, una citoquina, un agente anti- angiogénico, un agente anti-mitótico, una antraciclina, toxina y un agente apoptótico.

En otra realización el constructo de anticuerpo está glicosilado. Preferiblemente la glicosilación es un patrón de glicosilación humana.

En otra realización la proteína de unión, constructo de anticuerpo o conjugado de anticuerpo revelado anteriormente existe como un cristal. Preferiblemente el cristal es un cristal farmacéutico de liberación controlada libre de portador. En una realización preferida la proteína de unión cristalizada, el constructo de anticuerpo cristalizado o el conjugado de anticuerpo cristalizado tiene una vida media *in vivo* mayor que la de su contraparte soluble. En otra realización preferida la proteína de unión cristalizada, el constructo de anticuerpo cristalizado o el

conjugado de anticuerpo cristalizado retienen actividad biológica después de la cristalización.

Un aspecto de la invención se relaciona con una proteína de unión DVD que comprende proteínas de unión capaces de unirse a IL-13. Preferiblemente la proteína de unión DVD es capaz de unirse a IL-13 y a un segundo objetivo. El segundo objetivo se selecciona del grupo que consiste de CSF1 (MCSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (GCSF), FGF2, IFN α 1, IFN β 1, IFN γ , histamina y receptores de histamina, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12 α , IL-12 β , IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, KITLG, PDGFB, IL-2R α , IL-4R, IL-5R α , IL-8R α , IL-8R β , IL-12R β 1, IL-12R β 2, IL-13R α 1, IL-13R α 2, IL-18R1, TSLP, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL22, CCL24, CX3CL1, CXCL1, CXCL2, CXCL3, XCL1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CX3CR1, GPR2, XCR1, FOS, GATA3, JAK1, JAK3, STAT6, TBX21, TGFB1, TNFSF6, YY1, CYSLTR1, FCER1A, FCER2, LTB4R, TB4R2, LTBR, y Quitinasa. Más preferiblemente, la proteína DVD es capaz de reconocer IL-13 e IL-1 β , IL-13 e IL-9; IL-13 e IL-4; IL-13 e IL-5; IL-13 e IL-25; IL-13 y TARC; IL-13 y MDC; IL-13 y MIF; IL-13 y TGF- β ; IL-13 y agonista de LHR; IL-13 y CL25; IL-13 y SPRR2a; IL-13 y SPRR2b; o IL-13 y ADAM8. De la manera más preferible, la proteína DVD es capaz de unirse IL-13 y TNF α .

Un aspecto de la invención se relaciona con un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de proteína de unión, constructo de anticuerpo o conjugado de anticuerpo que se ha revelado anteriormente. Una realización adicional provee un vector que comprende el ácido nucleico aislado revelado anteriormente en donde dicho vector es seleccionado del grupo que consiste en pcADN; pTT (Durocher y cols., *Nucleic Acids Research* 2002, Vol 30, No.2); pTT3 (pTT con un sitio de clonación múltiple adicional; pEFBOS (Mizushima, S. y Nagata, S., (1990) *Nucleic acids Research* Vol 18, No. 17); pBV; pJV; y pBJ.

En otro aspecto una célula huésped se transforma con el vector revelado anteriormente. Preferiblemente la célula huésped es una célula procariota. Más preferiblemente la célula huésped es E.Coli. En una realización relacionada la célula huésped es una célula eucariota. Preferiblemente la célula eucariota se selecciona del grupo que consiste en célula protista, célula animal, célula vegetal y célula fúngica. Más preferiblemente la célula huésped es una célula de mamífero incluyendo, pero sin limitarse a, CHO y COS; o una célula fúngica tal como *Saccharomyces cerevisiae*; o una célula de un insecto tal como Sf9.

Otro aspecto de la invención provee un método para producir una proteína de unión que se une a la IL-13, que comprende cultivar cualquiera de las células huésped reveladas anteriormente en un medio de cultivo bajo condiciones suficientes para producir una proteína de unión que se une a IL-13. Otra
5 realización provee una proteína de unión producida de acuerdo con el método revelado anteriormente.

Una realización provee una composición para la liberación de una proteína de unión en donde la composición comprende una formulación que a su vez comprende una proteína de unión cristalizada, un constructo de anticuerpo
10 cristalizado o un conjugado de anticuerpo cristalizado como se reveló anteriormente y un ingrediente; y al menos un portador polimérico. Preferiblemente el portador polimérico es un polímero seleccionado de uno o más del grupo que consiste de poli(ácido acrílico), poli(cianoacrilatos), poli(aminoácidos), poli(anhídridos), poli(depsipéptido), poli(ésteres), poli(ácido
15 láctico) poli(ácido láctico-co-glicólico) o PLGA, poli(b-hidroxibutirato), poli(caprolactona), poli(dioxanona); poli(etilenglicol), poli((hidroxipropil) metacrilamida, poli[(organo)fosfaceno], poli(ortoésteres), poli(alcohol vinílico), poli(vinilpirrolidona), copolímeros de anhídrido maleico- alquil vinil éter, polioles plurónicos, albúmina, alginato, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina,
20 gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glicaminoglicanos, polisacáridos sulfatados, mezclas y copolímeros de los mismos. Preferiblemente el ingrediente es seleccionado del grupo que consiste en albúmina, sacarosa, trehalosa, lactitol, gelatina, hidroxipropil- β -ciclodextrina, metoxipolietilenglicol y polietilenglicol. Otra realización provee un método para tratar un mamífero que comprende el paso de
25 administrar al mamífero una cantidad efectiva de la composición revelada anteriormente.

La invención también provee una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión, un constructo de anticuerpo o un conjugado de anticuerpo como se reveló anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable. En una
30 realización adicional la composición farmacéutica comprende al menos un agente terapéutico adicional para tratar un trastorno en el que la actividad de IL-13 es perjudicial. Preferiblemente el agente adicional es seleccionado del grupo que consiste en: agente terapéutico, agente de aplicaciones de imagen, agente citotóxico, inhibidores de la angiogénesis (incluyendo pero sin limitarse a anticuerpos anti-VEGF o trampa de VEGF); inhibidores de quinasa (incluyendo
35 pero sin limitarse a inhibidores KDR y TIE-2); bloqueadores de la moléculas de

estimulación (incluyendo pero sin limitarse a anti-B7.1, anti-B7.2, CTLA4-Ig, anti-CD20); bloqueadores de las moléculas de adhesión (incluyendo pero sin limitarse a Abs anti-LFA-1, Abs anti-E/L selectina, inhibidores de moléculas pequeñas); anticuerpos anti-citoquina o un fragmento funcional de los mismos (incluyendo pero sin limitarse a anti-IL-18, anti-TNF, anticuerpos del anti-IL-6/ receptor de citoquina); metotrexato; ciclosporina; rapamicina; FK506; una marcación o reportero detectable; un antagonista de TNF; un antireumático; un relajante muscular, un narcótico, un fármaco anti-inflamatorio no esteroidal (AINES), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano, un antipsoriático, un corticosteroide, un esteroide anabólico, una eritropoyetina, una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona de crecimiento, un fármaco de reemplazo hormonal, un radiofarmacéutico, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, una medicación para el asma, un agonista beta, un esteroide inhalado, una epinefrina o análogo, una citoquina, y un antagonista de citoquina.

En otro aspecto, la invención provee un método para inhibir la actividad de IL-13 humana que comprende poner en contacto la IL-13 humana con una proteína de unión revelada anteriormente de modo que se inhiba la actividad de la IL-13 humana. En un aspecto relacionado la invención provee un método para inhibir la actividad de la IL-13 humana en un sujeto humano que sufre de un trastorno en el que la actividad de IL-13 es perjudicial, que comprende administrar al sujeto humano una proteína de unión revelada anteriormente de modo que la actividad de la IL-13 humana en el sujeto humano se inhiba y se logre el tratamiento.

En otro aspecto, la invención provee un método para tratar (e.g., curar, suprimir, aliviar, retardar o prevenir el inicio de, o prevenir la recurrencia o la recaída de) o prevenir un trastorno asociado con IL-13, en un sujeto. El método incluye: administrar al sujeto un agente de unión a IL-13 (particularmente un antagonista); un anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo como describe aquí, en una cantidad suficiente para tratar o prevenir el trastorno asociado con IL-13. El antagonista de IL-13, e.g., el anticuerpo anti-IL-13 o el fragmento del mismo, se puede administrar al sujeto, solo o en combinación con otras modalidades terapéuticas como se describe aquí.

En una realización, el sujeto es un mamífero, e.g., un humano que sufre de uno o más trastornos asociados con IL-13, incluyendo e.g., trastornos respiratorios (e.g., asma (e.g., asma alérgica y no alérgica), enfermedad pulmonar obstructiva

crónica (EPOC), y otras condiciones que involucran inflamación de las vías aéreas, eosinofilia, fibrosis y producción excesiva de moco; trastornos atópicos (e.g., dermatitis atópica y rinitis alérgica); condiciones inflamatorias y/o autoinmunes de, la piel, órganos gastrointestinales (e.g., enfermedades inflamatorias del intestino (IBD, por sus siglas en inglés), tales como colitis ulcerativa y/o enfermedad de Crohn), y el hígado (e.g., cirrosis, fibrosis); escleroderma; tumores o cánceres, e.g., linfoma Hodgkin como se describe aquí. De manera acorde, la revelación incluye el uso de un agente de unión a IL-13 (tal como un anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo como se describe aquí) para un tratamiento como se describe aquí y el uso de un agente de unión a IL-13 (tal como un anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo como se describe aquí) para preparar un medicamento para un tratamiento como se describe aquí. Ejemplos de trastornos asociados con IL-13 incluyen, pero no están limitados a, un trastorno seleccionado de uno o más de: trastornos respiratorios, e.g., asma (e.g., asma alérgico y no alérgico (e.g., asma debido a infección con e.g., virus sincitial respiratorio (RSV), e.g., en infantes)), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), y otras condiciones que involucran inflamación de las vías aéreas, eosinofilia, fibrosis y producción excesiva de moco e.g., fibrosis quística y fibrosis pulmonar; trastornos atópicos, e.g. que resultan de una sensibilidad incrementada a la IL-13 (e.g., dermatitis atópica, urticaria, eczema, rinitis alérgica, y enterogastritis alérgica); condiciones inflamatorias y/o autoinmunes de, la piel (e.g., dermatitis atópica), órganos gastrointestinales (e.g., enfermedades inflamatorias del intestino (IBD), tales como colitis ulcerativa y/o enfermedad de Crohn), hígado (e.g., cirrosis, carcinoma hepatocelular), y escleroderma; tumores o cánceres (e.g., tejido suave o tumores sólidos), tales como leucemia, glioblastoma, y linfoma, e.g., linfoma Hodgkin; infecciones virales (e.g., de HTLV-1); fibrosis de otros órganos, e.g., fibrosis del hígado, (e.g., fibrosis causada por un virus de hepatitis B y/o C); y la supresión de la expresión de respuestas inmunes protectoras de tipo 1, (e.g., durante la vacunación), como se describe aquí.

En otras realizaciones, esta solicitud provee un método para tratar (e.g., reducir, aliviar) o prevenir uno o más síntomas asociados con un trastorno respiratorio e.g., asma (e.g., asma alérgica y no alérgica); alergias; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); una condición que involucra inflamación de las vías aéreas, eosinofilia, fibrosis y producción excesiva de moco e.g., fibrosis quística y fibrosis pulmonar. Por ejemplo, los síntomas del asma incluyen pero no están limitados a, sibilancia, falta de aliento, broncoconstricción, hiperreactividad de las

vías aéreas, capacidad pulmonar disminuida, fibrosis, inflamación de las vías aéreas, y producción de moco. El método comprende administrar al sujeto un antagonista de IL-13, e.g., un anticuerpo a IL-13 o un fragmento del mismo, en una cantidad suficiente para tratar (e.g., reducir, aliviar) o prevenir uno o más síntomas. El anticuerpo a IL-13 se puede administrar terapéuticamente o profilácticamente, o ambas. El antagonista de IL-13, e.g., el anticuerpo anti-IL-13, o el fragmento del mismo, se puede administrar al sujeto, solo o en combinación con otras modalidades terapéuticas como se describe aquí. Preferiblemente, el sujeto es un mamífero, e.g., un humano que sufre de un trastorno asociado con IL-13 como se describe aquí.

En otro aspecto, esta solicitud provee un método para detectar la presencia de IL-13 en una muestra *in vitro* (e.g., una muestra biológica, tal como suero, plasma, tejido, biopsia). El método en cuestión se puede utilizar para diagnosticar un trastorno e.g., un trastorno asociado con células inmunes. El método incluye: (i) poner en contacto la muestra o una muestra control con el anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo como se describe aquí; 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 control, en donde un cambio estadísticamente significativo en la formación del complejo en una muestra con respecto a la muestra control indica la presencia de IL-13 en la muestra.

Incluso en otro aspecto, esta solicitud provee un método para detectar la presencia de IL-13 *in vivo* (e.g., aplicaciones de imagen *in vivo* en un sujeto) El método en cuestión se puede utilizar para diagnosticar un trastorno, e.g., un trastorno asociado con IL-13. El método incluye: (i) administrar un anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo como se describe aquí a un sujeto o un sujeto control bajo las condiciones que permiten la unión del anticuerpo o fragmento a IL-13; y (ii) detectar la formación un complejo entre el anticuerpo o fragmento y la IL-13, en donde un cambio estadísticamente significativo en la formación del complejo en el sujeto con respecto al sujeto control indica la presencia de IL-13.

En otro aspecto, las proteínas de unión de la invención son útiles para tratar un trastorno seleccionado del grupo que consiste en artritis, osteoartritis, artritis crónica juvenil, artritis séptica, artritis de Lyme, artritis psoriática, artritis reactiva, espondiloartropatía, lupus sistémico eritematoso, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, enfermedad inflamatoria del intestino, diabetes mellitus insulino dependiente, tiroiditis, asma, enfermedades alérgicas, psoriasis, dermatitis

escleroderma, enfermedad de injerto versus huesped, rechazo del transplante de órganos, enfermedad inmune aguda o crónica asociada con el transplante de órganos, sarcoidosis, aterosclerosis, coagulación intravascular diseminada, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Grave, síndrome nefrótico, síndrome

5 de fatiga crónica, granulomatosis de Wegener, púrpura de Schoenlein-Henoch, vasculitis microscópica de los riñones, hepatitis activa crónica, uveitis, choque séptico, síndrome de choque tóxico, síndrome séptico, caquexia, enfermedades infecciosas, enfermedades parasitarias, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, mielitis transversa aguda, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson,

10 enfermedad de Alzheimer, apoplejía, cirrosis biliar primaria, anemia hemolítica, malignidades, insuficiencia cardíaca, infarto del miocardio, enfermedad de Addison, deficiencia poliglandular tipo I y deficiencia poliglandular tipo II, síndrome de Schmidt, síndrome de dificultad respiratoria del adulto (aguda), alopecia, alopecia areata, artropatía seronegativa, artropatía, enfermedad de Reiter,

15 artropatía psoriática, artropatía colítica ulcerativa, sinovitis enteropática, artropatía asociada con clamidia, yersinia y salmonela, espondiloartropatía, enfermedad ateromatosa/arteriosclerosis, alergia atópica, enfermedad vesiculosa autoinmune, penfigo vulgar, penfigo foliaceo, penfigoide, enfermedad de IgA lineal, anemia hemolítica autoinmune, anemia hemolítica Coombs positiva, anemia perniciosa

20 adquirida, anemia perniciosa juvenil, encefalitis miálgica/Enfermedad Libre Real(síndrome de fatiga crónica), candidiasis mucocutánea crónica, arteritis de células gigantes, hepatitis esclerosante primaria, hepatitis criptogénica autoinmune, Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, enfermedades relacionadas con inmunodeficiencia adquirida, Hepatitis B, Hepatitis C,

25 inmunodeficiencia variada común (hipogamaglobulinemia), cardiomiopatía dilatada, infertilidad femenina, insuficiencia ovárica, insuficiencia ovárica prematura, enfermedad pulmonar fibrosa, alveolitis fibrosa criptogénica, enfermedad pulmonar intersticial post-inflamatoria, neumonitis intersticial, enfermedad pulmonar intersticial asociada a enfermedad del tejido conectivo,

30 enfermedad pulmonar asociada a enfermedad del tejido conectivo mixto, enfermedad pulmonar intersticial asociada a esclerosis sistémica, enfermedad pulmonar intersticial asociada a artritis reumatoide, enfermedad pulmonar asociada a lupus sistémico eritematoso, enfermedad pulmonar asociada a dermatomiositis/polimiositis, enfermedad pulmonar asociada a la enfermedad de

35 Sjögren, enfermedad pulmonar asociada a espondilitis anquilosante, enfermedad pulmonar vasculítica difusa, enfermedad pulmonar asociada con hemosiderosis, enfermedad pulmonar intersticial inducida por fármacos, fibrosis, fibrosis por

radiación, bronquiolitis obliterante, neumonía crónica eosinofílica, enfermedad
 pulmonar infiltrativa linfocitaria, Enfermedad pulmonar intersticial postinfecciosa,
 artritis gotosa, hepatitis autoinmune, hepatitis autoinmune de tipo 1 (hepatitis
 autoinmune clásica o lupoide), hepatitis autoinmune tipo 2 (hepatitis de anticuerpo
 5 anti-LKM) hipoglicemia mediada autoinmune, resistencia a la insulina tipo B con
 acantosis nigricans, hipoparatiroidismo, enfermedad inmune aguda asociada a
 trasplante de órganos, enfermedad inmune crónica asociada a trasplante de
 órganos, osteoartritis, colangitis esclerosante primaria, psoriasis tipo 1, psoriasis
 tipo 2, leucopenia idiopática, neutropenia autoinmune, NOS de enfermedad renal,
 10 glomerulonefritis, vasculitis microscópica de los riñones, enfermedad de Lyme,
 lupus discoide eritematoso, infertilidad masculina idiopática o NOS,
 autoinmunidad espermática, esclerosis múltiple (todos los subtipos), oftalmia
 simpática, hipertensión pulmonar secundaria a la enfermedad del tejido conectivo,
 síndrome de Goodpasture, manifestación pulmonar de poliarteritis nodosa, fiebre
 15 reumática aguda, espondilitis reumatoide, enfermedad de Still, esclerosis
 sistémica, síndrome de Sjögren, enfermedad/artritis de Takayasu,
 trombocitopenia autoinmune, trombocitopenia idiopática, enfermedad autoinmune
 de la tiroides, hipertiroidismo, hipotiroidismo autoinmune (enfermedad de
 Hashimoto), hipotiroidismo autoinmune atrófico, mixedema primario, uveitis
 20 facogénica, vasculitis primaria, enfermedad aguda del hígado vitiligo,
 enfermedades hepáticas crónicas, cirrosis alcohólica, lesión hepática inducida por
 alcohol, colestasis, enfermedad hepática idiosincrática, hepatitis inducida por
 fármacos, esteatohepatitis no alcohólica, alergia y asma, infección por
 estreptococo del grupo B (GBS), trastornos mentales (e.g., depresión y
 25 esquizofrenia), enfermedades mediadas tipo Th2 y de tipo Th1, dolor agudo y
 crónico (diferentes formas de dolor), y cánceres tales como cáncer pulmonar, de
 seno, estómago, vejiga, colon, páncreas, ovario, próstata y recto, malignancias
 hematopoyéticas (leucemia y linfoma), Abetalipoproteinemia, Acrocianosis,
 procesos infecciosos o parasitarios agudos o crónicos, leucemia aguda, leucemia
 30 linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA), infección bacteriana
 crónica o aguda, pancreatitis aguda, insuficiencia renal aguda, adenocarcinomas,
 latidos ectópicos, complejo demencia SIDA, hepatitis inducida por alcohol,
 conjuntivitis alérgica, dermatitis de contacto alérgica, rinitis alérgica, rechazo de
 aloinjertos, deficiencia de alfa-1-antitripsina, esclerosis lateral amiotrófica, anemia,
 35 angina de pecho, degeneración de horn de célula anterior, terapia anti cd3,
 síndrome antifosfolípido, reacciones de hipersensibilidad al anti-receptor,
 aneurismas aórtico y periférico, disección aórtica, hipertensión arterial,

arteriosclerosis, fístula arteriovenosa, ataxia, fibrilación auricular (sostenida o paroxística), aleteo auricular, bloqueo auriculoventricular, linfoma de células B, rechazo de injerto óseo, rechazo de trasplante de médula espinal (BMT, por sus siglas en inglés), bloqueo de rama izquierda, linfoma de Burkitt, quemaduras,

5 arritmias cardíacas, síndrome de aturdimiento cardíaco, tumores cardíacos, cardiomiopatía, respuesta de inflamación por bypass cardiopulmonar, rechazo del trasplante de cartílago, degeneraciones corticales cerebelares, trastornos cerebelares, taquicardia auricular caótica o multifocal

Desórdenes asociados con quimioterapia, leucemia mielocítica crónica (LMC), alcoholismo crónico,

10 patologías inflamatorias crónicas, leucemia linfocítica crónica (LLC), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), intoxicación crónica con salicilato, carcinoma colorectal, insuficiencia cardíaca congestiva; conjuntivitis, dermatitis de contacto, cor pulmonale, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; sepsis con cultivo negativo, fibrosis quística, desórdenes

15 asociados con terapia de citoquinas, Demencia pugilística, enfermedades desmielinizantes, fiebre hemorrágica dengue, dermatitis, afecciones dermatológicas, diabetes, diabetes mellitus, enfermedad aterosclerótica diabética, enfermedad por cuerpos de Lewy difusos, cardiomiopatía congestiva dilatada, trastornos de los ganglios basales, Síndrome de Down en mediana edad,

20 trastornos de movimiento inducidos por fármacos, inducidos por fármacos que bloquean los receptores de dopamina del SNC, sensibilidad a los fármacos, eccema, encefalomielitis, endocarditis, endocrinopatía, epiglotitis, infección por el virus de epstein-barr, eritromelalgia, trastornos extrapiramidales y cerebelares, linfohistiocitosis familiar hematofagocítica, rechazo fetal de implante de timo,

25 ataxia de Friedreich, trastornos arteriales funcionales periféricos, sepsis micótica, gangrena gaseosa, úlcera gástrica, nefritis glomerular, rechazo de injertos de cualquier órgano o tejido, sepsis por gram-negativos, sepsis por gram-positivos, granulomas debidos a organismos intracelulares, leucemia de células vellosas, enfermedad de Hallerorden-Spatz, tiroiditis de Hashimoto, fiebre del heno,

30 rechazo de trasplante cardíaco, hemocromatosis, hemodiálisis, síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombolítica, hemorragia, hepatitis (A), arritmias del haz de His, infección por VIH/neuropatía por VIH, enfermedad de Hodgkin, trastornos hiperquinéticos del movimiento, reacciones de hipersensibilidad, neumonitis por hipersensibilidad, hipertensión, trastornos

35 hipoquinéticos del movimiento, evaluación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal, enfermedad idiopática de Addison, fibrosis pulmonar idiopática, citotoxicidad mediada por anticuerpos, astenia, atrofia muscular espinal infantil, inflamación de

la aorta, influenza a, exposición a la radiación ionizante, iridociclitis/uveitis/neuritis óptica, lesión por por reperfusión de la isquemia, apoplejía isquémica, artritis reumatoidea juvenil, atrofia muscular espinal juvenil, sarcoma de Kaposi, rechazo de trasplante renal, legionela, leishmaniasis, lepra, lesiones del sistema

5 corticoespinal, lipedema, rechazo de trasplante de hígado, linfedema, malaria, linfoma maligno, histiocitosis maligna, melanoma maligno, meningitis, meningococemia, metabólica/idiopática, cefalea migrañosa, desorden mitocondrial multisistemático, enfermedad de tejido conectivo mezclado, gammapatía monoclonal, mieloma múltiple, degeneraciones multisistémicas (Mencel Dejerine-

10 Thomas Shi- Drager y Machado-Joseph) miastenia gravis, *mycobacterium avium intracellulare*, *mycobacterium tuberculosis*, síndrome mielodisplásico, infarto del miocardio, trastornos miocárdicos isquémicos, carcinoma nasofaríngeo, enfermedad pulmonar crónica neonatal, nefritis, nefrosis, enfermedades neurodegenerativas, atrofas musculares neurogénicas I, fiebre neutropénica,

15 linfoma no Hodgkins, oclusión de la aorta abdominal y sus ramificaciones, trastornos arteriales oclusivos, terapia okt3, orquitis/epididimitis, orquitis/procedimientos para reversar la vasectomía, organomegalia, osteoporosis, rechazo de transplante de páncreas, carcinoma pancreático, síndrome paraneoplásico/hipercalcemia maligna, rechazo del trasplante de paratiroides,

20 enfermedad pélvica inflamatoria, rinitis perenne, enfermedad pericárdica, enfermedad aterosclerótica periférica, trastornos vasculares periféricos, peritonitis, anemia perniciosa, neumonía por *Pneumocystis carinii*, neumonía, síndrome POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammapatía monoclonal y síndromes de cambios en la piel), síndrome post perfusión, síndrome de postbombeo, síndrome post cardiectomía por IM, preeclampsia, parálisis supranuclear progresiva, hipertensión pulmonar primaria, radioterapia,

25 enfermedad y fenómeno de Raynaud, enfermedad de Raynaud, enfermedad Refsum, taquicardia estrecha regular de QRS, hipertensión renovascular, lesión por reperfusión, cardiomiopatía restrictiva, sarcomas, esclerodermia, corea senil,

30 demencia senil de tipo cuerpo de Lewy, artropatías seronegativas, choque, anemia falciforme, rechazo de aloinjerto de piel, síndrome de cambios en la piel, rechazo de trasplante de intestino delgado, tumores sólidos, arritmias específicas, ataxia espinal, degeneraciones espinocerebrales, miositis estreptococcica, lesiones estructurales del cerebelo, panencefalitis esclerosante

35 subaguda, síncope, sífilis del sistema cardiovascular, anafilaxis sistémica, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, inicio sistémico de artritis reumatoidea juvenil, LLA de célula T o FAB, telangiectasia, tromboangeitis

obliterante, trombocitopenia, toxicidad, transplantes, hemorragia/trauma, reacciones de hipersensibilidad tipo III, hipersensibilidad tipo IV, angina inestable, uremia, urosepsis, urticaria, enfermedades valvulares cardíaca, vena várice, vasculitis, enfermedades venosas, trombosis venosa, fibrilación ventricular,

5 infecciones virales y micóticas, encefaliti vital/meningitis aséptica, síndrome hemafagocítico vital, síndrome Wernicke- Korsakoff, enfermedad de Wilson, rechazo de xenoinjerto de cualquier órgano o tejido, síndrome coronario agudo, Polineuritis Idiopática aguda, Poliradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria aguda, isquemia aguda, Enfermedad de Still del adulto, alopecia areata,

10 anafilaxia, síndrome del anticuerpo anti-fosfolípido, anemia aplástica, arteriosclerosis, eczema atópico, dermatitis atópica, dermatitis autoinmune, trastorno autoinmune asociado con infección por streptococco, enteropatía autoinmune, pérdida autoinmune de la audición, síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS), miocarditis autoinmune, falla ovárica prematra autoinmune,

15 blefaritis, bronquiectasis, penfigoide vesicular, enfermedad cardiovascular, síndrome catastrófico de anti-fosfolípido, enfermedad celiaca, espondilosis cervical, isquemia crónica, penfigoide cicatricial, síndrome de aislamiento clínico (CIS, por sus siglas en inglés) con riesgo de esclerosis múltiple, conjuntivitis, trastorno psiquiátrico de inicio de la niñez, Enfermedad pulmonar obstructiva

20 crónica (EPOC), dacriocistitis, dermatomiositis, retinopatía diabética, Diabetes mellitus, hernia discal, prolapso discal, anemia hemolítica inmune inducida por fármacos, endocarditis, endometriosis, endoftalmitis, episcleritis, Erytema multiforme, eritema multiforme principal, pénfigo gestacional, síndrome Guillain-Barré (GBS), Fiebre del heno, síndrome de Hughes, Enfermedad de Parkinson

25 Idiopática, neumonía intersticial idiopática, alergia mediada por IgE, anemia hemolítica inmune, miositis con cuerpos de inclusión, enfermedad ocular inflamatoria infecciosa, enfermedad inflamatoria desmielinizante, enfermedad cardíaca inflamatoria, enfermedad renal inflamatoria, IPF/UIP, iritis, queratitis, queratoconjuntivitis sicca, enfermedad de Kussmaul o enfermedad de Kussmaul-

30 Meier, parálisis de Landry, histiocitosis celular de Langerhan, livedo reticularis, degeneración macular, poliangeitis microscópica, Morbus Bechterev, desórdenes neuronales motores, pénfigo de membrana mucosa, Falla orgánica múltiple, miastenia gravis, síndrome mielodisplásico, miocarditis, trastornos de las raíces nerviosas, neuropatía, Hepatitis No A y No B, neuritis óptica, osteolisis, JRA

35 pauciarticular, enfermedad arterial oclusiva periférica (PAOD), enfermedad vascular periférica (PVD), enfermedad arterial periférica (PAD), Flebitis, Poliarteritis nodosa (o periarteritis nodosa), Policondritis, Polimialgia Reumática,

- Poliosis, Poliarticular JRA, Síndrome de Deficiencia Poliendocrina, Polimiositis, polimialgia reumática (PMR), Síndrome Post-Bomba, parkinsonismo primario, Prostatitis, aplasia pura de células rojas, Insuficiencia Adrenal Primaria, Neuromielitis Óptica Recurrente, Restenosis, enfermedad cardíaca reumática,
- 5 SAPHO (sinovitis, acné, pustulosis, hiperostosis, y osteitis), esclerodermia, Amiloidosis Secundaria, Choque pulmonar, escleritis, ciática, Insuficiencia Adrenal Secundaria, enfermedad del tejido conectivo asociada a silicona, Dermatitis Sneddon-Wilkinson, espondilitis anquilosante, Síndrome de Stevens-Johnson (SJS), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, arteritis temporal, retinitis
- 10 toxoplásmica, necrosis epidérmica crónica, mielitis transversa, TRAPS (reacción alérgica tipo 1 al receptor del factor de necrosis tumoral, Diabetes Tipo II, Urticaria, neumonía intersticial usual (UUP), Vasculitis, conjuntivitis vernal, retinitis viral, síndrome de Vogt- Koyanagi-Harada (síndrome VKH), degeneración macular húmeda y cicatrización de heridas.
- 15 En otro aspecto, las proteínas de unión de la invención son útiles para tratar un trastorno seleccionado del grupo que consiste en Leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adrenocortical, cáncer anal, cáncer de apéndice, astrocitoma cerebelar, astrocitoma cerebral, carcinoma de células basales, cáncer de ducto biliar, cáncer de vejiga, extrahepático, cáncer de
- 20 huesos, osteosarcoma/ histiocitoma fibroso maligno, glioma de tallo cerebral, tumor cerebral, glioma de tallo cerebral, estrocitoma cerebral/glioma maligno, ependimoma, meduloblastoma, tumores neuroectodermales supratentoriales primitivos, glioma hipotalámico y de la vía visual, cáncer de mama, adenoma bronquial/carcinoides, tumor carcinoide, carcinoma gastrointestinal de primaria
- 25 desconocida, linfoma del sistema central nervioso, astrocitoma cerebral primario, cáncer cervical, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, cáncer colorrectal, linfoma cutáneo de células T, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer de esófago, tumores de la familia Ewing, tumor extracranial de células germinales,
- 30 tumor extragonadal de células germinales, cáncer de ducto extrahepático biliar, cáncer de ojo, retinoblastoma de melanoma intraocular, cáncer de vesícula, cáncer gástrico (estómago), tumor carcinoide gastrointestinal, tumor estromal gastrointestinal (GIST), tumor extracranial de células germinales, tumor extragonadal de células germinales, tumor ovárico de células germinales, tumor
- 35 trofoblástico gestacional, glioma, glioma de tallo cerebral, glioma astrocitoma cerebral, glioma de campo visual infantil e hipotalámico, leucemia de célula vellosa, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular (hígado), Linfoma

Hodgkin, cáncer hipofaringeo, melanoma intraocular, carcinoma celular de isleta (páncreas endocrino), sarcoma de Kaposi, Cáncer de riñón (celular renal), cáncer laríngeo, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, leucemia de célula vellosa, cáncer de labio y

5 cavidad bucal, cáncer de hígado, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, linfoma relacionada con SIDA, linfoma de Burkitt, linfoma cutáneo de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma del sistema nervioso central primario, macroglobulinemia de Waldenström, histiocitoma fibrosa maligna de hueso/ osteosarcoma, meduloblastoma,

10 melanoma, melanoma intraocular (ojo), carcinoma celular de Merkel, mesotelioma maligno, cáncer metastásico escamoso de cuello con primario oculto, cáncer de boca, síndrome de neoplasia endocrino múltiple, mieloma múltiple/ neoplasma celular de plasma, fungoides micosis, síndromes mielodisplásicos, enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas, leucemia mielógena, leucemia mieloide

15 crónica, mieloma múltiple, trastornos mieloproliferativos, cáncer de cavidad nasal y seno paranasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer oral, cáncer de cavidad oral, cáncer de labio y orofaríngeo, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de hueso, cáncer ovárico, cáncer ovárico epitelial, tumor ovárico de células germinales, tumor con bajo potencial maligno ovárico, cáncer pancreático,

20 cáncer pancreático de células de isleta, cáncer de seno paranasal y cavidad nasal, cáncer paratiroideo, cáncer penil, cáncer faríngeo, feocromocitoma, pineoblastoma y tumores neuroectodermal primitivos supratentoriales, tumor pituitario, neoplasma celular de plasma/mieloma múltiple, blastoma pleuropulmonar, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de células renales

25 (riñón), pelvis renal y ureter, cáncer transicional celular, retinoblastoma, cáncer glándula salivar, sarcoma, tumores de la familia Ewing, sarcoma de Kaposi, sarcoma de tejido blando, sarcoma uterino, síndrome de Sezary, cáncer de piel (no melanoma), cáncer de piel (melanoma), carcinoma celular de piel de Merkel, cáncer de intestino delgado, carcinoma celular escamoso, cáncer metastásico

30 escamoso de cuello con primario oculto, cáncer de estómago (gástrico), tumores neuroectodermales primitivos supratentoriales, linfoma cutáneo de células T, cáncer testicular, cáncer de garganta, timoma, carcinoma tímico y timoma, cáncer de tiroides, cáncer transicional celular de pelvis renal y ureter, tumor trofoblástico gestacional, ureter y pelvis renal, cáncer celular transicional, cáncer uretral,

35 cáncer uterino, sarcoma uterino endometrial, cáncer vaginal, glioma hipotalámico de campo visual, cáncer vulvar, macroglobulinemia de Waldenström, tumor de Wilms.

En otro aspecto la invención provee un método para tratar a un paciente que sufre de un trastorno en el que la IL-13 humana es destructiva, que comprende el paso de administrar cualquiera de las proteínas de unión reveladas anteriormente, antes, concurrente, o después de la administración de un segundo agente, como se discutió anteriormente. En una realización preferida el agente terapéutico adicional que se puede coadministrar y/o coformular con uno o más antagonistas de IL-13, (e.g. anticuerpos anti-IL-13 o fragmentos de los mismos), incluye, pero no está limitado a, uno o más de: esteroides inhalados; esteroides orales; agonistas beta, e.g., agonistas beta de acción corta o de acción larga; antagonistas de leucotrienos o receptores de leucotrienos; fármacos de combinación tales como ADVAIR; inhibidores de IgE, e.g., anticuerpos anti-IgE (e.g., XOLAIR); inhibidores de la fosfodiesterasa (e.g., inhibidores de PDE4); xantinas; fármacos anticolinérgicos; agentes estabilizadores de mastocitos tales como cromolina; inhibidores de IL-4; inhibidores de IL-5; inhibidores de eotaxina/CCR3; antagonistas de histamina o sus receptores incluyendo H1, H2, H3, y H4, y antagonistas de prostaglandina D o sus receptores (DP1 y CRTH2). Dichas combinaciones se pueden utilizar para tratar asma y otros trastornos respiratorios. Ejemplos adicionales de agentes terapéuticos que se pueden coadministrar y/o coformular con uno o más anticuerpos anti-IL-13 o fragmentos de los mismos que incluyen uno o más antagonistas de TNF (e.g., un fragmento soluble de un receptor de TNF, e.g., receptor de TNF humana p55 o p75 o derivados del mismo, e.g., TNFR-IgG de 75 kD (proteína de fusión receptor de TNF de 75 kD-IgG ENBREL)); antagonistas de la enzima de TNF, e.g. inhibidores de la enzima convertidora de TNF (TACE); antagonistas del receptor muscarínico; antagonistas de TGF-beta; interferon gamma, perfenidona; agentes quimioterapéuticos, e.g., metotrexato, leflunomida, o un sirolimus (rapamicina) o un análogo del mismo, e.g., inhibidores de CCI-779; COX2 y cPLA2; NSAIDs; inmunomoduladores; inhibidores de p38, inhibidores de TPL-2, MK-2 y NFkB, entre otros. El segundo agente adicional se elecciona del grupo que consiste en budenosida, factor de crecimiento epidérmico, corticosteroides, ciclosporina, sulfasalazina, aminosalicilatos, 6-mercaptopurina, azatioprina, metronidazol, inhibidores de lipoxigenasa, mesalanina, olsalazina, balsalazida, antioxidantes, inhibidores de tromboxano, antagonistas del receptor de IL-1, anticuerpos monoclonales anti-IL-1 β , anticuerpos monoclonales anti-IL-6, factores de crecimiento, inhibidores de la elastasa, compuestos piridinil-imidazol, anticuerpos o agonistas de TNF, LT, IL-1, EL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, DL-16, EL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, y PDGF, anticuerpos de CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28,

CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 o sus ligandos, metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato de mofetilo, fenolato mofetilo, leflunomida, NSAIDs, ibuprofeno, corticosteroides, prednisolona, inhibidores de la fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores del
5 complemento, agentes adrenérgicos, IRAK, NIK, IKK, p38, inhibidores de la MAP quinasa, inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 β , inhibidores de la enzima convertidora de TNF α , inhibidores de la señalización de células T, inhibidores de metaloproteínasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, receptores solubles de citoquina, receptor
10 soluble de TNF p55, receptor soluble de TNF p55, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, citoquinas antiinflamatorias, IL-4, IL-10, IL-11, y TGF β .

En una realización preferida las composiciones farmacéuticas reveladas anteriormente se administran a un sujeto mediante por lo menos un modo seleccionado de parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intraarticular,
15 intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intracelular, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocardial, intraosteal, intrapélvico, intrapericardíaco, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarectal, intrarenal, intraretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácico,
20 intrauterino, intravesical, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, y transdérmico.

Un aspecto de la invención provee por lo menos un anticuerpo anti-idiotipo de IL-13 a por lo menos una proteína de unión a IL-13. El anticuerpo anti-idiotipo incluye cualquier proteína o péptido que contiene la molécula que comprende por lo
25 menos una porción de una molécula de inmunoglobulina tal como, pero no limitada a, por lo menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena pesada o liviana o una porción de unión a ligando del mismo, una región variable de cadena pesada o cadena liviana, una región constante de cadena pesada o cadena liviana, una región del marco o cualquier porción de la
30 misma, que se puede incorporar a una proteína de unión de la presente invención.

Descripción detallada de la Invención

Esta invención se relaciona con las proteínas de unión a IL-13 humana, particularmente anticuerpos anti-IL-13 o porciones de unión a antígeno de los mismos, que se unen a IL-13. Varios aspectos de la invención se relacionan con
35 anticuerpos y con fragmentos de anticuerpos, y composiciones farmacéuticas de

los mismos, así como ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinante y células huésped para hacer dichos anticuerpos y fragmentos. Los métodos para utilizar los anticuerpos de la invención para detectar IL-13, para inhibir la actividad de IL-13 humana, ya sea in vitro o in vivo; y para regular la expresión génica también se abarcan en la invención.

A menos que se defina de otra manera aquí, los términos científicos y técnicos utilizados en conexión con la presente invención tendrán los significados que entienden aquellas personas versadas en la materia. El significado y alcance de los términos debe ser claro, sin embargo, en el caso de cualquier ambigüedad latente, las definiciones provistas aquí tienen precedente sobre cualquier definición del diccionario o extrínseca. Adicionalmente, a menos que se requiera de otra forma por contexto, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique de otra manera. Adicionalmente, el uso del término "incluir", así como otras formas, tales como: "incluye" e "incluidos", no es limitante. También, los términos tales como "elemento" o "componente" abarcan elementos y componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad a menos que se indique específicamente de otra manera.

Generalmente, las nomenclaturas utilizadas en conexión con, y las técnicas de, cultivo celular y de tejidos, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de proteínas y ácidos nucleicos y de hibridización descritas aquí son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en el arte. Los métodos y técnicas de la presente invención se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en el arte y como se describe en varias referencias generales y más específicas que se citan y se discuten a través de la presente descripción a menos que se indique de otra manera. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se hace comúnmente en el arte o como se describe aquí. Las nomenclaturas utilizadas en conexión con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritos aquí son aquellos bien conocidos y comúnmente utilizados en el arte. Las técnicas estándar se utilizan para síntesis químicas, análisis químicos, preparación, formulación y administración farmacéutica y el tratamiento de pacientes.

Para que la presente invención sea entendida más fácilmente, los términos seleccionados se describen más adelante.

El término "polipéptido" como se usa aquí, se refiere a cualquier cadena polimérica de aminoácidos. Los términos "péptido" y "proteína" se usan de forma intercambiable con el término polipéptido y también se refieren a una cadena polimérica de aminoácidos. El término "polipéptido" abarca proteínas nativas o artificiales, fragmentos de proteínas y análogos polipeptídicos de una secuencia de proteínas. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico.

El término "proteína aislada" o "polipéptido aislado" es una proteína o polipéptido que, en virtud de su origen o fuente de derivación no está asociada con componentes asociados naturalmente que lo acompañan en su estado nativo; está sustancialmente libre de otras proteínas de la misma especie; es expresada por una célula de diferentes especies; o no está presente en la naturaleza. Por consiguiente, un polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente de la célula de la cual se origina naturalmente estará "aislado" de sus componentes asociados naturalmente. Una proteína también puede ser obtenida sustancialmente libre de componentes asociados naturalmente mediante aislamiento, utilizando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en el arte.

El término "recuperar" como se utiliza aquí, se refiere al proceso de suministrar una especie química tal como un polipéptido sustancialmente libre de componentes asociados naturalmente mediante aislamiento, e.g., utilizando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en el arte.

Los términos "IL-13 humana" e "IL-13 humana de tipo nativo" (abreviadas aquí como h IL-13, hIL-13wt), como se utiliza aquí, incluyen una citoquina humana que es secretada primariamente por células T2 auxiliares. El término incluye una proteína monomérica de un polipéptido de 13kDa. La estructura de la IL-13 humana se describe adicionalmente en, por ejemplo, (Moy, Diblasio et al. 2001 J Mol Biol 310 219-30). El término IL-13 humana pretende incluir IL-13 humana recombinante (rh IL-13), que se puede preparar mediante métodos estándar de expresión recombinante. La Tabla 1 muestra la secuencia de aminoácidos de la IL-13 humana, SEC ID NO. 1, que es conocida en el arte.

Tabla 1: Secuencia de IL-13 humana

Proteína	Identificador de secuencia	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
IL-13 humana	ID DE SEC NO.: 1	MALLLTTVIALTCLGGFASPGVPPSTALREL IEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGMYC AALESLINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSA GQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLHLKKLFRE GRFN

El término "variante de la IL-13 humana" (abreviado aquí como h IL-13 v), como se usa aquí, incluye una variante de la IL-13 humana en donde el residuo aminoácido 130 de la SEC ID NO. 1 se cambia de Arginina a Glutamina (R 130Q).

5 "Actividad Biológica" como se usa aquí, se refiere a todas las propiedades biológicas inherentes de la citoquina. Las propiedades biológicas de la IL-13 incluyen pero no están limitadas a unirse al receptor de IL-13; (otros ejemplos incluyen el cambio del isotipo de inmunoglobulina a IgE en células B humanas y la supresión de la producción de citoquinas inflamatorias).

10 Los términos "unión específica" o "unido específicamente", como se usan aquí, en referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína, o un péptido con una segunda especie química, significan que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (e.g., un determinante o epítoto antigénico) en la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura

15 proteica específica más que a las proteínas generalmente. Si un anticuerpo es específico para el epítoto "A", la presencia de una molécula que contiene el epítoto A (o A libre, sin marcación), en una reacción que contiene "A" marcado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo.

El término "anticuerpo", como se usa aquí, se refiere ampliamente a cualquier

20 molécula de inmunoglobulina (Ig) comprendida por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L), o cualquier fragmento funcional, mutante, variante o derivación del mismo, que retiene las características esenciales de unión del epítoto de una molécula de Ig. Dichos formatos de anticuerpo mutante, variante o derivado son conocidos en el arte. Las

25 realizaciones no limitantes de los cuales se discuten más adelante.

En un anticuerpo de longitud total, cada cadena pesada está comprendida por una región variable de cadena pesada (abreviada aquí como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está comprendida por tres dominios, CH1, CH2, y CH3. Cada cadena liviana está comprendida por una región variable de cadena liviana (abreviada aquí como LCVR o VL) y una región constante de cadena liviana. La región constante de cadena liviana está comprendida por un dominio, CL. Las regiones VH y VL se pueden dividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), alternadas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones del marco (FR). Cada VH y VL está compuesta de tres CDR y cuatro FR, organizadas desde el extremo amino terminal hasta el extremo carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (e.g., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

El término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo (o simplemente la "porción del anticuerpo"), como se usa aquí, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la habilidad de unirse específicamente a un antígeno (e.g., hIL-13). Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud total. Dichas realizaciones del anticuerpo también pueden ser de formato biespecífico, dual específico o multi-específico; que se unen específicamente a dos o más antígenos diferentes. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "porción 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 fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados mediante un puente disulfuro en 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 solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al, (1989) Nature 341:544-546, Winter y cols., publicación PCT WO 90/05144 A1 incorporada aquí por referencia), que comprende un dominio variable sencillo; y (vi) una región determinante de la complementariedad aislada (CDR). Adicionalmente, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazante sintético que permite hacerlos como una cadena proteica sencilla en donde las regiones VL y VH se parean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); ver e.g.,

55

Bird et al. (1988) Science 242:423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). También se pretende que dichos anticuerpos de cadena sencilla estén abarcados dentro del término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo. También se abarcan otras formas de anticuerpos de cadena sencilla, tales como diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los que los dominios de VH y VL se expresan en una cadena polipeptídica sencilla, pero utilizando un enlazante que es muy corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios sobre la misma cadena, forzando de esta manera los dos a aparearse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión al antígeno (ver e.g., Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R.J., et al. (1994) Structure 2: 1121-1123). Dichas porciones de unión al anticuerpo se conocen en el arte (Kontermann and Dubel eds., Anticuerpo Engineering (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).

El término "constructo de anticuerpo" como se usa aquí se refiere a un polipéptido que comprende una o más de las porciones de unión al antígeno de la invención unidas a un polipéptido enlazante o a un dominio constante de inmunoglobulina. Los polipéptidos enlazantes comprenden dos o más residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos y utilizados para enlazar una o más porciones de unión al antígeno. Dichos polipéptidos enlazantes son bien conocidos en el arte (ver e.g., Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R.J., et al. (1994) Estructura 2: 1121-1123). Un dominio constante de inmunoglobulina se refiere a un dominio constante de cadena pesada o liviana. Un dominio constante de inmunoglobulina se refiere a un dominio constante de cadena pesada o liviana. Las secuencias de aminoácidos de dominio constante de cadena pesada y cadena liviana de la IgG humana son conocidas en el arte y se representan en la tabla 2.

Tabla 2: Secuencia de dominio constante de cadena pesada y de dominio constante de cadena liviana de IgG.

Proteína	Identificador de secuencia	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
Región constante Ig gamma-	ID de SEC No.: 2	ASTAKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK

1	Región	ID de SEC No.: 3	ASTAKGPSVFPLPSSKSTSGTALGCLVKDY FPEPVTSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPKSNITKVDK KVEPKSCDKHTCPCPAPAEAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEDHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTDL HQDWLNGKEYKCKDKNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNIKTTTPPVLDSGSEFF LYSKLTVDKSRWQGNVFSCSVMHEALHNAHYT QKSLSLSPGK
	Región	ID de SEC No.: 4	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFY PREAKVQWDNALQSGNSQESVTEQDSKDT YSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
	Región	ID de SEC No.: 5	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNK YAASSYLSLTPEQWKSHRYSQCQVTHEGSTVE KTVAPTecs

Aún adicionalmente, un anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo puede hacer parte de moléculas de inmunoadhesión más grandes, formadas por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o la porción del anticuerpo con uno o más proteínas o péptidos. Ejemplos de dichas moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región central de estreptavídina para hacer una scFv tetramérica (Kipriyanov, S.M., et al. (1995) Human Anticuerpos and Hybridomas 6:93-101) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y una marcación de polihistidina en el extremo C-terminal para hacer moléculas de scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov, S.M., et al. (1994) Mol. Immunol. 3k 1047-1058). Las porciones del anticuerpo, tales como los fragmentos Fab y

F(ab')₂, se pueden preparar a partir de anticuerpos completos utilizando técnicas convencionales, tales como digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de los anticuerpos completos. Además, los anticuerpos, las porciones de anticuerpos y las moléculas de inmunoadhesión se pueden obtener utilizando técnicas estándar de ADN recombinante, como se describe aquí.

Un "anticuerpo aislado", como se usa aquí, intenta referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (e.g. un anticuerpo aislado que se une específicamente a la hIL-13 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos diferentes de hIL-13). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a la hIL-13 puede, sin embargo, tener reactividad cruzada hacia otros antígenos, tales como moléculas de IL-13 de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o químico.

El término "anticuerpo humano", como se usa aquí, intenta incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina germinales humanas. Los anticuerpos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina germinales humanas (e.g., mutaciones introducidas por mutagénesis aleatorias o específicas de un sitio in vitro o mediante mutación somática in vivo), por ejemplo en las CDR y en particular CDR3. Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se usa aquí, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otras especies mamíferas, tales como un ratón, han sido injertadas en secuencias del marco humanas.

El término "anticuerpo humano recombinante", como se usa aquí, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados utilizando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped (descrito adicionalmente en la Sección II C, más adelante), anticuerpos aislados de una librería de anticuerpos humanos recombinante, combinatorial (Hoogenboom H.R., (1997) TIB Tech. 15:62-70; Azzazy H., y Highsmith W.E., (2002) Clin. Biochem. 35:425-445; Gavilondo J.V., and Larrick J.W. (2002) BioTechniques 29:128-145; Hoogenboom H., y Chames P. (2000) Immunology Today 21:371-378), anticuerpos aislados de un animal (e.g., un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (ver e.g., Taylor, L. D., et al. (1992) Nucl. Acids Res.

20:6287-6295; Kellermann S-A., y Green L.L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13:593-597; Little M. et al (2000) Immunology Today 21:364-370) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que involucra el empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana a
5 otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables constantes y variables derivadas de secuencias de inmunoglobulina germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes, están sujetos a mutagénesis in vitro (o, cuando se utiliza un animal transgénico para secuencias de Ig humana,
10 mutagénesis somática in vivo) y por consiguiente las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, al derivarse de y relacionarse con las secuencias germinales VH y VL germinales humanas, pueden no existir naturalmente dentro del repertorio germinal de anticuerpos humanos in vivo. Una realización provee anticuerpos completamente
15 humanos capaces de unirse a la IL-13 humana que se pueden generar utilizando técnicas bien conocidas en el arte, tales como, pero no limitados a, usar librerías de fagos de Ig humana tales como aquellos revelados en Jermutus y cols., PCT publication No.WO 2005/007699 A2.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a anticuerpos que comprenden
20 secuencias de las regiones variables de cadena pesada y liviana de una especie y secuencias de la región constante de otra especie, tal como anticuerpos que tienen regiones variables de cadena pesada y liviana unidas a regiones constantes humanas.

El término "anticuerpo con injerto de CDR" se refiere a anticuerpos que
25 comprenden secuencias de las regiones variables de cadena pesada y cadena liviana de una especie pero en las que las secuencias de uno o más de las regiones CDR de VH y/o VL se reemplazan con secuencias de CDR de otra especie, tal como anticuerpos que tienen regiones variables de cadena pesada y liviana murinas en donde uno o más de las CDR murinas (e.g., CDR3) se ha
30 reemplazado con secuencias de CDR humanas.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de cadena pesada y liviana de una especie no humana (e.g. un ratón) pero que en por lo menos una porción de la secuencia de VH y/o VL se ha alterado para ser más "tipo humano", i.e. más similar a las
35 secuencias variables germinales humanas. Un tipo de anticuerpo humanizado es

un anticuerpo con injerto de CDR, en el que las secuencias de la CDR humana se introducen en secuencias de VH y VL no humanas para reemplazar las secuencias de CDR no humanas correspondientes. En una realización, se proveen los anticuerpos humanizados de anti IL-13 humana y las porciones de unión a antígeno. Dichos anticuerpos se generaron obteniendo anticuerpos monoclonales de anti-hIL-13 murinos utilizando tecnología tradicional de hibridoma seguida por humanización utilizando ingeniería genética in vitro, tales como aquellos revelados en Kasaian et al, publicación PCT No. WO 2005/123126 A2.

Los términos "numeración de Kabat", "definiciones de Kabat" y "marcación de Kabat" se usan aquí de forma intercambiable. Estos términos, que se reconocen en el arte, se refieren a un sistema de numeración de residuos de que son más variables (i.e. hipervariable) que otros residuos de aminoácidos en las regiones variables de cadena pesada y de cadena liviana de un anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo (Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391 y, Kabat, E.A., et al. (1991) Secuencias of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Para la región variable de cadena pesada, la región hipervariable varía de las posiciones de aminoácidos 31 a 35 para CDR1, posiciones de aminoácidos 50 a 65 para CDR2, y las posiciones de aminoácidos 95 a 102 para CDR3. Para la región variable de cadena liviana, la región hipervariable varía de las posiciones de aminoácidos 24 a 34 para CDR1, las posiciones de aminoácidos 50 a 56 para CDR2, y las posiciones de aminoácidos 89 a 97 para CDR3.

Como se usa aquí, los términos "aceptor" y "anticuerpo aceptor" se refieren al anticuerpo o secuencia de ácidos nucleicos que provee o codifica por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98% o 100% de las secuencias de aminoácidos de una o más regiones del marco. En algunas realizaciones, el término "aceptor" se refiere a la secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos del anticuerpo que provee o codifica la(s) región(es) constante(s). En una realización específica, el término "aceptor" se refiere a una secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos del anticuerpo que provee o codifica por lo menos 80%, preferiblemente, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o 100% de las secuencias de aminoácidos de una o más regiones del marco. De acuerdo con esta realización, un aceptor puede contener por lo menos 1, por lo menos 2; por lo menos 3, por lo menos 4, por lo menos 5, o por lo menos 10 residuos de aminoácidos que no se

encuentra(n) en una o más posiciones específicas de un anticuerpo humano. Una(s) región(es) aceptora(s) del marco y/o región(es) aceptora(s) constante(s) pueden, e.g. derivarse u obtenerse de un gen del anticuerpo germinal, un gen del anticuerpo maduro, un anticuerpo funcional (e.g., anticuerpos bien conocidos en el arte, anticuerpos en desarrollo, o anticuerpos disponibles comercialmente).

Como se usa aquí, el término "CDR" se refiere a la región determinante de complementariedad dentro de las secuencias variables del anticuerpo. Hay 3 CDR en cada una de las regiones variables de cadena pesada y de cadena liviana, que se designan CDR1, CDR2 y CDR3, para cada una de las regiones variables. El término "Conjunto de CDR" como se usa aquí se refiere a un grupo de tres CDR que se encuentran en una región variable única capaz de unirse al antígeno. Los límites exactos de estas CDR se han definido de acuerdo con sistemas diferentes. El sistema descrito por Kabat (Kabat y cols., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) y (1991)) no sólo provee un sistema de numeración de residuos no ambiguo aplicable a cualquier región variable de un anticuerpo, sino que también provee límites precisos de residuos que definen las tres CDR. Se puede referir a estas CDR como CDR de Kabat. Chothia y colaboradores (Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987) y Chothia y cols., *Nature* 342:877-883 (1989)) encontraron que ciertas sub porciones dentro de las CDR de Kabat adoptan conformaciones del esqueleto peptídico casi idénticas, a pesar de tener gran diversidad al nivel de la secuencia de aminoácidos. Estas sub porciones se designaron como L1, L2 y L3 o H1, H2 y H3 en donde "L" y "H" designan las regiones de cadena liviana y de cadena pesada, respectivamente. Se pueden referir estas regiones como CDR de Chothia, que tienen límites que se superponen con las CDR de Kabat. Otros límites que se superponen con las CDR de Kabat han sido descritas por Ptfdlan (*FASEB J.* 9: 133-139 (1995)) y MacCallum (*J Mol Biol* 262(5):732-45 (1996)). Todavía otras definiciones de límites de CDR pueden no seguir estrictamente uno de los sistemas anteriores, pero sin embargo se superpondrán con las CDR de Kabat, aunque se pueden acortar o alargar a la luz de la predicción de hallazgos experimentales de que residuos o grupos de residuos particulares o incluso CDR completas no impactan significativamente la unión a antígeno. Los métodos utilizados aquí pueden utilizar CDR definidas de acuerdo con cualquiera de estos sistemas, aunque las realizaciones preferidas utilizan CDR definidas por Kabat o Chothia.

Como se usa aquí, el término residuo "canónico" se refiere a un residuo en una CDR o marco que define una estructura de CDR canónica particular como se define en Chothia et al. (J. Mol. Biol. 196:901-907 (1987); Chothia y cols., J. Mol. Biol. 227:799 (1992), ambas incorporadas aquí por referencia). De acuerdo con

5 Chothia y cols., las porciones críticas de las CDR de muchos anticuerpos tienen conformaciones del esqueleto peptídico casi idénticas a pesar de la gran diversidad a nivel de la secuencia de aminoácidos. Cada estructura canónica especifica primeramente un conjunto de ángulos de torsión del esqueleto peptídico para un segmento contiguo de residuos de aminoácidos formando un

10 bucle.

Como se usa aquí, los términos "donor" y "anticuerpo donor" se refieren a un anticuerpo que provee uno o más CDR. En una realización preferida, el anticuerpo donor es un anticuerpo de una especie diferente a la del anticuerpo del que se obtienen o derivan las regiones del marco. En el contexto de un

15 anticuerpo humanizado, el término "anticuerpo donor" se refiere a un anticuerpo no-humano que provee uno o más CDR.

Como se usa aquí, el término "marco" o "secuencia del marco" se refiere a las secuencias remanentes de una región variable menos las CDR. Ya que la definición exacta de una secuencia de CDR se puede determinar mediante

20 sistemas diferentes, el significado de una secuencia del marco está sujeto a interpretaciones diferentes en correspondencia. Las seis CDR (CDR-L1, CDR-L2, y CDR-L3 de la cadena liviana, y CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la cadena pesada) también dividen las regiones del marco en la cadena liviana y la cadena pesada en cuatro sub-regiones (FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada cadena, en las

25 que CDR1 está ubicada entre FR1 y FR2, CDR2 entre FR2 y FR3, y CDR3 entre FR3 y FR4. Sin especificar las sub-regiones particulares como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región del marco, referida por otros, representa las FR combinadas dentro de la región variable de una cadena de inmunoglobulina. Como se usa aquí, una FR representa una de las cuatro sub-regiones, y las FR representan dos

30 o más de las cuatro sub-regiones que constituyen una región del marco.

Las secuencias aceptoras humanas de cadena pesada y de cadena liviana son conocidas en el arte. En una realización de la invención las secuencias aceptoras humanas de cadena pesada y de cadena liviana son seleccionadas de las secuencias descritas en la Tabla 3 y la Tabla 4.

TABLA 3: SECUENCIAS ACEPTORAS DE CADENA PESADA

SEQ ID NO.	Región de la Proteina	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
6	VH1-18&JH6 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
7	VH1-18&JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
8	VH1-18&JH6 FR3	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
9	VH1-18&JH6 FR4	WGQGTTTVTVSS
6	21/28&JH4 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
10	21/28&JH4 FR2	WVRQAPGQRLEWMG
11	21/28&JH4 FR3	RVTITRDTSTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR
12	21/28&JH4 FR4	WGQGTLTVTVSS
13	VH2-26&JH6 FR1	QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLS
14	VH2-26&JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLAH
15	VH2-26&JH6 FR3	RLTGSKDTSKSQWLTMTNMDPVDVATYYCAR
9	VH2-26&JH6 FR4	WGQGTTTVTVSS
16	M60&JH4 FR1	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTLYGFSLS
17	M60&JH4 FR2	WIRQPPGKALEWLA
18	M60&JH4 FR3	RLTISKDTSKNQWLTMTNMDPVDVATYYCAR
12	M60&JH4 FR4	WGQGTLTVTVSS
6	VH1-46&JH6 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
7	VH1-46&JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
19	VH1-46&JH6 FR3	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAR
9	VH1-46&JH6 FR4	WGQGTTTVTVSS

TABLA 4 SECUENCIAS ACEPTORAS DE CADENA LIVIANA

SEQ ID No.	Protein region	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
20	A20&JK4 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC
21	A20&JK4 FR2	WYQQKPGKVPKLLIY
22	A20&JK4 FR3	GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYC
23	A20&JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
20	III-3R&JK4 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC

24	III-3R&JK4 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
25	III-3R&JK4 FR3	GVPSRISGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYC
23	III-3R&JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
26	A1&JK4 FR1	DWMTQSPLSLPVTLGQPASISC
27	A1&JK4 FR2	WFQQRPGQSPRRLIY
28	A1&JK4 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
23	A1&JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
29	01&JK2 FR1	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISC
30	01&JK2 FR2	WYLQKPGQSPQLLIY
28	01&JK2 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
31	01&JK2 FR4	FGQGTKLEIKR

Como se usa aquí, el término "gen del anticuerpo germinal" o "fragmento del gen" se refiere a una secuencia de inmunoglobulinas codificada por células no linfoides que no han sufrido el proceso de maduración que lleva al rearrreglo genético y mutación para la expresión de una inmunoglobulina particular. (Ver, e.g., Shapiro y cols., Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200 (2002); Marchalonis y cols., Adv Exp Med Biol. 484: 13-30 (2001)). Una de las ventajas proveídas por varias realizaciones de la presente invención surge del reconocimiento de que los genes del anticuerpo germinal son probablemente más que los genes del anticuerpo a conservar las estructuras de la secuencia de aminoácidos esencial, característica de individuos en las especies, por ende menos probable que sea reconocida como de una fuente foránea cuando se utiliza terapéuticamente en dicha especie.

Como se usa aquí, el término residuos "clave" se refiere a ciertos residuos dentro de la región variable que tienen más impacto sobre la especificidad y/o afinidad de unión de un anticuerpo, en particular un anticuerpo humanizado. Un residuo clave incluye, pero no está limitado a, uno o más de los siguientes: un residuo que es adyacente a un CDR, un sitio de glicosilación potencial (puede ser un sitio de glicosilación N- o O-), un residuo raro, un residuo capaz de interactuar con el antígeno, un residuo capaz de interactuar con una CDR, un residuo canónico, un residuo de contacto entre la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena liviana, un residuo dentro de la zona de Vernier, y un residuo en la región que se superpone entre la definición de Chothia de una CDR1 de cadena pesada variable y la definición de Kabat del primer marco de cadena pesada.

Como se usa aquí, el término "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo o una variante, derivado, análogo o fragmento del mismo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de interés y que comprende una región de marco (FR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano y una región determinante de complementariedad (CDR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo no humano. Como se usa aquí, el término "sustancialmente" en el contexto de una CDR se refiere a una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos de por lo menos 80%, preferiblemente por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de una CDR de un anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente todos de por lo menos uno, y típicamente dos, dominios variables (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv) en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana (i.e., anticuerpo donador) y todas o sustancialmente todas las regiones del marco son aquellas de la secuencia consenso de inmunoglobulina humana. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado también comprende por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente aquella de una inmunoglobulina humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado contiene tanto la cadena liviana como por lo menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3, y CH4 de la cadena pesada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado sólo contiene una cadena liviana humanizada. En algunas realizaciones un anticuerpo humanizado sólo contiene una cadena humanizada. En realizaciones específicas, un anticuerpo humanizado sólo contiene un dominio variable humanizado de una cadena liviana y/o cadena pesada.

El anticuerpo humanizado se puede seleccionar de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo sin limitación IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y se pueden seleccionar dominios constantes particulares para optimizar las funciones efectoras deseadas utilizando técnicas bien conocidas en el arte.

Las regiones del marco y CDR de un anticuerpo humanizado no necesitan corresponder precisamente a las secuencias padre, e.g., la CDR del anticuerpo donador se puede mutagenizar por sustitución, inserción y/o delección de por lo menos un residuo de aminoácido de modo que el residuo de la CDR o del marco

en ese sitio no corresponde ni al anticuerpo donador ni al marco consenso. En una realización preferida, dichas mutaciones, sin embargo, no serán extensas. Usualmente, por lo menos 80%, preferiblemente por lo menos 85%, más preferiblemente por lo menos 90%, y más preferiblemente por lo menos 95% de los residuos del anticuerpo humanizado corresponden a aquellos de las secuencias padre de FR y CDR. Como se usa aquí, el término "marco de consenso" se refiere a la región del marco en la secuencia consenso de inmunoglobulina. Como se usa aquí, El término secuencia consenso de inmunoglobulina se refiere a la secuencia formada de los aminoácidos (o nucleótidos) de mayor ocurrencia en una familia de secuencias relacionadas con inmunoglobulina. (Ver e.g., Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987). En una familia de inmunoglobulinas, cada posición en la secuencia consenso está ocupada por el aminoácido de mayor ocurrencia en esa posición en la familia. Si dos aminoácidos tienen la misma frecuencia de ocurrencia, cualquiera de los dos se puede incluir en la secuencia consenso.

Como se usa aquí, la zona de "Vernier" se refiere a un subconjunto de residuos del marco que puede ajustar la estructura del CDR y ajustar el encaje al antígeno como describen Foote y Winter (1992, J. Mol. Biol. 224:487-499, que se incorpora aquí por referencia). Los residuos de la zona de Vernier forman una capa subyaciendo las CDR y pueden impactar en la estructura de las CDR y la afinidad del anticuerpo.

El término "proteína de unión multivalente" se utiliza en esta descripción para denotar una proteína de unión que comprende dos o más sitios de unión al antígeno. La proteína de unión multivalente se modifica preferiblemente para que tenga tres o más sitios de unión al antígeno, y generalmente no es un anticuerpo de ocurrencia natural. El término "proteína de unión multiespecífica" se refiere a una proteína de unión capaz de unirse a dos o más blancos relacionados o no relacionados. Las proteínas de unión de dominio variable dual como se usa aquí, son proteínas de unión que comprenden dos o más sitios de unión al antígeno y son proteínas de unión tetravalentes o multivalentes. Dichas DVD pueden ser monoespecíficas, i.e., capaces de unirse a un antígeno, o multiespecíficas, i.e., capaces de unirse a dos o más antígenos. Las proteínas de unión DVD que comprenden dos polipéptidos DVD de cadena pesada y dos polipéptidos DVD de cadena liviana se refieren a un DVD de Ig. Cada mitad de un DVD de Ig comprende un polipéptido DVD de cadena pesada, y un polipéptido DVD de

cadena liviana, y dos sitios de unión al antígeno. Cada sitio de unión comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena liviana con un total de 6 CDR involucradas en la unión a antígeno por sitio de unión a antígeno.

- 5 Como se usa aquí, el término "neutralizante" se refiere a la neutralización de la actividad biológica de una citoquina cuando una proteína de unión se une específicamente a la citoquina. Preferiblemente una proteína de unión neutralizante es un anticuerpo neutralizante cuya unión a hIL-13 y/o hIL-13 resulta en la inhibición de la actividad biológica de hIL-13 y/o hIL-13. Preferiblemente la
- 10 proteína de unión neutralizante se une a hIL-13 y/o hIL-13 y reduce una actividad biológica de IL-13 y/o hIL-13 por lo menos aproximadamente 20%, 40%, 60%, 80%, 85% o más. La inhibición de la actividad biológica de hIL-13 y/o hIL-13 por una proteína de unión neutralizante se puede evaluar midiendo uno o más indicadores de la actividad biológica de hIL-13 y/o hIL-13 bien conocidos en el
- 15 arte. Por ejemplo, la inhibición de la IL-13 humana indujo la producción de TARC (CCL-17) mediante células A-549 (ver Example 1.1.C).

El término "actividad" incluye actividades como la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo por un antígeno, por ejemplo, un anticuerpo anti-hIL-13 que se une a un antígeno IL-13 y/o la potencia neutralizante de un anticuerpo, por

20 ejemplo, un anticuerpo anti-hIL-13 cuya unión a hIL-13 inhibe la actividad biológica de hIL-13, e.g., la inhibición la producción de TARC (CCL-17) inducida por IL-13 humana por células A-459 (ver Ejemplo 1.1.C).

El término "epítipo" incluye cualquier polipéptido determinante capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o receptor de células T. En ciertas

25 realizaciones, los determinantes de epítipo incluyen agrupaciones de moléculas de superficie activas químicamente tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, fosforil, o sulfonil, y, en ciertas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno que está unida por un

30 anticuerpo. En ciertas realizaciones, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce preferencialmente su antígeno blanco en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

El término "resonancia de plasmon de superficie", como se usa aquí, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bio-específicas en

35 tiempo real mediante la detección de alteraciones en concentraciones de

proteínas dentro de una matriz biosensorial, por ejemplo utilizando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden y Piscataway, NJ). Para descripciones adicionales, ver Jonsson, U., et al. (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51: 19-26; Jonsson, U., et al. (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnsson, B., et al (1995) *J. Mol. Recognit.* 8: 125-131; y Johnsson, B., et al. (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277.

El término " k_{on} ", como se usa aquí, pretende referirse a la constante de velocidad de asociación para la asociación de un anticuerpo al antígeno para formar el complejo antígeno/anticuerpo como se conoce en el arte.

10 El término " k_{off} ", como se usa aquí, pretende referirse a la constante de velocidad de disociación para la disociación de un anticuerpo del complejo antígeno/anticuerpo como se conoce en el arte.

El término " K_D ", como se usa aquí, pretende referirse a la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, como se conoce en el arte.

El término "proteína de unión marcada" como se usa aquí, se refiere a una proteína con una marcación incorporada que es útil para la identificación de la proteína de unión. Preferiblemente, la marcación es un marcador detectable, e.g., la incorporación de un aminoácido radiomarcado o la unión a un polipéptido de fragmentos biotinil que se pueden detectar por avidina marcada (e.g., estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que se puede detectar mediante métodos ópticos o colorimétricos). Ejemplo de marcaciones para polipéptidos incluyen, pero no están limitados a, los siguientes: radioisótopos o radionúcleos (e.g., 3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , o ^{153}Sm); marcaciones fluorescentes (e.g., FTTC, rodamina, fósforos lantánidos), marcaciones enzimáticas (e.g., peroxidasa de rábano, luciferasa, fosfatasa alcalina); marcadores quimioluminiscentes; grupos biotinilo; epítopes polipeptídicos predeterminados reconocidos por un reportero secundario. (e.g., secuencias cremallera pareadas de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítopes); y agentes magnéticos como quelatos de gadolinio.

El término "conjugado de anticuerpo" se refiere a una proteína de unión, tal como un anticuerpo, químicamente enlazado a un segundo fragmento químico tal como un agente citotóxico o terapéutico. El término "agente" se usa aquí para denotar

un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto hecho a partir de materiales biológicos. Preferiblemente los agentes terapéuticos o citotóxicos incluyen, pero no están limitados a, toxina pertussis, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, 5 mitomicina, etopósido, tenoposido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos o homólogos de los mismos.

Los términos "cristal", y "cristalizado" como se usan aquí, se refieren a un anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, que existe en la forma de un cristal. Los cristales son una forma de estado sólido de la materia, que es distinta de otras formas tales como el estado sólido amorfo o el estado cristalino líquido. Los cristales están compuestos de arreglos tridimensionales regulares, en repetición de átomos, iones, moléculas (e.g., proteínas tales como anticuerpos), o 15 ensamblajes moleculares (e.g., complejos antígeno/anticuerpo). Estos arreglos tridimensionales están ensamblados de acuerdo con relaciones matemáticas específicas que son bien entendidas en el campo. La unidad fundamental, o bloque de construcción, que se repite en un cristal, se llama la unidad asimétrica. La repetición de la unidad asimétrica en un arreglo que conforma para una 20 simetría dada, bien definida provee la "celda unidad" del cristal. La repetición de la celda unidad mediante traslaciones regulares en las tres dimensiones provee el cristal. Ver Giege, R. y Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ea., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999)."

25 El término "polinucleótido" como se refiere aquí significa means una forma polimérica de dos o más nucleótidos, ya sea ribonucleótidos o deoxinucleótidos o una forma modificada de algún tipo de nucleótido. El término incluye formas de hebra sencilla y doble de ADN pero preferiblemente es DNA de doble hebra.

El término "polinucleótido aislado" como se usa aquí significará un polinucleótido 30 (e.g., de origen genómico, cADN o sintético, o alguna combinación de los mismos) que, en virtud de su origen, el "polinucleótido aislado": no está asociado con toda o una porción de un polinucleótido con la que el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza, está unido operativamente a un polinucleótido al que no está unido en la naturaleza; o no se encuentra en la naturaleza como parte de 35 una secuencia más grande.

El término "vector", como se usa aquí, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que ha sido enlazada. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN circular de doble hebra en el que se pueden ligar segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde los segmentos adicionales de ADN se pueden ligar en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que han sido introducidos (e.g., vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores mamíferos episomales). Otros vectores (e.g., vectores mamíferos no episomales) se pueden integrar en el genoma de una célula huésped por introducción a la célula huésped, por lo que se replican junto con el genoma del hospedero. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se refieren aquí como "vectores de expresión recombinante" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinantes están frecuentemente en forma de plásmidos. En la presente descripción, "plásmido" y "vector" se pueden usar de forma intercambiable puesto que el plásmido es la forma de vector más comúnmente utilizada. Sin embargo, la invención pretende incluir dichas otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (e.g., retrovirus defectivos de replicación, adenovirus y virus adeno-asociados), que tienen funciones equivalentes.

El término "enlazado operablemente" se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar en la forma que se pretende. Una secuencia de control "enlazada operablemente" a una secuencia codificadora está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificadora se logra bajo condiciones compatibles con las secuencias control. Las secuencias "enlazadas operablemente" incluyen las secuencias control de expresión que están contiguas con el gen de interés y las secuencias control de expresión que actúan en *trans* o a distancia para controlar el gen de interés. El término "secuencia control de expresión" como se usa aquí se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión y procesar las secuencias codificantes a las que están ligadas. Las secuencias control de expresión incluyen las secuencias apropiadas de iniciación, terminación, promotor y potenciador de la transcripción; señales de procesamiento de ARN eficientes, tales como secuencias de empalme y poliadenilación; secuencias que estabilizan el mRNA citoplásmico; secuencias que mejoran la eficiencia de la traducción (i.e., secuencia consenso de Kozak);

secuencias que mejoran la estabilidad de la proteína; y cuando se desee, las secuencias que mejoran la secreción de proteínas. La naturaleza de dichas secuencias control difiere dependiendo del organismo hospedero; en procariotas, dichas secuencias control generalmente incluyen el promotor, el sitio de unión
5 ribosomal, y la secuencia de terminación de la transcripción; en eucariotas, generalmente, dichas secuencias control incluyen promotores y la secuencia de terminación de la transcripción. El término "secuencias control" pretende incluir componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por
10 ejemplo, secuencias líder y secuencias acompañantes de fusión. Los constructos de proteínas de la presente invención se pueden expresar, y purificar utilizando vectores de expresión y células huésped conocidas en el arte, incluyendo cassettes de expresión, vectores, células huésped recombinantes, y métodos para la expresión recombinante y el procesamiento proteolítico de poliproteínas y
15 pre-proteínas recombinantes a partir de un marco de lectura abierto único (e.g., WO 2007/014162 incorporada aquí por referencia).

"Transformación", como se define aquí, se refiere a cualquier proceso por el cual ADN exógeno entra a una célula huésped. La transformación puede ocurrir bajo condiciones naturales o artificiales utilizando varios métodos bien conocidos en el
20 arte. La transformación se puede basar en cualquier método conocido para la inserción de secuencias foráneas de ácidos nucleicos en una célula huésped procariótica o eucariótica. El método se selecciona con base en la célula huésped a transformar y puede incluir, pero no está limitado a, infección viral, electroporación, transfección de liposomas, y bombardeo de partículas. Dichas
25 células "transformadas" incluyen células transformadas de manera estable en las que el ADN insertado es capaz de replicación ya sea como un plásmido de replicación autónoma o como parte del cromosoma del hospedero. También incluyen células que expresan de forma transiente el ADN o ARN insertado por períodos de tiempo limitados.

30 El término "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped"), como se usa aquí, pretende referirse a una célula en la que se ha introducido ADN exógeno. Se entenderá que dichos términos pretenden referirse no sólo a la célula particular sino a toda la progenie de dicha célula. Dado que ciertas modificaciones pueden ocurrirle a las generaciones exitosas debido a mutaciones
35 o a influencias ambientales, dicha progenie puede de hecho, no ser idéntica a la célula padre, pero puede estar incluida todavía dentro del alcance del término

"célula huésped" como se usa aquí. Preferiblemente las células huésped incluyen células procarióticas y eucarióticas seleccionadas de cualquiera de los Reinos de la vida. Las células eucarióticas preferidas incluyen células protistas, fúngicas, vegetales y animales. Más preferiblemente las células huésped incluyen pero no están limitadas a la línea celular procariótica E.coli; líneas celulares de mamíferos CHO, HEK 293 y COS; la línea celular de insecto Sf9; y la célula fúngica *Saccharomyces cerevisiae*.

Se pueden utilizar técnicas estándar para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, y cultivos y transformación de tejidos (e.g., electroporación, transfección de liposomas). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se pueden realizar de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se realiza comúnmente en el arte o como se realiza aquí. Las técnicas y procedimientos previos se pueden realizar generalmente de acuerdo con los métodos convencionales bien conocidos en el arte y como se describe en varias referencias generales y más específicas que se citan y discuten a través de la presente descripción. Ver e.g., Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)), que se incorpora aquí por referencia para cualquier propósito.

"Organismo transgénico", como se conoce en el arte y se usa aquí, se refiere a un organismo que tiene células que contienen un transgen, en donde el transgen introducido al organismo (o el ancestro del organismo) expresa un polipéptido que no se expresa naturalmente en el organismo. Un "transgen" es un constructo de ADN, que está estabilizado e integrado operativamente al genoma de una célula a partir de la cual se desarrolla un organismo transgénico, dirigiendo la expresión de un producto genético codificado en uno o más tipos o tejidos celulares del organismo transgénico.

Los términos "regular" y "modular" se utilizan de forma interacambiable, y, como se usa aquí, se refieren a un cambio o una alteración en la actividad de la molécula de interés (e.g., la actividad biológica de hIL-13). La modulación puede ser un incremento o una disminución en la magnitud de cierta actividad o función de la molécula de interés. Actividades y funciones ejemplares de una molécula incluyen, pero no están limitadas a, características de unión, actividad enzimática, activación del receptor celular, y transducción de señal.

En consecuencia, el término "modulador," como se usa aquí, es un compuesto capaz de cambiar o alterar una actividad o función de una molécula de interés

(e.g., la actividad biológica de hIL-13). Por ejemplo, un modulador puede causar un incremento o disminución en la magnitud de cierta actividad o función de una molécula en comparación con la magnitud de la actividad o función observada en ausencia del modulador. En ciertas realizaciones, un modulador es un inhibidor
5 que disminuye la magnitud de por lo menos una actividad o función de una molécula. Inhibidores ejemplares incluyen, pero no están limitados a, proteínas, péptidos, anticuerpos, peptidomiméticos, carbohidratos o moléculas orgánicas pequeñas. Los peptidomiméticos están descritos, e.g., en WO01/83525.

El término "agonista", como se usa aquí, se refiere a un modulador que, cuando
10 se pone en contacto con la molécula de interés, causa un incremento en la magnitud de cierta actividad o función de la molécula en comparación con la magnitud de la actividad o función observada en ausencia del agonista. Agonistas particulares de interés pueden incluir, pero no están limitados a, polipéptidos de IL-13 o polipéptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, o cualquier otra molécula
15 que se une a hIL-13.

El término "antagonista" o "inhibidor", como se usa aquí, se refiere a un modulador que, cuando se pone en contacto con una molécula de interés causa una disminución en la magnitud de cierta actividad o función de la molécula observada en ausencia del antagonista. Antagonistas particulares de interés
20 incluyen aquellos que bloquean o modulan la actividad biológica o inmunológica de hIL-13 y/o hIL-13. Los antagonistas o inhibidores de hIL-13 y/o hIL-13 pueden incluir, pero no están limitados a, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, o cualquier otra molécula, que se une a hIL-13 y/o hIL-13.

El término "inhibir unión al receptor" se refiere a la habilidad de la proteína de
25 unión para prevenir la unión de IL-13 a uno o más de sus receptores. Dicha inhibición de unión al receptor resultaría en la disminución o abolición de la actividad biológica mediada por la unión de IL-13 a su receptor o receptores.

Como se usa aquí, el término "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad de
30 terapia de terapia que es suficiente para reducir o aliviar la severidad y/o duración de un trastorno o uno o más síntomas del mismo, prevenir el avance de un trastorno, causar la regresión de un trastorno, prevenir la recurrencia, desarrollo, inicio o progresión de uno o más síntomas asociados con un trastorno, detectar un trastorno, o potenciar o mejorar el(los) efecto(s) profiláctico(s) o terapéutico(s) de otra terapia (e.g., agente profiláctico o terapéutico).

El término "muestra", como se usa aquí, se usa en su sentido más amplio. Una "muestra biológica", como se usa aquí, incluye, pero no está limitada a, cualquier cantidad de una sustancia de un ser vivo o anteriormente ser vivo. Dichos seres vivos incluyen, pero no están limitados a, humanos, ratones, ratas, monos, perros, conejos y otros animales. Dichas sustancias incluyen, pero no están limitadas a, sangre, suero, orina, fluido sinovial, células, órganos, tejidos, médula espinal, nódulos linfáticos y bazo.

I. Anticuerpos que se unen a IL-13 humana.

Un aspecto de la presente invención provee anticuerpos monoclonales murinos aislados, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que se unen a IL-13 con alta afinidad, una baja velocidad de disociación, y alta capacidad neutralizante. Un segundo aspecto de la invención provee anticuerpos quiméricos que se unen a IL-13. Un tercer aspecto de la invención provee anticuerpos humanizados, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que se unen a la IL-13. Preferiblemente, los anticuerpos, o porciones de los mismos, son anticuerpos aislados. Preferiblemente, los anticuerpos de la invención son anticuerpos neutralizantes humanos anti-IL-13 y/o anti IL-13 humana.

A. Método para hacer anticuerpos anti IL-13

Los anticuerpos de la presente invención se pueden hacer mediante cualquiera de varias técnicas conocidas en el arte.

1. Anticuerpos monoclonales anti-IL-13 utilizando tecnología de Hibridoma

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar utilizando una amplia variedad de técnicas conocidas en el arte, incluyendo el uso de tecnologías del hibridoma, recombinantes, y despliegue de fagos, o una combinación de los mismos. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir utilizando técnicas de hibridoma incluyendo aquellas conocidas en el arte y enseñadas por ejemplo, en Harlow y cols., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Gold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling, y cols., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) (dichas referencias incorporadas aquí por referencia en su totalidad) El término "monoclonal anticuerpo" como se usa aquí no está limitado a anticuerpos producidos a través de la tecnología del hibridoma. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se

deriva de un solo clon, incluyendo cualquier clon eucariótico, procariótico o fago, y el método por el cual es producido.

Los métodos para producir y seleccionar anticuerpos específicos utilizando la tecnología del hibridoma son rutinarios y bien conocidos en el arte. En una
5 realización, la presente invención provee métodos para generar anticuerpos monoclonales así como anticuerpos producidos por el método que comprende cultivar una célula de hibridoma que secreta un anticuerpo de la invención, en donde, preferiblemente, el hibridoma se genera fusionando esplenocitos aislados de un ratón inmunizado con un antígeno de la invención con mielocitos y luego
10 seleccionar los hibridomas resultantes de la fusión de clones de hibridoma que secretan un anticuerpo que se puede unir a un polipéptido de la invención (Ver Ejemplo 1.2). Brevemente, los ratones se pueden inmunizar con antígeno IL-13. En una realización preferida, el antígeno de IL-13 se administra con un adyuvante para estimular la respuesta inmune. Dichos adyuvantes incluyen adyuvante
15 completo o incompleto de Freund, RIBI (muramil dipéptidos) o ISCOM (complejos inmunoestimulantes). Dichos adyuvantes pueden proteger al polipéptido de una rápida dispersión secuestrándolo en un depósito local, o pueden contener sustancias que estimulan el hospedero para secretar factores que son quimiotácticos para los macrófagos y otros componentes del sistema inmune.
20 Preferiblemente, si un polipéptido está administrándose, el esquema de inmunización involucrará dos o más administraciones del polipéptido, distribuido en varias semanas.

Después de la inmunización de un animal con antígeno de IL-13, se pueden obtener anticuerpos y/o células productoras de anticuerpos a partir del animal. Un
25 suero que contiene un anticuerpo anti-IL-13 se obtiene a partir del animal desangrando o sacrificando al animal. El suero se puede utilizar tal como se obtiene del animal, una fracción de la inmunoglobulina se puede obtener del suero, o se pueden purificar los anticuerpos anti-IL-13 a partir del suero. El suero o las inmunoglobulinas obtenidas de esta manera son policlonales, por
30 consiguiente tienen un arreglo heterogéneo de las propiedades.

Una vez que se detecta una respuesta inmune, e.g., anticuerpos específicos para el antígeno de IL-13 se detectan en el suero del ratón, el bazo del ratón se cultiva y se aíslan los esplenocitos. Los esplenocitos luego se fusionan por técnicas bien conocidas a células de mieloma adecuadas, por ejemplo células de la línea
35 celular SP20 disponibles de ATCC. Los Hibridomas se seleccionan y se clonan

por dilución limitada. Los clones de Hibridoma luego se prueban mediante métodos conocidos en el arte por células que secretan anticuerpos capaces de unirse a la IL-13. El fluido de ascitis, que generalmente contiene altos niveles de anticuerpos, se puede generar inmunizando ratones con clones de hibridoma positivo.

En otra realización, los hibridomas inmortalizados que producen anticuerpos se pueden preparar a partir del animal inmunizado. Después de la inmunización, el animal se sacrifica y las células B de bazo se fusionan a mielocitos inmortalizados como es bien conocido en el arte. Ver e.g., Harlow and Lane, *supra*. En una realización preferida, los mielocitos no secretan polipéptidos de inmunoglobulina (una línea celular no secretora). Después de la fusión y la selección de antibiótico, los hibridomas se seleccionan utilizando IL-13, o una porción del mismo, o una célula expresando IL-13. En una realización preferida, la selección inicial se realiza utilizando un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) o un radioinmunoensayo (RIA), preferiblemente un ELISA. Un ejemplo de selección por ELISA se provee en WO00/37504, incorporada aquí por referencia.

Los hibridomas productores de anticuerpos anti-IL-13 se seleccionan, clonan y seleccionan adicionalmente por las características deseables; incluyendo crecimiento de hibridomas robustos, alta producción de anticuerpos y características de anticuerpos deseables, como se discute adicionalmente más adelante. Los hibridomas se pueden cultivar y expandir *in vivo* en animales singénicos, en animales que carecen de sistema inmune, e.g. ratones desnudos, o en cultivo celular *in vitro*. Los métodos para seleccionar, clonar y expandir hibridomas son bien conocidos para las personas versadas en la materia.

En una realización preferida, los hibridomas son hibridomas de ratón, como se describe anteriormente. En otra realización preferida, los hibridomas se producen en especies no-humanas, no-murinas tales como ratas, ovejas, cerdos, cabras, ganado o caballos. En otra realización, los hibridomas son hibridomas humanos, en los que un mieloma no secretorio humano se fusiona con una célula humana que expresa un anticuerpo anti-IL-13.

Los fragmentos del anticuerpo que reconocen epítopes específicos se pueden generar mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')₂ de la invención se pueden producir mediante escisión proteolítica de las moléculas de inmunoglobulina, utilizando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos de Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Los

fragmentos F(ab')₂ contienen la región variable, la región constante de cadena liviana y el dominio CHI de la cadena pesada.

2. Anticuerpos monoclonales Anti-IL-13 utilizando SLAM

En otro aspecto de la invención, se generan anticuerpos recombinantes desde
5 linfocitos aislados utilizando un procedimiento referenciado en el arte previo como
el método del anticuerpo linfocítico seleccionado (SLAM), como está descrito en la
patente de E.U. No. 5,627,052, Publicación PCT WO 92/02551 y Babcock, J.S. et
al..(1996) Proc. Natl. Acad. Sci USA 93:7843-7848. En este método, células
10 sencillas que secretan los anticuerpos de interés, e.g., linfocitos derivados de
cualquiera de los animales inmunizados descritos en la Sección 1, se seleccionan
utilizando un ensayo hemolítico de placa específico para el antígeno, en donde el
antígeno IL-13, una subunidad del IL-13, o un fragmento del mismo, se acopla a
glóbulos rojos de oveja utilizando un enlazante, como biotina, y usado para
15 identificar células particulares que secretan anticuerpos específicos para IL-13.
Posterior a la identificación de las células que secretan los anticuerpos de interés,
se rescatan regiones variables de cADN de cadena liviana y pesada mediante
PCR de transcriptasa reversa y estas regiones variables pueden ser entonces
expresadas, en el contexto de regiones constantes de inmunoglobulina
20 apropiadas (e.g., regiones constantes humanas), en células huésped mamíferas,
tales como células COS o CHO. Las células huésped transfectadas con las
secuencias amplificadas de inmunoglobulina, derivadas de linfocitos
seleccionados in vivo, pueden entonces pasar por análisis y selección adicionales
in vivo, por ejemplo mediante cribado de las células transfectadas para aislar las
células que expresan los anticuerpos IL-13. Las secuencias amplificadas de
25 inmunoglobulina se pueden manipular adicionalmente in vitro, como por métodos
de maduración de afinidad in vitro tales como los descritos en la Publicación PC
WO 97/29131 y la Publicación PCT WO 00/56772.

3. Anticuerpos monoclonales Anti-IL-13 utilizando animales transgénicos

En otra realización de la presente invención, se producen anticuerpos mediante
30 inmunización de un animal no-humano que comprende algunos, o todos, los locus
de inmunoglobulina humana con un antígeno de IL-13. En una realización
preferida, el animal no-humano es un ratón transgénico XENOMOUSE, una cepa
de ratón modificada genéticamente que comprende grandes fragmentos de los
loci humanos de inmunoglobulina y es deficiente en producción de anticuerpos de
35 ratón. Ver, e.g., Green et al. Nature Genetics 7: 13-21 (1994) y las patentes E.U.

5,916,771, 5,939,598, 5,985,615, 5,998,209, 6,075,181, 6,091,001, 6,114,598 y 6,130,364. Ver también WO 91/10741, publicado en Julio 25, 1991, WO 94/02602, publicado¹ en Febrero 3, 1994, WO 96/34096 y WO 96/33735, ambos publicados en Octubre 31, 1996, WO 98/16654, publicado en Abril 23, 1998, WO 98/24893, publicado en Junio 11, 1998, WO 98/50433, publicado en Noviembre 12, 1998, WO 99/45031, publicado en Septiembre 10, 1999, WO 99/53049, publicado en Octubre 21, 1999, WO 00 09560, publicado en Febrero 24, 2000 y WO 00/037504, publicado en Junio 29, 2000. El ratón transgénico XENOMOUSE produce un repertorio tipo humano adulto de anticuerpos totalmente humanos, y genera mAbs humanos específicos al antígeno. El ratón transgénico XENOMOUSE contiene aproximadamente el 80% del repertorio humano de anticuerpos a través de la introducción de fragmentos YAC del orden de megabases y con configuración germinal de los loci humanos de cadena pesada y x loci de cadena liviana. Ver Mendez y cols., Nature Genetics 15: 146-156 (1997), Green y Jakobovits J. Exp. Med. 188:483-495 (1998), cuyas revelaciones están aquí incorporadas por referencia.

4. Anticuerpos monoclonales Anti-IL-13 utilizando librerías de anticuerpos recombinantes

Pueden utilizarse métodos in vitro para fabricar los anticuerpos de la invención, en donde una librería de anticuerpos se selecciona para identificar un anticuerpo que tenga la especificidad de unión deseada. Los métodos para tal selección de librerías de anticuerpos recombinantes son bien conocidos en el arte previo e incluyen los métodos descritos, por ejemplo, en Ladner et al. Patente E.U. No. 5,223,409; Kang et al. Publicación PCT No. WO 92/18619; Dower et al. Publicación PCT No. WO 91/17271; Winter et al. Publicación PCT No. WO 92/20791; Markland et al. Publicación PCT No. WO 92/15679; Breitling et al. Publicación PCT No. WO 93/01288; McCafferty et al. Publicación PCT No. WO 92/01047; Garrard et al. Publicación PCT No. WO 92/09690; 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; McCafferty et al, Nature (1990) 348:552-554; 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; Garrad et al. (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137; and Barbas et al. (1991) PNAS 88:7978-7982, solicitud de patente E.U 20030186374, y Publicación PCT No. WO 97/29131, cuyos contenidos se incorporan aquí por referencia.

La librería de anticuerpos recombinantes puede provenir de un sujeto inmunizado con IL-13 o IL-13, o una porción de IL-13 o IL-13. Alternativamente, la librería de anticuerpos recombinantes puede provenir de un sujeto inocente, i.e., uno que no ha sido inmunizado con IL-13, tal como una librería de anticuerpos de un sujeto humano que no ha sido inmunizado con IL-13 humano. Los anticuerpos de la invención son seleccionados por la librería de anticuerpos recombinantes con el péptido que comprende la IL-13 humana para así seleccionar los anticuerpos que reconocen al IL-13. Los métodos para realizar tal selección son bien conocidos en el arte previo, como está descrito en las referencias en el párrafo precedente.

5 Para seleccionar los anticuerpos de la invención que tienen afinidades de unión particulares por el hIL-13, tales como aquellos que se disocian del DL - 13 humano con una constante de velocidad k_{off} particular, puede utilizarse el método, conocido en el arte previo, de la resonancia de plasmon de superficie para seleccionar anticuerpos que tengan la constante de velocidad k_{off} deseada.

10 Para seleccionar los anticuerpos de la invención que tengan una actividad de neutralización particular para la hIL-13, tales como aquellos con una IC_{50} particular, pueden utilizarse métodos estándar conocidos en el arte previo para evaluar la inhibición de la actividad de la hIL-13.

15

En un aspecto, la invención está relacionada con un anticuerpo aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une al IL-13 humano. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo neutralizante. En varias realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante o un anticuerpo monoclonal.

20

Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención también se pueden generar utilizando varios métodos de expresión en fagos conocidos en el arte previo. En los métodos de expresión en fagos, los dominios funcionales del anticuerpo se expresan en la superficie de partículas de fago que portan las secuencias de polinucleótidos que los codifican. En particular, tal fago puede ser utilizado para expresar dominios de unión a antígeno expresados desde un repertorio o librería de anticuerpos combinatorios (e. g., humano o murino). Los fagos que expresan un dominio de unión a antígeno que se une al antígeno de interés pueden ser seleccionados o identificados mediante antígeno, e.g., utilizando antígeno marcado o antígeno unido y capturado en una superficie sólida perla. Los fagos utilizados en estos métodos son típicamente fagos filamentosos incluyendo dominios de unión a fd y M1 3 expresados desde fagos con dominios de anticuerpo Fab, Fv o Fv estabilizado por disulfuro, fusionados de forma

25

30

35

recombinante al gen III del fago o a la proteína del gen VIII. Ejemplos de métodos de expresión en fagos que pueden utilizarse para fabricar los anticuerpos de la presente invención incluyen aquellos revelados en Brinkman y cols., J. Immunol. Methods 182:41-50 (1995); Ames y cols., J. Immunol. Methods 184: 177-186 (1995); Kettleborough y cols., Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994); Persic y cols., Gene 187 9-18 (1997); Burton y cols., Advances in Immunology 57:191-280 (1994); solicitud PCT No. PCT/GB91/01134; publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y Patentes E.U.Nos. 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780, 225; 5,658,727; 5,733,743 y 5,969,108; cada una de las cuales se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

Como se describe en las referencias anteriores, luego de la selección de fagos, las regiones que codifican anticuerpos del fago pueden ser aisladas y utilizadas para generar anticuerpos completos incluyendo anticuerpos humanos o cualquier otro fragmento de unión al antígeno deseado, y expresadas en cualquier hospedero deseado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células de planta, levaduras, y bacterias, e.g., como se describe posteriormente en detalle. Por ejemplo, también se pueden emplear técnicas para producir fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ recombinantemente utilizando métodos conocidos en el arte previo como aquellos revelados en la publicación PCT WO 92/22324; Mullinax y cols., BioTechniques 12(6):864-869 (1992); y Sawai y cols., AJRI 34:26-34 (1995); y Better y cols., Science 240: 1041-1043 (1988) (las referencias mencionadas son incorporadas por referencia en su totalidad). Ejemplos de técnicas que se pueden utilizar para producir Fvs y anticuerpos de cadena sencilla incluyen aquellos descritos en U.S. Pat. 4,946,778 and 5,258, 498; Huston y cols., Methods in Enzymology 203:46-88 (1991); Shu y cols., PNAS 90:7995-7999 (1993); y Skerra y cols., Science 240:1038-1040 (1988).

Alternativamente a la selección de las librerías de anticuerpos recombinantes por despliegue en fagos, se pueden aplicar otras metodologías conocidas en el arte previo para seleccionar grandes librerías combinatorias a la identificación de los anticuerpos de especificidad dual de la invención. Un tipo de sistema de expresión alternativo es uno en que la librería de anticuerpos recombinantes se expresa como fusiones ARN-proteína, como se describe en la Publicación PCT No. WO 98/31700 por Szostak and Roberts, y en Roberts, R. W. y Szostak, J.W. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci USA 94: 12297-12302. En este sistema, se crea una fusión

covalente entre un mRNA y el péptido o proteína que codifica mediante traducción in vitro de mRNA sintéticos que portan puromicina, un antibiótico aceptor de peptidil, en su extremo 3'. Así, un mRNA específico puede enriquecerse desde una mezcla compleja de mRNA (e.g. una librería combinatoria) con base en las propiedades del péptido o proteína codificada, e.g., un anticuerpo, o una porción del mismo, tales como la unión del anticuerpo, o de una porción del mismo, al antígeno de especificidad dual. Las secuencias de ácido nucleico que codifican anticuerpos o porciones de las mismas, recuperadas de la selección de tales librerías, pueden expresarse por medios recombinantes como los descritos anteriormente (e.g., en células huésped de mamífero) y, además, pueden ser sujetas a maduración de afinidad adicional, bien sea mediante etapas adicionales de fusión péptido-mRNA en las que se han introducido mutaciones en la(s) secuencia(s) seleccionada(s) originalmente, o mediante otros métodos de maduración de afinidad in vitro de anticuerpos recombinantes, como los descritos anteriormente.

En otra aproximación los anticuerpos de la presente invención también se pueden generar utilizando métodos de expresión en levaduras conocidos en el arte previo. En los métodos de expresión en levaduras, se utilizan métodos genéticos para atar dominios de anticuerpos a la pared celular de la levadura y expresarlos en la superficie de la levadura. En particular, esa levadura puede utilizarse para expresar dominios de enlace a antígeno expresados desde un repertorio o librería de anticuerpos combinatoria (e.g., humano o murino). Ejemplos de métodos de expresión en levaduras que pueden ser utilizados para hacer los anticuerpos de la presente invención incluyen aquellos revelados en Wittrup, et al. Patente E.U. No. 6,699,658 incorporados aquí por referencia.

B. Producción de anticuerpos IL-13 recombinantes

Los anticuerpos de la presente invención se pueden producir mediante cualquiera de varias técnicas conocidas en el arte previo. Por ejemplo, la expresión desde células huésped, en donde un vector(es) de expresión que codifica(n) las cadenas pesadas y ligeras se transfiere(n) a una célula huésped mediante técnicas estándar. Las diversas formas del término "transfección" tienen la intención de abarcar una amplia variedad de técnicas comúnmente utilizadas para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariótica o eucariótica, e.g., electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares. Aunque es posible expresar los anticuerpos de la invención en células huésped tanto procarióticas como eucarióticas, es preferible la

expresión de anticuerpos en células eucarióticas, y más preferiblemente en células huésped de mamíferos, porque es más probable que tales células eucarióticas (y en particular células de mamíferos), antes que las procarióticas, ensamblen y secreten un anticuerpo plegado apropiadamente e inmunológicamente activo.

Las células huésped de mamíferos preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen Ovario de Hámster Chino(células CHO) (incluyendo células dhfr- CHO, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci USA 77:4216-4220, utilizadas con un marcador seleccionable DHFR, e.g., como se describe en R.J. Kaufman y P.A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. Cuando se introducen los vectores de expresión recombinantes que codifican los genes del anticuerpo en las células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen mediante cultivo de las células hospedero por un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferiblemente, secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en que crecen las células. Los anticuerpos pueden ser recuperados del medio de cultivo utilizando métodos estándar de purificación de proteínas.

También se pueden utilizar células huésped para producir fragmentos funcionales de anticuerpo, tales como fragmentos Fab o moléculas scFv. Se entenderá que variaciones en el procedimiento anterior se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula huésped con ADN que codifica fragmentos funcionales de la cadena liviana y/o pesada de un anticuerpo de esta invención. También se puede utilizar tecnología de ADN recombinante para remover una parte, o todo, el ADN que codifica para alguna o ambas cadenas liviana y pesada que no es necesario para unirse a los antígenos de interés. Las moléculas expresadas desde tales moléculas truncadas de ADN también son abarcadas por los anticuerpos de la invención. Adicionalmente, pueden producirse anticuerpos bifuncionales en los que una cadena pesada y una cadena liviana son un anticuerpo de la invención y las otras cadenas pesada y liviana son específicas para un antígeno diferente a los antígenos de interés mediante entrecruzamiento de un anticuerpo de la invención con un segundo anticuerpo mediante métodos de entrecruzamiento químico estándares.

En un sistema preferido para la expresión recombinante de un anticuerpo, o de una porción de unión a antígeno del mismo, de la invención, un vector de

expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena liviana del anticuerpo se introduce en células dhfr- CHO mediante transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, cada uno de los genes de cadena pesada y liviana del anticuerpo están operativamente ligados a los elementos regulatorios potenciador CMV/ promotor AdMPLP para lograr altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también porta un gene DHFR, que permite la selección de células CHO que han sido transfectadas con el vector utilizando selección/amplificación con metotrexato. Las células huésped transformantes seleccionadas son cultivadas para permitir la expresión de las cadenas pesada y liviana del anticuerpo y el anticuerpo intacto es recuperado del medio de cultivo. Se utilizan Técnicas de biología molecular estándar para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huésped, seleccionar transformantes, cultivar las células huésped y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. Adicionalmente la invención provee un método para sintetizar un anticuerpo recombinante de la invención mediante cultivo de una célula huésped de la invención en un medio de cultivo apropiado hasta que se sintetiza un anticuerpo recombinante de la invención. El método puede comprender adicionalmente el aislamiento del anticuerpo recombinante del medio de cultivo.

1. Anticuerpos Anti IL-13

La Tabla 5 es una lista de secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos anti-hIL-13 preferidos de la invención.

Tabla 5 Lista de secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL

ID de SEC No.	Region de la proteína		Secuencia
			123456789012345678901234567890
32	VH 25C8		QVQLQOPGAEIVRPGASVOLSCKASGYTFT SSWIHWVNORPGOGLEWIGMIHPSDSETRL NOKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSSED SAVAYCASTATDFDYWGOGTTLTVSS
	VH 25C8 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC	SSWIH



		No.: 32	
	VH 25C8 CDR-H2	Residuos 50-66 de ID de SEC No.: 32	MIHPDSETRLNQQFKD
	VH 25C8 CDR-H3	Residuos 99-105 de ID de SEC No.: 32	TATDFDY
33	VL 25C8		DVVLQTPLSLPVNIGDQASISCKSTKSLL NSDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLVSNRF SGAPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGV YYCFQHNYLPLTFGAGTNLELKR
	VL 25C8 CDR-L1	Residuos 24-39 de ID de SEC No.: 33	KSTKSLLNSDGFTYLD
	VL 25C8 CDR-L2	Residuos 55-61 de ID de SEC No.: 33	LVSNRFS
	VL 25C8 CDR-L3	Residuos 94-102 de ID de SEC No.: 33	FQHNYLPLT
34	VH 9C11		QVRLQOPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFT SSWIHWVNQRPQGLEWIGMIHPDSETRL NQQFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSED SAVYYCASTATDFDYWGQGTTLTVSS
	VH 9C11 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.: 34	SSWIH
	VH 9C11 CDR-H2	Residuos 50-66 de ID de SEC No.: 34	MIHPDSETRLNQQFKD
	VH 9C11 CDR-H3	Residuos 99-105 de ID de SEC No.: 34	TATDFDY

35	VL 9C11		DVVLQTQPLSLPVNIGDQASISCRSTQTLL NSDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGV YYCFQNNYLPLTFGAGTKLELKR
	VL 9C11 CDR-L1	Residuos 24-39 de ID de SEC No.: 35	RSTQTLLNSDGFTYLD
	VL 9C11 CDR-L2	Residuos 55-61 de ID de SEC No.: 35	LVSNRFS
	VL 9C11 CDR-L3	Residuos 94-102 de ID de SEC No.: 35	FQNNYLPLT
36	VH 21D9		QVOLOQSGDDLKPGASVKLSCKASGYTFT SYWINWIKQKPGQGLEWIGHIAPGSGETYD NEMFKDKAKLTVDTSNTAYIHLSSLSED SAVYFCARGSFYFFYAMDYWGQGTSTVTVSS
	VH 21D9 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.: 36	SYWIN
	VH 21D9 CDR-H2	Residuos 50-66 de ID de SEC No.: 36	HIAPGSGETYDNEMFKD
	VH 21D9 CDR-H3	Residuos 99-109 de ID de SEC No.: 36	GSFTFFYAMDY
37	VL 21D9		DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQNIV HSNGKTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNR SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGV YYCFQGSHPYTFGGGTKLEIKR
	VL 21D9 CDR-L1	Residuos 24-39 de ID de SEC No.: 37	RSSQNIVHSNGKTYLE
	VL 21D9 CDR-L2	Residuos 55-61 de ID de SEC No.: 37	KVSNRFS

85

	VL 21D9 CDR-L3	Residuos 94-102 de ID de SEC No.: 37	FQGSHVPYT
38	VH 22D10		QVQLQQSGDDLVPKPGASVKLSCKASGYTFT SYWINWIKORPGQGLEWIGHIAPGSGETYD NEMFKDKAKLTVDTSSTAYIHLSSLSSD SAVYFCARGSFTFFYAMDYWGQGTSVTVSS
	VH 22D10 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.: 38	SYWIN
	VH 22D10 CDR-H2	Residuos 50-66 de ID de SEC No.: 38	HIAPGSGETYDNEMFKD
	VH 22D10 CDR-H3	Residuos 99-109 de ID de SEC No.: 38	GSFTFFYAMDY
37	VL 22D10		DVLTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQNIV HSNGKTYLEWYLQRPGQSPKLLIYKVS NRF SGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDLGV YYCFQGSHPYTFGGGKLEIKR
	VL 22D10 CDR-L1	Residuos 24-39 de ID de SEC No.: 37	RSSQNIVHSNGKTYLE
	VL 22D10 CDR-L2	Residuos 55-61 de ID de SEC No.: 37	KVSNRFS
	VL 22D10 CDR-L3	Residuos 94-102 de ID de SEC No.: 37	FQGSHVPYT
39	VH 5F1		QVQLQQSGAELARPGTSVKLSCKASGYTFT TYGISWVKQRTGQGLEWIGETPGSYNTYY NEKFRGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSED SAVYFCSRWRTSYFSDYGYFDYWGQGTTLT VSS
	VH 5F1 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC	TYGIS

		No.: 39	
	VH 5F1 CDR-H2	Residuos 50-66 de ID de SEC No.: 39	EIYPGSYNTYYNEKFRG
	VH 5F1 CDR-H3	Residuos 99-112 de ID de SEC No.: 39	WRTSYFSDYGYFDY
40	VL 5F1		DVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLV HSHGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYTVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGV YFC SQSTHVPYTF GGGCKLEIKR
	VL 5F1 CDR-L1	Residuos 24-39 de ID de SEC No.: 40	RSSQSLVHSHGNTYLH
	VL 5F1 CDR-L2	Residuos 55-61 de ID de SEC No.: 40	TVSNRFS
	VL 5F1 CDR-L3	Residuos 94-102 de ID de SEC No.: 40	SQSTHVPYPT
41	VH 5G1		QVQLQQSGAELARPGTSVKLSCKASGYTFT TYGVSWVKQRTGQGLEWIG EIYPGNYNTYY NEKFRG KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSED SAVYFC SRWRTSYFSDYGYFDY WGQGTTLT VSS
	VH 5G1 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.: 41	TYGVS
	VH 5G1 CDR-H2	Residuos 50-66 de ID de SEC No.: 41	EIYPGNYNTYYNEKFRG
	VH 5G1 CDR-H3	Residuos 99-112 de ID de SEC No.: 41	WRTSYFSDYGYFDY

40	VL 5G1		DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCR SSQSLV HSHGNTYLH WYLQKPGQSPKLLIY TVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGV YFC SQSTHVPYT FGGGTKLEIKR
	VL 5G1 CDR-L1	Residuos 24-39 de ID de SEC No.: 40	RSSQSLVHSHGNTYLH
	VL 5G1 CDR-L2	Residuos 55-61 de ID de SEC No.: 40	TVSNRFS
	VL 5G1 CDR-L3	Residuos 94-102 de ID de SEC No.: 40	SQSTHVPYT
42	VH 3H7		EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFS TYAM SWVRQTPEKRL EWVAGISSGGSYTY PETMKGRFTISRDNARNTLYLQMS SLRSED TAIYYCTRG SWGOGTSVTVSS
	VH 3H7 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.: 42	TYAMS
	VH 3H7 CDR-H2	Residuos 50-66 de ID de SEC No.: 42	GISSGGSYTYYPETMKG
	VH 3H7 CDR-H3	Residuos 99-100 de ID de SEC No.: 42	GS
43	VL 3H7		DVVLQTPLTLSTIGQPASISCK SSQSLL DSDGETYLN WLLQRPQSPKRLIY LVSKLD SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGV YYC WOGTHFPWT FGGGTKLEIKR
	VL 3H7 CDR-L1	Residuos 24-39 de ID de SEC No.: 43	KSSQSLLDSDGETYLN
	VL 3H7 CDR-L2	Residuos 55-61 de ID de SEC	LVSKLDS

		No.: 43	
	VL 3H7 CDR-L3	Residuos 94-102 de ID de SEC No.: 43	WQGTHFPWT
44	VH 14B2		EVKLVE\$GGGLVRPGGSLKLSCAASGFTFS SYAMNWVRQTPEKRLEWVASISSGGNIYY\$ DSVKG\$RFTISRDNARNTLHLQMSSLRSED\$ AMYYCARD DGYLYAMDY WGQGT\$VTVSS
	VH 14B2 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.: 44	SYAMN
	VH 14B2 CDR-H2	Residuos 50-65 de ID de SEC No.: 44	SISSGGNIYYSDSVKG
	VH 14B2 CDR-H3	Residuos 98-106 de ID de SEC No.: 44	DGYLYAMDY
45	VL 14B2		DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCK SSQNLL YSSNQKNYLA WYQQKPGQSPKLLIYW ASTR ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLA VYY COOYYSYPFT FGSGTKLEIKR
	VL 14B2 CDR-L1	Residuos 24-40 de ID de SEC No.: 45	KSSQNLLYSSNQKNYLA
	VL 14B2 CDR-L2	Residuos 56-62 de ID de SEC No.: 45	WASTRES
	VL 14B2 CDR-L3	Residuos 95-103 de ID de SEC No.: 45	QQYYSYPFT
46	VH 13C5		QVTEKESGPGILQPSOTLSLTC\$FSGFSL\$ TSDMGVDWIRQPSGKGLEWLAHIWDDV\$KR YNPALK\$RLTISKDTSSSQVFLMLASV\$DTA DTATYYCARTV SSGYLYAMDY WGQGT\$VT VSS

	VH 13C5 CDR-H1	Residuos 32-38 de ID de SEC No.: 46	SDMGVDW
	VH 13C5 CDR-H2	Residuos 52-67 de ID de SEC No.: 46	HIWWDDVKHYNPALKS
	VH 13C5 CDR-H3	Residuos 100- 112 de ID de SEC No.: 46	TVSSGYIYYAMDY
47	VL 13C5		DIQMTQTASSLSASLGDRVTISCRASQDIR NYLNWYQRKPDGTVKLLIFYTSKLHSGVPS RFSGSGSGTDYSLTIRNLEQEDIATYFCQQ GNTLPLTFGGGKLEIKR
	VL 13C5 CDR-L1	Residuos 24-34 de ID de SEC No.: 47	RASQDIRNYLN
	VL 13C5 CDR-L2	Residuos 50-56 de ID de SEC No.: 47	YTSKLHS
	VL 13C5 CDR-L3	Residuos 89-97 de ID de SEC No.: 47	QQGNTLPLT
48	VH 29G5		QVTLKESGPGILOPSOTLSLTCSESGFSL TSDMGVDWTROPSGKDLEWLAHIWWDDVKR YNPALKSRLETISKDTSSSOVELMLEASVDTA DIATYICARIVSSGYIYYALDYWGQGTSVT VSS
	VH 29G5 CDR-H1	Residuos 31-37 de ID de SEC No.: 48	TSDMGVD
	VH 29G5 CDR-H2	Residuos 52-67 de ID de SEC No.: 48	HIWWDDVKRYNPALKS
	VH 29G5 CDR-H3	Residuos 100- 112 de ID de SEC	IVSSGYIYYALDY

		No.: 48	
49	VL 29G5		DIQMTQTASSLSASLGDRVTISCRASQDIR NYLNNWYQRKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPS RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQ GNTLPLTFGGGKLEIKR
	VL 29G5 CDR-L1	Residuos 24-34 de ID de SEC No.: 49	RASQDIRNYLN
	VL 29G5 CDR-L2	Residuos 50-56 de ID de SEC No.: 49	YTSRLHS
	VL 29G5 CDR-L3	Residuos 89-97 de ID de SEC No.: 49	QQGNTLPLT
50	VH 33C3		QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSL TSDLGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDVKR YNPALKSRLTISKDTSSSQVFLMIASVDTA DTATYYCARIGSSGYIYYEMDYWGQGTSVT VSS
	VH 33C3 CDR-H1	Residuos 31-37 de ID de SEC No.: 50	TSDLGVG
	VH 33C3 CDR-H2	Residuos 52-67 de ID de SEC No.: 50	HIWWDDVKRYNPALKS
	VH 33C3 CDR-H3	Residuos 100- 112 de ID de SEC No.: 50	IGSSGYIYYEMDY
51	VL 33C3		DIQMTQTTSSLSASLGDRVTITCRASQDIR NYLNNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPS RFSGSGSGTDYSLTISNLDQEDIATYFCQQ GNTLPLTFGGGTRLEIKR
	VL 33C3 CDR-L1	Residuos 24-34 de ID de SEC No.: 51	RASQDIRNYLN

	VL 33C3 CDR-L2	Residuos 60-66 de ID de SEC No.: 51	YTSRLHS
	VL 33C3 CDR-L3	Residuos 89-97 de ID de SEC No.: 51	QQGNTLPLT
52	VH 4A8		EVQLQOSGAEFVRPGALVKLSCKASGFNIK DYMYWVKQRPEQGLEWIGRIDPENGNTIY DPKFQ GKASITGDTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCARYAYYGPFDYWGOGTTLTVSS
	VH 4A8 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.: 52	DYMY
	VH 4A8 CDR-H2	Residuos 50-66 de ID de SEC No.: 52	RIDPENGTIYDPKFQG
	VH 4A8 CDR-H3	Residuos 99-107 de ID de SEC No.: 52	YAYYYGPFDY
53	VL 4A8		QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSIGTVT TNNYANWVQEKPDHLFTGLIGSTNNRAPGV PARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFC ALWYSNHWVFGGGTKLTVLG
	VL 4A8 CDR-L1	Residuos 23-36 de ID de SEC No.: 53	RSSIGTVTTNNYAN
	VL 4A8 CDR-L2	Residuos 52-58 de ID de SEC No.: 53	STNNRAP
	VL 4A8 CDR-L3	Residuos 91-99 de ID de SEC No.: 53	ALWYSNHWV

54	VH 1B6		QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLT GYGVN WVRQPPGKGLEWLGMIWGDERIDYN SALKSRLSITKDNSKSQVFLKMNSLOTDDT GRYFCARDGYFPYAMDYWGQGTSVTVSS
	VH 1B6 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.: 54	GYGVN
	VH 1B6 CDR-H2	Residuos 50-65 de ID de SEC No.: 54	MIWGDERIDYNSALKS
	VH 1B6 CDR-H3	Residuos 99-107 de ID de SEC No.: 54	DGYFPYAMDY
55	VL 1B6		NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASETVD SYGKSYLHWYQQKPGQP PKLLIY LASNLES GVPARFSGSGSRTDFTLIIDPVEADDAATY YCQQNNEGPRTFGGGKLEIKR
	VL 1B6 CDR-L1	Residuos 24-38 de ID de SEC No.: 55	RASETVD SYGKSYLH
	VL 1B6 CDR-L2	Residuos 54-60 de ID de SEC No.: 55	LASNLES
	VL 1B6 CDR-L3	Residuos 93-101 de ID de SEC No.: 55	QQNNEGPRT
56	VH 3E5		QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLT GSSIN WVRQPPGKGLEWLGMIWGDGRIDYN SVLKSRLSISKDSSKSQVFLKMNSLQADDT ARYYCARDGYFPYAMVYWGQGTSVTVSS
	VH 3E5 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.: 56	GSSIN
	VH 3E5 CDR-H2	Residuos 50-65 de ID de SEC	MIWGDGRIDYNSVLKS

		No.: 56	
	VH 3E5 CDR-H3	Residuos 98-107 de ID de SEC No.: 56	DGYYPYAMVY
57	VL 3E5		NIVLTQSPASLAVSLGQRATIFC RASESVD SYGNSFMH WYQQKSGQPPKLLIY LASNLES GVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATF YC QQNNENPRT FGGGTKLEIKR
	VL 3E5 CDR-L1	Residuos 24-38 de ID de SEC No.: 57	RASESVDSYGNSFMH
	VL 3E5 CDR-L2	Residuos 54-60 de ID de SEC No.: 57	LASNLES
	VL 3E5 CDR-L3	Residuos 93-101 de ID de SEC No.: 57	QQNNENPRT
58	VH 6C8		QVQLKESGPGELVAPSSQSLSTCTVSEFSLT GSSVN WVROPFGKGLEWLG MIWGDGRIDYN SALKS RLSISKDNSKSOVFLKMNSLQTDDT ARYYCARD DGYYPYAMNY WGQGTSVTVSS
	VH 6C8 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.: 58	GSSVN
	VH 6C8 CDR-H2	Residuos 50-65 de ID de SEC No.: 58	MIWGDGRIDYNSALKS
	VH 6C8 CDR-H3	Residuos 98-107 de ID de SEC No.: 58	DGYYPYAMNY
59	VL 6C8		NIVLTQSPASLAVSLGQRATIS RASESVD SYGNSFMH WYQQKPGQPPKLLIY LASNLES GVPARFSGSGSRADFTLTIDPVEADDAATY YC QQNNENPRT FGGGTKLEIKR

	VL 6C8 CDR-L1	Residuos 24-38 de ID de SEC No.: 59	RASESVDSYGNSFMH
	VL 6C8 CDR-L2	Residuos 54-60 de ID de SEC No.: 59	LASNLES
	VL 6C8 CDR-L3	Residuos 93-101 de ID de SEC No.: 59	QQNNENPRT
60	VH 5D3		QVQLKESGPGGLVAPSQSL SITCTVSGFSLT GYNINWVRQPPGKGLEWLGLIWGDGNTAFN SALKSRLSISKDNSKSQVFLKLNSLQTD DTARYYCARDGYYPYAIKYWGOGTSVTVSS
	VH 5D3 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.: 60	GYNIN
	VH 5D3 CDR-H2	Residuos 50-65 de ID de SEC No.: 60	LIWGDGNTAFNSALKS
	VH 5D3 CDR-H3	Residuos 98-107 de ID de SEC No.: 60	DGYYPYAIKY
61	VL 5D3		NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASETVD SYGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLES GVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATY YCCQQNNEDPRTFGGGTKLEIKR
	VL 5D3 CDR-L1	Residuos 24-38 de ID de SEC No.: 61	RASETVD SYGNSFMH
	VL 5D3 CDR-L2	Residuos 54-60 de ID de SEC No.: 61	LASNLES
	VL 5D3 CDR-L3	Residuos 93-101 de ID de SEC	QQNNEDPRT

		No.: 61	
62	VH 8B6		QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLT GHNINWVRQPPGKGLEWLGMIWGDGNTDFN SALKSRLSISKDNSKSQVFLKLNSLQTDDT ARYYCARDGYYPYAIKFWGOGTSVTVSS
	VH 8B6 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.: 62	GHNIN
	VH 8B6 CDR-H2	Residuos 50-65 de ID de SEC No.: 62	MIWGDGNTDFNSALKS
	VH 8B6 CDR-H3	Residuos 98-107 de ID de SEC No.: 62	DGYYPYAIKF
63	VL 8B6		HIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASETVD SYGSSFLHWYQQKPGQPPKLLIYLASKLES GVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATY YCQNNNEGPRTFGGGSKLEIKR
	VL 8B6 CDR-L1	Residuos 24-38 de ID de SEC No.: 63	RASETVD SYGSSFLH
	VL 8B6 CDR-L2	Residuos 54-60 de ID de SEC No.: 63	LASKLES
	VL 8B6 CDR-L3	Residuos 93-101 de ID de SEC No.: 63	QQNNEGPR

Las anteriores secuencias de CDR del anticuerpo anti-IL-13 aislado establecen una nueva familia de proteínas de unión a IL-13, aisladas de acuerdo con esta invención, y comprendiendo polipéptidos que incluyen las secuencias de CDR listadas más adelante en la Tabla 6. Para generar y seleccionar las CDR de la invención que tienen actividad de unión y/o neutralización preferencial por IL-13 con respecto a hIL-13 y o hIL-13, se pueden utilizar métodos estándares conocidos en el arte previo para generar proteínas de unión de la presente

invención y evaluar las características de unión y/o neutralización de IL-13 y o IL-13 de esas proteínas de unión, incluyendo pero no limitado a aquellos descritos específicamente aquí.

Tabla 6: Ligandos consenso de afinidad a CDR de IL-13 (se listan residuos alternativos posteriormente a cada posición de aminoácido; - indica que el residuo puede estar ausente).

5

Región CDR	Identificador de secuencia	Secuencia consenso															
CDR-H1	ID de SEC No.:64	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇									
		T	S	D	M	G	V	D									
		D			S	W	I	H									
		G			Y	Y	M	S									
		S			L	A		Y									
CDR-H2	ID de SEC No.:65				H	S											
		M	I	H	P	S	D	S	E	T	R	L	N	Q	K	F	K
		E	-	Y	S	G	G	Y	N	I	Y	Y	P	E	M	L	R
		H		A	W	E	S	G	Y	K	I	D	S	D	S	V	Q
		R		D	G	D	E		V		D	F	D	P	T	M	
CDR-H3	ID de SEC No.:66																
		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	X ₁₄	X ₁₅	X ₁₆
		W	R	T	S	Y	F	S	D	Y	G		Y	F	D	Y	
		T	A	F	T	F	Y	Y	L				A	M	V	F	
		G	S	Y	Y	G		I	Y				P	S	N		
CDR-L1	ID de SEC No.:67																
		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	X ₁₄	X ₁₅	X ₁₆
		K	S	S	Q	N	L	L	Y	S	S	N	Q	K	N	Y	L
		R	A	T	K	S	T	Q	N	I	D	G		F	T	F	A
					I	T	S	V	H	T	N			N	S		M
CDR-L1	ID de SEC No.:67																
					G				D		H			E			H
					E				T		Y			S			N

CDR-L2	ID de SEC No.:68	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇		
		L	V	S	N	R	F	S		
		S	T	N	K	L	D	P		
		K	A		T	K	E	R		
		T			R		H			
		W			M		A			
		Y					P			
CDR-L3	ID de SEC No.:69	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉
		F	Q	H	N	Y	L	P	L	T
		W	L	G	S	T	V	H	F	V
		Q		Y	T	S	F		Y	
		A		W	Y	E	Y		W	
				N	L	H	N		R	
							G			
					D					
					P					

2. Anticuerpos quiméricos Anti IL-13

Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones del anticuerpo se derivan de diferentes especies animales, tales como anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo murino monoclonal y una región constante de inmunoglobulina humana. Se conocen métodos para producir anticuerpos quiméricos en el arte previo y se discuten en detalle en el Ejemplo 2.1. Ver e.g., Morrison, Science 229: 1202 (1985); Oi y cols., BioTechniques 4:214 (1986); Gillies y cols., (1989) J. Immunol. Methods 125:191-202; Patentes E.U. Nos. 5,807,715; 4,816,567; y 4,816,397, que se incluyen aquí en su totalidad por referencia. Adicionalmente, se pueden utilizar técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison y cols., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855; Neuberger y cols., 1984, Nature 312:604-608; Takeda y cols., 1985, Nature 314:452-454 que son incorporadas aquí en su totalidad por referencia) mediante empalme de genes de una molécula de anticuerpo de ratón con una especificidad antigénica apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano con una actividad biológica apropiada.

En una realización, los anticuerpos quiméricos de la invención se producen mediante reemplazo de la región constante de cadena pesada de los anticuerpos monoclonales murinos anti IL-13 humana descritos en la sección 1 con una región constante IgG1 humana. En una realización específica el anticuerpo quimérico de la invención comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID DE SEC NO.: 34; ID DE SEC

98

NO.: 36; ID DE SEC NO.: 41; ID DE SEC NO.: 42; ID DE SEC NO.: 46 y una región variable de cadena liviana (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID DE SEC NO.: 35; ID DE SEC NO.: 37; ID DE SEC NO.: 40; ID DE SEC NO.: 43; or SEQ E) NO: 47.

5 3. Anticuerpos humanizados Anti IL – 13

Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos de anticuerpo de especies no-humanas que se une al antígeno deseado que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las especies no-humanas y regiones del marco de una molécula de inmunoglobulina humana. Se

10 revelan secuencias Ig humanas conocidas, e.g., en www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.anticuerporesource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.edu/.about.pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Anticuerpo.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/mikeimages.html; www.anticuerporesource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html; www.immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.html; www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html; www.nal.usda.gov/awic/pubs/anticuerpo/; www.m.ehime-u.ac.jp/.about.yasuhito/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html; www.biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html; www.isac-net.org/sites_geo.html; aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEP-Start.html; baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/links1.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html; anticuerpo.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.unizh.ch/.about.honegger/AHOseminar/SlideOI.html; www.cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/humanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/.about.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html; www.jerini.de/fr/products.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html. Kabat y cols., Secuencias de Proteínas de Interés

Inmunológico, Departamento de Salud de E.U. (1983), cada una incorporada aquí en su totalidad por referencia. Tales secuencias importadas pueden utilizarse para reducir la inmunogenicidad o reducir, mejorar o modificar la unión, afinidad, asociación, disociación, avidez, especificidad, vida media, o alguna otra característica apropiada, como se conoce en el arte previo.

Se pueden sustituir los residuos del marco en las regiones del marco humano con los correspondientes residuos del anticuerpo donador de CDR para alterar, preferiblemente mejorar, la unión a antígeno. Estas sustituciones del marco se identifican mediante métodos bien conocidos en el arte previo, e.g., mediante modelamiento de interacciones del CDR y los residuos del marco para identificar residuos del marco importantes para la unión a antígeno y comparaciones de secuencias para identificar residuos del marco inusuales en posiciones particulares (Ver, e.g., Queen y cols., Patente E.U. No. 5,585,089; Riechmann y cols., Nature 332:323 (1988), que se incorporan aquí en sus totalidad por referencia.) Hay modelos tridimensionales de inmunoglobulinas comunmente disponibles y familiares para las personas versadas en la materia. Hay programas de computadora disponibles que ilustran y EXHIBEN estructuras conformacionales tridimensionales probables de las secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estos DISPLAYS permite el análisis del rol probable de los residuos en el funcionamiento de las secuencias de inmunoglobulinas candidatas, i.e., el análisis de los residuos que influyen la habilidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, se pueden seleccionar y combinar los residuos FR desde las secuencias consenso e IMPORTE de manera tal que se alcance la característica deseada del anticuerpo, tal como afinidad aumentada por el(los) antígeno(s) objetivo. En general, los residuos CDR están directa y más sustancialmente involucrados en influenciar la unión a antígeno. Los anticuerpos pueden ser humanizados utilizando una variedad de técnicas conocidas en el arte previo, tales como pero no limitadas a aquellas descritas en Jones y cols., Nature 321:522 (1986); Verhoeyen y cols., Science 239:1534 (1988)), Sims y cols., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta y cols., J. Immunol. 151:2623 (1993), Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka y cols., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska. et al. , PNAS 91:969-973 (1994); PCT publication WO 91/09967, PCT/: US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134,

GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246, EP 592,106; EP 519,596, EP 239,400, Patente E.U. Nos. 5,565,332, 5,723,323, 5,976,862, 5,824,514, 5,817,483, 5,814,476, 5,763,192, 5,723,323, 5,766,886, 5,714,352, 6,204,023, 6,180,370, 5,693,762, 5,530,101, 5,585,089, 5,225,539; 4,816,567, cada una de las cuales es incorporada en su totalidad por referencia, incluyendo las referencias allí citadas.

C. Producción de anticuerpos y líneas celulares productoras de anticuerpo

Preferiblemente, los anticuerpos anti-IL-13 de la presente invención, exhiben una alta capacidad para reducir o neutralizar la actividad de IL-13, e.g., como se evalúa mediante cualquiera de varios ensayos in vitro e in vivo conocidos en el arte previo (e.g., ver Ejemplo 1.1.C). Por ejemplo, estos anticuerpos neutralizan la producción de TARC inducida por IL-13 mediante células A-549 con valores de IC₅₀ en el rango o por lo menos aproximadamente de 10⁻⁸M, alrededor de 10⁻⁹ M, o alrededor de 10⁻¹⁰M.

En las realizaciones preferidas, el anticuerpo aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, se une a la IL-13 humana, en donde el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, se disocia de la IL-13 humana con una constante de velocidad k_{off} de alrededor de 0.1s⁻¹ o menos, como se determina mediante resonancia de plasmon de superficie, o que inhibe la IL-13 humana y/o la actividad de IL-13 humana con un IC₅₀ de alrededor de 1 x 10⁻⁶M o menos. Alternativamente, el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, puede disociarse de la IL-13 humana con una constante de velocidad k_{off} de alrededor de 1 x 10⁻²s⁻¹ o menos, como se determina por resonancia de plasmon de superficie, o puede inhibir la IL-13 y/o actividad de IL-13 humana con un IC₅₀ de alrededor de 1 x 10⁻⁷M o menos. Alternativamente, el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, puede disociarse de la IL-13 humana con una constante de velocidad k_{off} de alrededor de 1 x 10⁻³s⁻¹ o menos, como se determina por resonancia de plasmon de superficie, o puede inhibir la IL-13 y/o actividad de IL-13 humana con un IC₅₀ de aproximadamente de 1 x 10⁻⁸M o menos. Alternativamente, el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, puede disociarse de la IL-13 humana con una constante de velocidad k_{off} de alrededor de 1 x 10⁻⁴s⁻¹ o menos, como se determina por resonancia de plasmon de superficie, o puede inhibir la IL-13 y/o actividad de IL-13 humana con un IC₅₀ de alrededor de 1 x 10⁻⁹M o menos. Alternativamente, el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, puede disociarse de la IL-13 humana con una constante de velocidad k_{off} de alrededor de 1 x 10⁻⁵s⁻¹ o menos, como se

determina por resonancia de plasmon de superficie, o puede inhibir la IL-13 y/o actividad de IL-13 humana con un IC_{50} de alrededor de $1 \times 10^{-10}M$ o menos. Alternativamente, el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, puede disociarse de la IL-13 humana con una constante de velocidad k_{off} de
5 alrededor de $1 \times 10^{-5}s^{-1}$ o menos, como se determina por resonancia de plasmon de superficie, o puede inhibir la IL-13 y/o actividad de IL-13 humana con un IC_{50} de alrededor de $1 \times 10^{-11}M$ o menos.

La IL-13 ejerce sus acciones mediante unión al receptor de IL-13 (IL-13R) sobre la superficie de la célula, el heterodímero compuesto de la cadena IL-13R α 1 (IL-
10 13R α 1) y la cadena IL-4R (IL-4R). La IL-13 se une primero al IL-13R α 1 con baja afinidad ($KD = 2-10$ nM) y luego recluta la IL-4R al complejo, generando un receptor de alta afinidad ($KD = 0.03-0.4$ nM) (Aman, M. J., et al . 1996 J. Biol. Chem. 271, 29265-29270; Miloux, et al . 1997 FEBS Lett. 401, 163-166; Andrews, et al 2002 J. Biol. Chem. 277, 46073-46078). La heterodimerización de la IL-13R
15 provoca la activación de las quinasas de Janus, TYK2 y JAK1, constitutivamente asociadas con la IL-13R α 1 y la IL-4R, respectivamente, seguida de la activación del transductor de señal y activador de la transcripción 6 (STAT6) (Izuhara, K., y Arima, K. 2004 Drug News Perspect. 17, 91-98). Hay otra unidad de unión a IL-1, la cadena EL- 13R α 2 (IL-13R α 2), que se une a la IL-13 con alta afinidad (0.25-1.2
20 nM) (Caput, et al 1996 J. Biol. Chem. 271, 16921-16926; Donaldson et al 1998 J. Immunol. 161, 2317-2324). No se conoce ninguna otra molécula receptora involucrada en el complejo IL-13 IL-13R2. Se creyó en un inicio que la IL-13R2 actuaba como un receptor señuelo no señalizador. Sin embargo, se descubrió posteriormente que puede unirse a la IL-13 y enviar una señal a través de la ruta
25 AP-1, llevando a la producción de TNF-beta en ciertos tipos de células incluyendo macrófagos, lo que en último término conduce a fibrosis pulmonar (Fichtner-Feigl, 2006 Nat Med 12:99-106). En consecuencia ambas rutas IL-13R α 1/IL-4R α y IL-13R α 2 contribuyen a la patofisiología general del asma y otras afecciones pulmonares inflamatorias. Por lo tanto, un anticuerpo anti-IL-13 terapéutico que
30 bloquea la unión de la IL-13 a ambos receptores será más efectivo que aquellos que bloqueen un solo receptor.

Hemos aislado anticuerpos monoclonales que bloquean la unión de la IL-13 tanto a la IL-13R α 1 como a la IL-13R α 2. Tanto los ensayos de unión al receptor basados en ELISA como los ensayos de unión a IL-13 con etiquetado de 125-I
35 sobre la superficie celular demostraron que el 13C5, tanto en la versión murina como en la humanizada (i.e. 13C5.5), fueron capaces de bloquear efectivamente

la unión de la IL-13 a ambos receptores. Anticuerpos en el mismo linaje que el 13C5, incluyendo 25C8 y 33C3, también fueron capaces de bloquear la unión de la IL-13 a ambos receptores. El mapeo de epítopes de 13C5 indicó que su(s) sitio(s) de unión incluye(n) la región de hélice D c-terminal de la IL-13 humana (residuos VRDTK IEVAQ FVKDL LLHLK KLFRE GR, que corresponden a los aminoácidos 104-130 de la SEC ID NO. 1). Se ha propuesto que la región de hélice D c-terminal está involucrada en interacciones con el receptor IL-13 (Zuegg et al 2001 Immunol Cell Biol. 79:332-9). La estructura cristalina de la IL-13 humana acomplejada con la porción Fab del anticuerpo 13C5.5 indicó que el 13C5.5 se une tanto a la región de hélice C-terminal como a la región de hélice A N-terminal de la IL-13 humana. Preferiblemente el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo se une a la IL-13 humana de manera tal que la IL-13 con ese anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, unido al epítipo definido por las regiones topográficas Ser26-Thr27-Ala28-Leu29-Arg30-Glu31-Leu32-Ile33-Glu34- Glu35-Leu36-Val37-Asn38 y Lys123-Lys124-Leu125-Phe126-Arg127-Glu-128-Gly129-Arg130 de la SEC ID NO. 1 se ve inhibido de unirse al receptor de IL-13. Preferiblemente el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo se une a la IL-13 humana de manera tal que la IL-13 con ese anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, unido al epítipo definido por las regiones topográficas Arg30- Glu31-Leu32-Ile33-Glu34-Glu35-Leu36-Val37-Asn38 y Lys123-Lys124-Leu125-Phe126- Arg127 de la SEC ID NO. 1 se ve inhibido de unirse al receptor de IL-13 α 2.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada, tal como una región constante IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD. Preferiblemente, la región constante de cadena pesada es una región constante de cadena pesada IgG1 o una región constante de cadena pesada IgG4. Además, el anticuerpo puede comprender una región constante de cadena liviana, bien sea una región constante de cadena liviana kappa o una región constante de cadena liviana lambda. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una región constante de cadena liviana kappa. Alternativamente, la porción de anticuerpo puede ser, por ejemplo, un fragmento Fab o un fragmento Fv de cadena sencilla.

En el arte previo se conocen reemplazos en los residuos de aminoácidos en la porción Fc para alterar la función efectora del anticuerpo (Winter, et al Patentes E.U. NOS 5,648,260; 5624821). La porción Fc de un anticuerpo media varias funciones efectoras importantes e.g. inducción de citoquinas, ADCC, fagocitosis,

citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y vida media/ tasa de depuración de los anticuerpos y complejos antígeno-anticuerpo. En algunos casos estas funciones efectoras son deseables para anticuerpos terapéuticos pero en otros casos puede ser innecesaria o incluso deletérea, dependiendo de los objetivos terapéuticos. Ciertos isotipos de IgG humana, particularmente IgG1 e IgG3, median la ADCC y la CDC via unión a FcγRs y Clq complementaria, respectivamente. Los receptores neonatales Fc (FcRn) son los componentes críticos que determinan la vida media de circulación de los anticuerpos. En otra realización más al menos un residuo de aminoácido es reemplazado en la región constante del anticuerpo, por ejemplo en la región Fc del anticuerpo, de manera tal que se alteran las funciones efectoras del anticuerpo.

Una realización provee una proteína de unión etiquetada en donde un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención es derivatizada o enlazada a otra molécula funcional (e.g., otro péptido o proteína). Por ejemplo, una proteína de unión etiquetada de la invención puede ser derivada mediante enlazamiento funcional a un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención (por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no-covalente o de alguna otra manera) a una o más entidades moleculares diferentes, tales como otro anticuerpo (e.g., un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que puede mediar la asociación del anticuerpo o porción del anticuerpo con otra molécula (tal como una región nuclear de estreptavidina o una marcación de polihistidina).

Los agentes detectables útiles con los que un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención puede ser derivatizado incluyen compuestos fluorescentes. Los agentes fluorescentes ejemplares incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalensulfonilo, ficoeritrina y similares. También se puede derivatizar un anticuerpo con enzimas detectables, tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano, glucosa oxidasa y similares. Cuando un anticuerpo es derivatizado con una enzima detectable, es detectado mediante adición de reactivos adicionales que la enzima utiliza para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando el agente detectable peroxidasa de rábano está presente, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es detectable. Un anticuerpo puede además ser derivatizado con biotina, y detectado a través de la medición indirecta de unión a avidina o estreptavidina.

Otra realización de la invención provee una proteína de unión cristalizada. Preferiblemente la invención está relacionada con cristales de anticuerpos anti-IL-13 completos y fragmentos de los mismos como está revelado aquí, y formulaciones y composiciones que comprenden tales cristales. En una
5 realización la proteína de unión cristalizada tiene una mayor vida media in vivo que la contraparte soluble de la proteína de unión. En otra realización la proteína de unión conserva su actividad biológica después de la cristalización.

La proteína de unión cristalizada puede ser producida de acuerdo a los métodos conocidos en el arte previo como se revela en WO 02072636, incorporado aquí
10 por referencia.

Otra realización de la invención provee una proteína de unión glicosilada en donde el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo comprende uno o más residuos de carbohidrato. La proteína emergente in vivo puede sufrir procesamiento posterior, conocido como modificación post-translacional. En
15 particular, se pueden adicionar residuos de azúcar (glicosil) enzimáticamente, proceso conocido como glicosilación. Las proteínas resultantes que llevan cadenas laterales de oligosacáridos unidas covalentemente se conocen como proteínas glicosiladas o glicoproteínas. Los anticuerpos son glicoproteínas con uno o más residuos de carbohidratos en el dominio Fc, así como el dominio
20 variable. Los residuos de carbohidrato en el dominio Fc tienen un importante efecto en la función efectora del dominio Fc, con un efecto mínimo en la vida media de unión a antígeno del anticuerpo (R. Jefferis, Biotechnol. Prog. 21 (2005), pp. 11-16). En contraste, la glicosilación del dominio variable puede tener un efecto en la actividad de unión a antígeno del anticuerpo. La glicosilación en el
25 dominio variable puede tener un efecto negativo en la afinidad de unión del anticuerpo, probablemente debido a impedimento estérico (Co, M.S., y cols., Mol. Immunol. (1993) 30:1361- 1367), o resultar en un aumento de afinidad por el antígeno (Wallick, S.C., y cols., Exp. Med. (1988) 168:1099-1109; Wright, A., y cols., EMBO J. (1991) 10:2717 2723).

30 Un aspecto de la presente invención está dirigido a generar mutantes del sitio de glicosilación en los que el sitio de glicosilación O- o N-enlazado de la proteína de unión ha sido mutado. Una persona versada en la materia puede generar tales mutantes utilizando tecnologías estándares y bien conocidas. Los mutantes del sitio de glicosilación que conservan su actividad biológica pero disminuyen su
35 actividad de unión son otro objeto de la presente invención.

En otra realización, se modifica la glicosilación del anticuerpo o porción de unión de la invención. Por ejemplo, se puede fabricar un anticuerpo aglicosilado (i.e. el anticuerpo no tiene glicosilación. Se puede alterar la glicosilación para, por ejemplo, incrementar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tales modificaciones de los carbohidratos se pueden lograr, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, puede lograrse que una o más sustituciones de aminoácidos resulten en la eliminación de una o más sitios de glicosilación en la región variable, para así eliminar la glicosilación de ese sitio. Tal aglicosilación puede incrementar la afinidad de un anticuerpo por el antígeno. Tal aproximación se describe con mayor detalle en la Publicación PCT WO2003016466A2, y patentes E.U. Nos. 5,714,350 y 6,350,861, cada una de las cuales es incorporada aquí en su totalidad por referencia.

Adicionalmente o alternativamente, puede hacerse un anticuerpo modificado de la invención que tenga un tipo de glicosilación alterado, como un anticuerpo hipofucosilado que tenga cantidades reducidas de residuos de fucosil o un anticuerpo que tenga estructuras bisectantes de GlcNac. Tales patrones alterados de glicosilación han demostrado que incrementan la habilidad ADCC de anticuerpos. Tales modificaciones de carbohidratos pueden llevarse a cabo, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula huésped con una maquinaria de glicosilación alterada. Células con maquinaria de glicosilación alterada ha sido descrita en el arte y puede usarse como células de cuerpo hospedero en las que se expresan anticuerpos recombinantes de la invención para luego producir un anticuerpo con glicosilación alterada. Véase, por ejemplo, Shields, R. L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umaña et al. (1999) Nat. Biotech. 17: 176-1, así como también, Patente Europea No: EP 1,176,195; PCT Publicaciones WO 03/035835; WO 99/54342 80, cada una de las cuales están incorporadas aquí por referencia en su integridad.

La glicosilación de proteínas depende de la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés, así como la célula huésped en la cual la proteína se expresa. Diferentes organismos pueden producir diferentes enzimas de glicosilación (eg, glicosiltransferasas y glicosidasas) y tienen diferentes sustratos (azúcares de nucleótidos) disponibles. Debido a tales factores, el patrón de glicosilación de proteínas, y la composición de residuos glicosilos, pueden diferir dependiendo del sistema hospedero en el cual la proteína se expresa. Los residuos glicosilo útiles en la invención pueden incluir pero no están limitados a glucosa, galactosa,

manosa, fucosa, n-acetilglucosamina y ácido siálico. Preferiblemente la proteína glicosilada de unión comprende residuos de glicosilo tal que el patrón de glicosilación es humano.

Es conocido por los entendidos en el arte que la glicosilación diferencial de proteína puede resultar en características diferenciales de proteínas. Por ejemplo, la eficacia de una proteína terapéutica producida por un microorganismo hospedero, como levadura, y glicosilada empleando la vía endógena de la levadura puede ser reducida comparada a la de la misma proteína expresada en una célula de mamífero, como la línea celular CHO. Tales glicoproteínas pueden también ser inmunogénicas en humanos y muestran reducida vida media in vivo después de su administración. Receptores específicos en humanos y otros animales pueden reconocer residuos glicosilo y promover la remoción rápida de la proteína del torrente sanguíneo. Otros efectos adversos pueden incluir cambios en el plegamiento de la proteína, solubilidad, susceptibilidad a proteasas, tráfico, transporte, compartimentación, secreción, reconocimiento por otras proteínas o factores, antigenicidad o alergenidad. De acuerdo a eso, un practicante puede preferir una proteína terapéutica con una composición específica y patrón de glicosilación, por ejemplo composición de glicosilación y patrón idéntico, o al menos similar, que al producido en células humanas o en las células especie-especie del sujeto animal deseado.

Expresar proteínas glicosiladas diferentes de las de una célula hospedero puede llevarse a cabo modificando genéticamente la célula hospedero para expresar enzimas de glicosilación heterólogas. Usando técnicas conocidas en el arte un practicante puede generar anticuerpos o porciones de unión a antígeno que por lo tanto exhiben glicosilación de proteína humana. Por ejemplo, cepas de levadura que han sido genéticamente modificadas para expresar enzimas de glicosilación que no son producidas naturalmente como proteínas glicosiladas (glicoproteínas) producidas en estas cepas de levadura muestran glicosilación de proteínas idéntica a la de las células animales, especialmente células humanas (U.S patent applications 20040018590 and 20020137134 and PCT publication WO2005100584 A2).

Además de las proteínas de unión, la presente invención también está dirigida a un anticuerpo específico anti-idiotípico (anti-Id) para tales proteínas de unión de la invención. Un anticuerpo anti-Id es un anticuerpo que reconoce determinantes únicas, generalmente asociadas con la región de unión de antígeno de otro anticuerpo. El anti-Id puede prepararse inmunizando un animal con la proteína de

anticuerpo. El anti-I_d puede prepararse inmunizando un animal con la proteína de unión o una región de ella que contiene CDR. El animal inmunizado reconocerá y responderá a las determinantes idiotípicas del anticuerpo inmunizado y produce un anticuerpo anti-I_d. El anticuerpo anti-I_d puede también usarse como
5 "inmunogen" para inducir una respuesta inmune en otro animal, produciendo el llamado anticuerpo anti-anti-I_d.

Adicionalmente, será apreciado por una persona versada en la materia que una proteína de interés puede expresarse usando una librería de células huésped genéticamente diseñada para expresar varias enzimas de glicosilación, de tal
10 manera que las células huésped miembros de la librería produce la proteína de interés con varios patrones de glicosilación. Un practicante puede entonces seleccionar y aislar las proteínas de interés con patrones particulares novedosos de glicosilación. Preferiblemente, la proteína que tenga un patrón de glicosilación seleccionado novedoso muestra propiedades alteradas o mejoradas.

15 **D. Usos de Anticuerpos Anti-IL-13**

Dada su habilidad para unirse a la IL-13 humana, los anticuerpos anti-humanos IL-13 o porciones del mismo de la invención pueden usarse para detectar IL-13 humana (eg., En una muestra biológica, como suero o plasma), usando un inmunoensayo convencional, como un ensayo inmunoabsorbente unido a enzima
20 (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica de tejido. La invención provee un método para detectar IL-13 humana en una muestra biológica que comprende contactar una muestra biológica con un anticuerpo (o porción de anticuerpo) unido a la IL-13 humana o anticuerpo sin unir (o porción de anticuerpo), para por lo tanto detectar IL-13 humana en la muestra biológica. El
25 anticuerpo está directa o indirectamente marcado con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o sin unir. Sustancias detectables ajustables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radioactivos. Ejemplos de enzimas ajustables incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, o
30 acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupo prostético ajustables incluyen estreptavidina/biotina y avidina biotina; ejemplos de materiales fluorescentes ajustables incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato, rodamina, fluoresceína de diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de material luminiscente incluye el luminol; y ejemplos de material radioactivo
35 ajustable incluye ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho ,

o ^{153}Sm .

Alternativo a marcar el anticuerpo, la IL-13 humana puede medirse en fluidos biológicos por un inmunoensayo de competición utilizando estándares de rhIL-13 marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo anti-IL-13 humana sin
5 marcar. En este ensayo, la muestra biológica, los estándares marcados de rhIL-13 y el anticuerpo anti-IL13 humana se combinan y se determina la cantidad de estándar de rhIL-13 humana unida al anticuerpo sin marcar. La cantidad de IL-13 humana en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de estándar de rhIL-13 marcado unido al anticuerpo anti-IL-13. Similarmente, IL-13
10 humana puede medirse en fluidos biológicos por inmunoensayo de competencia utilizando estándares marcados rhIL-13 con una sustancia detectable y un anticuerpo sin marcar anti-IL-13 humana.

Los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la invención preferiblemente son capaces de neutralizar la actividad de DL-13 tanto in vivo como in vitro. De
15 acuerdo a esto, tales anticuerpos y porciones de anticuerpo de la invención puede usarse para inhibir la actividad de hIL-13, es decir, en un cultivo celular que contiene hIL-13, en sujetos humanos o en otros sujetos mamíferos que tengan hIL-13 con los cuales un anticuerpo de la invención tiene una reacción cruzada. En una realización, la invención provee un método para inhibir la actividad de hIL-
20 13 que comprende contactar hIL-13 con un anticuerpo o una porción de un anticuerpo de la invención tal que la actividad de hIL-13 se inhibe. Por ejemplo, en un cultivo celular que contiene o que se sospecha que contiene hIL-13, un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención puede añadirse al medio de cultivo para inhibir la actividad de hIL-13 en el cultivo.

25 En otra realización, la invención provee un método para reducir la actividad hIL-13 en un sujeto, ventajosamente de un sujeto que sufre una enfermedad o trastorno en el cual la actividad es perjudicial. La invención provee métodos para reducir la actividad hIL-13 en un sujeto que sufra un trastorno o enfermedad tal, cuyo método comprende administración al sujeto de un anticuerpo o una porción del
30 anticuerpo de la invención tal que la actividad de IL-13 en el sujeto es reducida. Preferiblemente, la IL-13 es IL-13 humana, y el sujeto es un sujeto humano. Alternativamente, el sujeto puede ser mamífero que exprese una IL-13 a la cual un anticuerpo de la invención es capaz de unirse. Adicionalmente el sujeto puede ser un mamífero al cual se le ha introducido IL-13 (es decir, por administración de
35 IL-13 o expresión de un transgen de IL-13). Un anticuerpo de la invención puede

administrarse a un sujeto humano para propósitos terapéuticos. Además, un anticuerpo de la invención puede administrarse a un mamífero no humano que exprese una IL-13 con la cual el anticuerpo es capaz de unirse para propósitos veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. Sobre ésta última, tales modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de anticuerpos de la invención (es decir, pruebas de dosis y curvas de tiempo de administración).

Como se usa aquí, el término "un trastorno en el cual la actividad IL-13 es perjudicial" se desea incluir enfermedades y otros desórdenes en los cuales la presencia de IL-13 en un sujeto que sufre del trastorno ha sido mostrada de ser o se sospecha que es ya sea responsable por la patofisiología del trastorno o un factor que contribuye a empeorar el trastorno. De acuerdo a eso, un trastorno en el que la actividad de IL-13 es perjudicial es un trastorno en el que la reducción de la actividad de IL-13 se espera que alivie los síntomas y/o la progresión del trastorno. Tales desórdenes pueden evidenciarse, por ejemplo, por un incremento en la concentración de IL-13 en un fluido biológico de un sujeto que sufra del trastorno (es decir, un incremento en la concentración de IL-13 en suero, plasma, fluido sinovial, etc del sujeto), el cual puede detectarse, por ejemplo, usando un anticuerpo anti-IL-13 como se describe arriba. Ejemplos de desórdenes no limitantes que pueden tratarse con los anticuerpos de la invención incluyen aquellos desórdenes discutidos en la sección abajo pertinente a composiciones farmacéuticas de los anticuerpos de la invención.

La IL-13 ha estado implicada con un rol pivotal en causar respuestas biológicas asociadas con el asma. Sin embargo, otros mediadores de las vías inmunológicas diferenciales están también involucradas en la patogénesis del asma, bloqueo de estos mediadores, además de la IL-13, puede ofrecer beneficios terapéuticos adicionales. Por lo tanto, las proteínas de unión de la invención pueden incorporarse a proteínas DVD-Ig donde en el DVD es capaz de unir pares blanco incluyendo, pero no limitándose a, IL-13 y una citoquina pro-inflamatoria, como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α). Puede amplificar la respuesta inflamatoria en asma y puede estar unido a la severidad de la enfermedad (McDonnell, y cols., Progress in Respiratory Research (2001), 31(New Drugs for Asthma, Allergy and COPD), 247-250.). Esto sugiere que bloquear tanto IL-13 y TNF- α , puede tener efectos benéficos, particularmente en enfermedad severa. En una realización preferida, la DVD-Ig de la invención se une a los blancos IL-13 y TNF- α y se usa para el tratamiento de asma.

En otra realización proteínas de unión de la invención pueden usarse para generar moléculas de DVD-Ig que unen IL-13 e IL-1 β , IL-13 e IL-9; IL-13 e IL-4; IL-13 e IL-5; IL-13 y DL-25; IL-13 y TARC; IL-13 y MDC; IL-13 y MIF; IL-13 y TGF- β ; IL-13 y un agonista de LHR; DL-13 y CL25; IL-13 y SPRR2a; IL-13 y SPRR2b; y DL-13 y ADAM8. La presente invención también provee DVD-Igs capaces de unirse a IL-13 y uno o más blancos involucrados en asma seleccionados del grupo que consiste en CSF1 (M-CSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (G-CSF), FGF2, IFN α , IFN β ; IFN γ , histamina y receptores de histamina, ELIA, DL1B, BL2, IL3, EL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12A, IL12B, IL14, IL15, IL16, IL17, IL18, EL19, IL-20, IL-21, IL-22, EL-23, EL-24, EL-25, IL-26, IL-27, EL-28, IL-30, EL-31, EL-32, IL-33, KITLG, PDGFB, IL2RA, EL4R, IL5RA, IL8RA, IL8RB, IL12RB1, IL12RB2, EL13RA1, IL13RA2, IL18R1, TSLP, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL22, CCL24, CX3CL1, CXCL1, CXCL2, CXCL3, XCL1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CX3CR1, GPR2, XCR1, FOS, GATA3, JAK1, JAK3, STAT6, TBX21, TGFB1, TNFSF6, YY1, CYSLTR1, FCER1A, FCER2, LTB4R, TB4R2, LTBR, y quitinasa.

D. Composición Farmacéutica

La invención también provee composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos de la invención son para usarse en, pero sin limitarse a, diagnóstico, detección, o monitoreo de un trastorno, en la prevención, tratamiento, manejo o para mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo, y/o en la investigación. En una realización específica, una composición comprende uno o más anticuerpos de la invención. En otra realización, la composición farmacéutica comprende uno o más anticuerpos de la invención y uno o más agentes terapéuticos o profilácticos diferentes a anticuerpos de la invención para tratar un trastorno en el cual la actividad de IL-13 es perjudicial. Preferiblemente, los agentes profilácticos o terapéuticos se sabe que son útiles para o que han sido o están siendo usados actualmente en la prevención, tratamiento, manejo, o para mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo. De acuerdo con estas realizaciones, la composición puede comprender adicionalmente un portador, diluyente o excipiente.

Los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la invención pueden ser incorporados en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración

a un sujeto. De manera típica, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se usa aquí, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacteriales y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, y similares que sean fisiológicamente compatibles. Ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptable incluyen uno o más de agua, solución salina, amortiguador de fosfato salino, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden comprender además cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsificantes, preservantes o amortiguadores, los cuales mejoran la vida en anaquel o la efectividad del anticuerpo o porción de anticuerpo.

Diversos sistemas de administración son conocidos y pueden usarse para administrar uno o más anticuerpos de la invención o la combinación de uno o más anticuerpos de la invención y un agente profiláctico o agente terapéutico útil para prevenir, manejar, tratar, o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo, e.g., encapsulamiento en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, endocitosis mediada por receptores (ver, e.g., Wu y Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral o de otro tipo, etc. Los métodos para administrar un agente profiláctico o terapéutico de la invención incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (e.g., intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), administración epidural, administración intratumoral, y administración en las mucosas (e.g., intranasal y rutas orales). Adicionalmente, puede emplearse administración pulmonar, e.g., mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente aerosolizante. Ver, e.g., las Patentes U.S. Nos. 6,019,968, 5,985,320, 5,985,309, 5,934,272, 5,874,064, 5,855,913, 5,290,540, y 4,880,078; y Publicaciones PCT Nos. WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, y WO 99/66903, cada una de las cuales es incorporada aquí por referencia en su totalidad. En una realización, un anticuerpo de la invención, terapia de combinación, o una composición de la invención es administrada usando la tecnología de administración de fármaco pulmonar Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.). En una realización

específica, los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención son administrados intramuscularmente, intravenosamente, intratumoralmente, oralmente, intranasalmente, pulmonarmente, o subcutáneamente. Los agentes profilácticos o terapéuticos se pueden administrar mediante cualquier ruta
5 conveniente, por ejemplo mediante infusión o inyección de bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (e.g., mucosa oral, rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

En una realización específica, puede ser deseable administrar los agentes
10 profilácticos o terapéuticos de la invención de manera local en el área en necesidad de tratamiento; esto puede lograrse mediante, por ejemplo, y no a manera de limitación, infusión local, mediante inyección, o mediante un implante, siendo dicho implante de un material poroso o no poroso, incluyendo membranas y matrices, tales como membranas silásticas, polímeros, matrices fibrosas (e.g.,
15 Tissuel®), o matrices de colágeno. En una realización, se administra una cantidad efectiva de uno o más anticuerpos de la invención de manera local en el área afectada a un sujeto para prevenir, tratar, manejar, y/o mejorar un trastorno o un síntoma del mismo. En otra realización, se administra una cantidad efectiva de uno o más anticuerpos de la invención de manera local al área afectada en
20 combinación con una cantidad efectiva de una o más terapias (e. g., uno o más agentes profilácticos o terapéuticos) diferentes a un anticuerpo de la invención a un sujeto para prevenir, tratar, manejar, y/o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo.

En otra realización, el agente profiláctico o terapéutico de la invención puede ser
25 administrada con un sistema de liberación controlada o sostenida. En una realización, puede usarse una bomba para lograr la liberación controlada o sostenida (ver Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwald y cols., 1980, Surgery 88:507; Saudek y cols., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos para lograr la
30 liberación controlada o sostenida de las terapias de la invención (ver e.g., Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen y Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger y Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; ver también Levy y cols.,
35 1985, Science 228: 190; During y cols., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard y cols., 1989, J. Neurosurg. 71:105); Patente U.S. No. 5,679,377; Patente U.S. No.

- 5,916,597; Patente U.S. No. 5,912,015; Patente U.S. No. 5,989,463; Patente U.S. No. 5,128,326; Publicación PCT No. WO 99/15154; y Publicación PCT No. WO 99/20253. Ejemplos de polímeros usados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, poli(2-hidroxietil metacrilato), poli(metil metacrilato), poli(ácido acrílico), poli(etileno-co-vinil acetato), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(vinil alcohol), poliacrilamida, poli(etilenglicol), poliláctidos (PLA), poli(láctido-co-glicólidos) (PLGA), y polioctoésteres. En una realización preferida, el polímero usado en una formulación de liberación sostenida es inerte, libre de impurezas filtrables, estable en el almacenamiento, estéril, y biodegradable. En otra realización, puede ponerse un sistema de liberación controlada o sostenida en las proximidades del objetivo profiláctico o terapéutico, requiriendo entonces solo una fracción de la dosis sistémica (ver, e.g., Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).
- 15 Los sistemas de liberación controlada se discuten en la revisión de Langer (1990, Science 249: 1527-1533). Puede usarse cualquier técnica conocida por una persona versada en la materia para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más agentes terapéuticos de la invención. Ver, e.g., Patente U.S. No. 4,526,938, Publicación PCT WO 91/05548, Publicación
- 20 PCT WO 96/20698, Ning y cols., 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39: 179-189, Song y cols., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long- Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397, Cleek y cols., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers
- 25 for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," Pro. Intl. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854, y Lam y cols., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," Proc. Intl. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759- 760, cada uno de los cuales se incorpora aquí por referencia en su totalidad.
- 30 En una realización específica, donde la composición de la invención es un ácido nucleico que codifica un agente profiláctico o terapéutico, el ácido nucleico puede ser administrado *in vivo* para promover la expresión de su agente profiláctico o terapéutico codificado, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo de tal manera que vuelva intracelular,
- 35 e.g., mediante el uso de un vector retroviral (ver Patente U.S. No. 4,980,286), o mediante inyección directa, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas

(e.g., una pistola de genes; Biolistic, Dupont), o recubrimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, o administrándolo en conjunto con un péptido tipo homeosecuencia que se sabe entra al núcleo (ver, e.g., Joliot y cols., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1864-1868). De manera

5 alternativa, un ácido nucleico puede introducirse de manera intracelular e incorporarse dentro del ADN de la célula huésped para la expresión mediante recombinación homóloga.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para ser compatible con su ruta de administración pretendida. Ejemplos de rutas de administración

10 incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral, e.g., intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, intranasal (e.g., inhalación), transdérmica (e.g., tópica), transmucosal, y rectal. En una realización específica, la composición se formula de acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa, subcutánea,

15 intramuscular, oral, intranasal, o tópica a los seres humanos. De manera típica, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en amortiguador acuoso isotónico estéril. Donde sea necesario, la composición puede incluir también un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaina para disminuir el dolor en el sitio de la inyección.

20 Si las composiciones de la invención se van a administrar tópicamente, pueden formularse en la forma de un ungüento, crema, parche transdérmico, loción, gel, champú, spray, aerosol, solución, emulsión, u otra forma bien conocida para una persona versada en la materia. Ver, e.g., Remington's Pharmaceutical Sciences an Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19ª Ed., Mack Pub. Co., Easton,

25 Pa. (1995). Para formas de dosis tópicas no aspersables, de manera típica se emplean formas viscosas a semisólidas o sólidas que comprenden un portador o uno o más excipientes compatibles con la aplicación tópica y que tienen una viscosidad dinámica preferiblemente mayor que la del agua. Formulaciones adecuadas incluyen, sin limitación, soluciones, suspensiones, emulsiones,

30 cremas, ungüentos, polvos, linimentos, salvas, y similares, los cuales, se desea, se esterilizan o se mezclan con agentes auxiliares (e.g., preservantes, estabilizantes, agentes humectantes, amortiguadores, o sales) para influenciar diversas propiedades, tales como, por ejemplo, presión osmótica. Otras formas de dosis tópica adecuadas, incluyen preparaciones de aerosol aspersables en donde

35 el ingrediente activo, preferiblemente en combinación con un portador sólido o líquido inerte, es empacado en una mezcla con un volátil presurizado (e.g., un

propulsor gaseoso, tal como un freón) o en una botella comprimible. También pueden adicionarse humectantes a las composiciones farmacéuticas y formas de dosis si se desea. Ejemplos de dichos ingredientes adicionales son bien conocidos en el arte.

- 5 Si el método de la invención comprende administración intranasal de una composición, la composición se puede formular en la forma de un aerosol, spray, atomizador o en la forma de gotas. En particular, los agentes profilácticos o terapéuticos para su uso de acuerdo con la presente invención pueden entregarse de manera conveniente en la forma de una presentación de aerosol de paquetes presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado (e.g., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado, la dosis unitaria puede determinarse al proveer una válvula para entregar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos (compuestos de, e.g., gelatina) para su uso en un inhalador o dispositivo de insuflación pueden ser formulados conteniendo una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

- [0257] Si el método de la invención comprende administración oral, las composiciones se pueden formular oralmente en la forma de tabletas, cápsulas, sobres, cápsulas de gel, soluciones, suspensiones, y similares. Las tabletas o cápsulas se pueden preparar mediante medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (e.g., almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona, o hidroxipropil metilcelulosa); agentes de relleno (e.g., lactosa, celulosa microcristalina, o hidrógeno fosfato de calcio); lubricantes (e.g., estearato de magnesio, talco, o sílice); desintegrantes (e.g., almidón de papa o glicolato sódico de almidón); o agentes humectantes (e.g., laurilsulfato de sodio). Las tabletas se pueden recubrir mediante métodos bien conocidos en el arte. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, pero sin limitarse a, soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden ser presentadas como un producto seco para la constitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Dichas preparaciones líquidas se pueden preparar mediante medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (e.g., jarabe de sorbitol, derivados de celulosa, o grasas hidrogenadas comestibles); agentes emulsificantes (e.g., lecitina o acacia); vehículos no acuosos (e.g., aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico, o aceites vegetales fraccionados); y preservantes (e.g.,

metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales de amortiguador, agentes saborizantes, colorantes y endulzantes según sea apropiado. Las preparaciones para administración oral pueden formularse de manera adecuada para liberación lenta, liberación controlada, o liberación sostenida de un(unos) agente(s) profiláctico(s) o terapéutico(s).

[0258] El método de la invención puede comprender administración pulmonar, e.g., mediante el uso de un inhalador o nebulizador, de una composición formulada con un agente aerosolizante. Ver, e.g., Patentes U.S. Nos. 6,019, 968, 5,985,320, 5,985,309, 5,934,272, 5,874,064, 5,855,913, 5,290,540, y 4,880,078; y Publicaciones PCT Nos. WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, y WO 99/66903, cada una de las cuales se incorpora aquí por referencia en su totalidad. En una realización específica, se administra un anticuerpo de la invención, terapia de combinación, y/o composición de la invención usando la tecnología de administración de fármaco pulmonar Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.).

El método de la invención puede comprender la administración de una composición formulada para administración parenteral mediante inyección (e.g., mediante inyección de bolo o infusión continua). Las formulaciones para inyección pueden ser presentadas en forma de dosis unitaria (e.g., en ampollas o en contenedores multidosis) con un preservativo adicionado. Las composiciones pueden tomar forma de suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes formulatorios tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. De manera alternativa, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado (e.g., agua estéril libre de pirógenos) antes del uso.

[0260] Los métodos de la invención pueden comprender adicionalmente la administración de composiciones formuladas como preparaciones de liberación lenta. Dichas formulaciones de larga acción pueden administrarse mediante implantes (e.g., subcutáneamente o intramuscularmente) o mediante inyección intramuscular. Entonces, por ejemplo, las composiciones se pueden formular con materiales poliméricos o hidrofóbicos adecuados (e.g., como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados ligeramente solubles (e.g., como una sal ligeramente soluble).

Los métodos de la invención abarcan la administración de composiciones formuladas como formas neutras o de sales. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con aniones tales como aquellas derivadas del ácido clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y
5 aquellas formadas con cationes tales como aquellas derivadas de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaina, etc.

[0262] Generalmente, los ingredientes de las composiciones son suministrados ya sea separadamente o se mezclan en la forma de dosis unitaria, por ejemplo,
10 como un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un contenedor sellado herméticamente tal como una ampolla o sobre que indica la cantidad de agente activo. Donde el modo de administración es infusión, la composición puede dispensarse con una botella de infusión que contiene solución salina o agua de grado farmacéutico, estéril. Donde el modo de administración sea
15 mediante inyección, puede proveerse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de tal manera que los ingredientes puedan mezclarse de manera previa a la administración.

En particular, la invención también provee que uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas de la invención se
20 empaca en un contenedor herméticamente sellado tal como una ampolla o sobre que indica la cantidad del agente. En una realización, se suministra uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas de la invención como un polvo liofilizado esterilizado seco o concentrado libre de agua en un contenedor herméticamente sellado y se puede reconstituir (e.g., con agua
25 o solución salina) hasta la concentración apropiada para la administración a un sujeto. Preferiblemente, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos o composiciones farmacéuticas de la invención se suministra como un polvo liofilizado estéril seco en un contenedor herméticamente sellado en una dosis unitaria de al menos 5 mg, más preferiblemente al menos 10 mg, al menos 15 mg,
30 al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg, al menos 75 mg, o al menos 100 mg. Los agentes terapéuticos o profilácticos liofilizados o composiciones farmacéuticas de la invención deben almacenarse entre 2°C y 8°C en su contenedor original y los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas de la invención deben ser administradas dentro de
35 1 semana, preferiblemente dentro de 5 días, dentro de 72 horas, dentro de 48 horas, dentro de 24 horas, dentro de 12 horas, dentro de 6 horas, dentro de 5

horas, dentro de 3 horas, o dentro de 1 hora después de su reconstitución. En una realización alternativa, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos o composiciones farmacéuticas de la invención se suministra en forma líquida en un contenedor herméticamente sellado que indica la cantidad y concentración del agente. Preferiblemente, la forma líquida de la composición administrada se suministra en un contenedor herméticamente sellado al menos 0.25 mg/ml, más preferiblemente al menos 0.5 mg/ml, al menos 1 mg/ml, al menos 2.5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/kg, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml o al menos 100 mg/ml.

10 La forma líquida debe almacenarse entre 2°C y 8°C en su contenedor original.

Los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la invención se pueden incorporar en una composición farmacéutica adecuada para la administración parenteral. Preferiblemente, el anticuerpo o porciones de anticuerpo se prepararán como una solución inyectable que contiene 0.1-250 mg/ml de anticuerpo. La solución inyectable puede estar compuesta ya sea de un líquido o forma de dosis liofilizada en un vial brillante o ámbar, ampolla o jeringa pre-llenada. El amortiguador puede ser L-histidina (1-50 mM), óptimamente 5-10mM, a pH 5.0 a 7.0 (óptimamente pH 6.0). Otros amortiguadores adecuados incluyen pero no se limitan a, succinato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio o fosfato de potasio. Se puede usar cloruro de sodio para modificar la toxicidad de la solución a una concentración de 0-300 mM (óptimamente 150 mM para una forma de dosis líquida). Se pueden incluir crioprotectores para una forma de dosis liofilizada, principalmente sacarosa 0-10% (óptimamente 0.5-1.0%). Otros crioprotectores adecuados incluyen trehalosa y lactosa. Pueden incluirse agentes de volumen para una forma de dosis liofilizada, principalmente manitol 1-10% (óptimamente 2-4%). Se pueden usar estabilizantes en formas de dosis tanto líquidas como liofilizadas, principalmente 1-50 mM de L-Metionina (óptimamente 5-10 mM). Otros agentes de volumen adecuados incluyen glicina, arginina, pueden incluirse como polisorbato-80 0-0.05% (óptimamente 0.005-0.01%). Tensioactivos adicionales incluyen pero no se limitan a polisorbato 20 y tensoactivos BRIJ. La composición farmacéutica que comprende los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la invención preparada como una solución inyectable para administración parenteral, pueden comprender además un agente útil como un adyuvante, tal como aquellos usados para incrementar la absorción, o dispersión de una proteína terapéutica (e.g., anticuerpo). Un adyuvante particularmente útil es hialuronidasa, tal como Hylenex® (hialuronidasa humana recombinante). La adición de hialuronidasa en la solución inyectable mejora la biodisponibilidad humana que sigue a la

administración parenteral, particularmente administración subcutánea. También permite mayores volúmenes de inyección en el sitio (i.e. mayores a 1 mL) con menor dolor e incomodidad, y mínima incidencia de reacciones en el sitio de inyección, (ver WO2004078140, US2006104968 incorporadas aquí por referencia).

Las composiciones de esta invención pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosis líquidas, semi-sólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (e.g., soluciones inyectables y para infusión), dispersiones o suspensiones, tabletas, píldoras, polvos, liposomas y supositorios.

La forma preferida depende del modo de administración pretendido y la aplicación terapéutica. Las composiciones preferidas típicas están en la forma de soluciones inyectables o para infusión, tales como composiciones similares a aquellas usadas para la inmunización pasiva de los humanos con otros anticuerpos. El modo de administración preferido es parenteral (e.g., intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular). En una realización preferida, el anticuerpo es administrado mediante inyección o infusión intravenosa. En otra realización preferida, el anticuerpo es administrado mediante inyección intramuscular o subcutánea.

De manera típica, las composiciones terapéuticas deben ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. Las soluciones estériles inyectables se pueden preparar incorporando el compuesto activo (i.e., anticuerpo o porción de anticuerpo) en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos a partir de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles, liofilizados para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son secado al vacío y secado por aspersión que da un polvo del ingrediente activo sumado a cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución del mismo previamente esterilizada por filtración. La fluidez apropiada de una solución puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos.

La absorción prolongada de composiciones inyectables puede ocurrir al incluir, en la composición, un agente que retarde la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la presente invención se pueden
5 administrar mediante una variedad de métodos conocidos en el arte, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, la ruta/modo de administración preferido es la inyección subcutánea, inyección intravenosa o infusión. Como apreciará la persona versada en la materia, la ruta y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. En algunas realizaciones, el compuesto
10 activo puede prepararse con un portador que protegerá el compuesto de la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas microencapsulados de administración. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, ácido poliláctico. Diversos métodos para la preparación de dichas
15 formulaciones se encuentran patentados o generalmente son conocidos por aquellos versados en la materia. Ver, e.g., *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención
20 puede ser administrado oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o un portador comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se desea) pueden también incluirse en una cápsula de gelatina de armazón duro o blando, comprimirse en tabletas, o incorporarse directamente en la dieta del sujeto. Para la administración terapéutica oral, los compuestos pueden ser incorporados con
25 excipientes y usados en la forma de tabletas ingeribles, tabletas bucales, pastillas, cápsulas, elíxires, suspensiones, jarabes, láminas, y similares. Para administrar un compuesto de la invención mediante administración diferente a parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o co-administrar el compuesto con, un material para prevenir su inactivación.

30 También pueden incorporarse compuestos activos suplementarios en las composiciones. En ciertas realizaciones, un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención se coformula con y/o se coadministra con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son útiles para tratar trastornos en los cuales la actividad de IL-13 es perjudicial. Por ejemplo, un anticuerpo anti-hIL-13 o porción
35 de anticuerpo de la invención puede ser coformulado y/o coadministrado con uno

o más anticuerpos adicionales que se unen a otros objetivos (e.g., anticuerpos que se unen a otras citoquinas o que se unen a moléculas de superficie celular). Adicionalmente, pueden usarse uno o más anticuerpos de la invención en combinación con dos o más de los agentes terapéuticos precedentes. Tales terapias de combinación pueden utilizar de manera ventajosa menores dosis de los agentes terapéuticos administrados, evitando de esta manera posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo a IL-13 o fragmento del mismo se une a un vehículo que extiende la vida media, que es conocido en el arte. Tales vehículos incluyen, pero no se limitan a, el dominio Fc, polietilenglicol, y dextrán. Tales vehículos se describen, e.g., en el No. de Serie de Solicitud U.S. 09/428,082 y solicitud PCT publicada No. WO 99/25044, las cuales se incorporan aquí por referencia para cualquier propósito.

En una realización específica, las secuencias de ácido nucléico que comprenden secuencias de nucleótido que codifican un anticuerpo de la invención u otro agente profiláctico o terapéutico de la invención se administran para tratar, prevenir, manejar, o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo mediante terapia génica. La terapia génica se refiere a la terapia que se realiza mediante la administración a un sujeto de un ácido nucléico expresado o expresable. En esta realización de la invención, los ácidos nucléicos producen su agente profiláctico o terapéutico o anticuerpo de la invención que media un efecto profiláctico o terapéutico.

Puede usarse cualquiera de los métodos para terapia génica disponibles en el arte, de acuerdo con la presente invención. Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, ver Goldspiel y cols., 1993, Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu y Wu, 1991, Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, Science 260:926- 932 (1993); y Morgan y Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217; May, 1993, TIBTECH 11(5): 155-215. Los métodos comúnmente conocidos en el arte de la tecnología de ADN recombinante que pueden ser usados, se describen en Ausubel y cols. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); y Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990). La descripción detallada de diversos métodos de terapia génica se revela en US20050042664 A1 la cual se incorpora aquí por referencia.

En otro aspecto, esta solicitud presenta un método para tratar (e.g., curar, suprimir, mejorar, retardar o prevenir el inicio de, o prevenir la recurrencia o recaída de) o prevenir un trastorno asociado a IL-13, en un sujeto. El método incluye: administrar al sujeto un agente de unión a IL- 13 (particularmente un

5 antagonista), e.g., un anticuerpo anti-IL-13 o fragmento del mismo como se describe aquí, en una cantidad suficiente para tratar o prevenir el trastorno asociado a IL-13. El antagonista de IL-13, e.g., el anticuerpo anti-IL-13 o fragmento del mismo, puede ser administrado al sujeto, solo o en combinación con otras modalidades terapéuticas como se describe aquí.

- 10 En una realización, el sujeto es un mamífero, e.g., un humano que sufre de uno o más trastornos asociados a IL-13, incluyendo, e.g., trastornos respiratorios (e.g., asma (e.g., asma alérgica y no alérgica), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), y otras condiciones que involucran inflamación de las vías aéreas, eosinofilia, fibrosis y producción excesiva de moco; trastornos atópicos (e.g.,
- 15 dermatitis atópica y rinitis alérgica); condiciones inflamatorias y/o autoinmunes de, la piel, órganos gastrointestinales (e.g., enfermedades inflamatorias del intestino (IBD), tales como colitis ulcerativa y/o enfermedad de Crohn), e hígado (e.g., cirrosis, fibrosis); escleroderma; tumores o cánceres, e.g., linfoma Hodgkin como se describe aquí. De manera acorde, la revelación incluye el uso de un agente de
- 20 unión a IL-13 (tal como un anticuerpo anti-IL-13 o fragmento del mismo descrito aquí) para un tratamiento descrito aquí y el uso de un agente de unión a IL-13 (tal como un anticuerpo anti-IL-13 o fragmento del mismo descrito aquí) para preparar un medicamento para un tratamiento descrito aquí.

- Ejemplos de trastornos asociados a IL-13 incluyen, pero no se limitan a, un
- 25 trastorno seleccionado de uno o más de: trastornos respiratorios, e.g., asma (e.g., asma alérgica y no alérgica (e.g., asma debida a infección con, e.g., virus sincitial respiratorio (RSV), e.g., en infantes)), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), y otras condiciones que involucran inflamación de las vías aéreas, eosinofilia, fibrosis y producción excesiva de moco, e.g., fibrosis quística y fibrosis
- 30 pulmonar; trastornos atópicos, e.g., que resultan de una sensibilidad incrementada a IL-13 (e.g., dermatitis atópica, urticaria, eczema, rinitis alérgica, y enterogastritis alérgica); condiciones inflamatorias y/o autoinmunes de, la piel (e.g., dermatitis atópica), órganos gastrointestinales (e.g., enfermedades inflamatorias del intestino (IBD), tales como colitis ulcerativa y/o enfermedad de
- 35 Crohn), hígado (e.g., cirrosis, carcinoma hepatocelular), y escleroderma; tumores o cánceres (e.g., tumores de tejido blando o sólidos), tal como leucemia,

glioblastoma, y linfoma, e.g., linfoma Hodgkin; infecciones virales (e.g., de HTLV-1); fibrosis de otros órganos, e.g., fibrosis del hígado, (e.g., fibrosis causada por un virus de hepatitis B y/o C); y supresión de la expresión de respuestas inmunes protectoras tipo 1, (e.g., durante la vacunación), como se describe aquí.

- 5 En otras realizaciones, esta solicitud provee un método para tratar (e.g., reducir, mejorar) o prevenir uno o más síntomas asociados con un trastorno respiratorio, e.g., asma (e.g., asma alérgica y no alérgica); alergias; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); una condición que involucra inflamación de las vías aéreas, eosinofilia, fibrosis y producción excesiva de moco, e.g., fibrosis quística y
- 10 fibrosis pulmonar. Por ejemplo, los síntomas del asma incluyen, pero no se limitan a, sibilancia, falta de aliento, broncoconstricción, hiperreactividad de las vías aéreas, capacidad pulmonar disminuida, fibrosis, inflamación de las vías aéreas, y producción de moco. El método comprende administrar al sujeto un antagonista de IL-13, e.g., un anticuerpo a IL-13 o un fragmento del mismo, en una cantidad
- 15 suficiente para tratar (e.g., reducir, mejorar) o prevenir uno o más síntomas. El anticuerpo a IL-13 puede ser administrado terapéuticamente o profilácticamente, o los dos. El antagonista de IL-13, e.g., el anticuerpo anti-IL-13, o fragmento del mismo, puede ser administrado al sujeto, solo o en combinación con otras modalidades terapéuticas como se describe aquí. Preferiblemente, el sujeto es un
- 20 mamífero, e.g., un humano que sufre de un trastorno asociado a IL-13 como se describe aquí.

En otro aspecto, esta solicitud provee un método para detectar la presencia de IL-13 en una muestra *in vitro* (e.g., una muestra biológica, tal como suero, plasma, tejido, biopsia). El método puede ser usado para diagnosticar un trastorno, e.g.,

25 un trastorno asociado a células inmunes. El método incluye: (i) poner en contacto la muestra o muestra control con el anticuerpo anti-IL-13 o fragmento del mismo como se describe aquí; y (ii) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-IL-13 o fragmento del mismo, y la muestra o la muestra control, en donde un cambio estadísticamente significativo en la formación del complejo en la

30 muestra con respecto a la muestra control indica la presencia de IL-13 en la muestra.

En otro aspecto, esta solicitud provee un método para detectar la presencia de IL-13 *in vivo* (e.g., en aplicaciones de imagen *in vivo* en un sujeto). El método puede ser usado para diagnosticar un trastorno, e.g., un trastorno asociado a IL-13-. El

35 método incluye: (i) administrar el anticuerpo anti-IL-13 o fragmento del mismo

como se describe aquí a un sujeto o un sujeto control bajo condiciones que permitan la unión del anticuerpo o fragmento a IL-13; y (ii) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo o fragmento e IL-13, en donde un cambio estadísticamente significativo en la formación del complejo en el sujeto con respecto al sujeto control indica la presencia de IL-13.

Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión a antígeno del mismo se pueden usar solos o en combinación para tratar tales enfermedades. Debe entenderse que los anticuerpos de la invención o porción de unión a antígeno de los mismos se pueden usar solos o en combinación con un agente adicional, e.g., un agente terapéutico, siendo dicho agente adicional seleccionado por la persona versada en la materia para el propósito pretendido. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico reconocido en el arte como útil para tratar la enfermedad o condición que está siendo tratada mediante el anticuerpo de la presente invención. El agente adicional puede ser también un agente que imparte un atributo benéfico a la composición terapéutica e.g., un agente que da origen a la viscosidad de la composición.

Debe entenderse además que las combinaciones que serán incluidas dentro de esta invención son aquellas combinaciones útiles para su propósito pretendido. Los agentes mencionados más adelante tienen propósitos ilustrativos y no pretenden ser limitados. Las combinaciones que hacen parte de esta invención, pueden ser los anticuerpos de la presente invención y al menos un agente adicional seleccionado de las listas a continuación. La combinación puede incluir también más de un agente adicional, e.g., dos o tres agentes adicionales si la combinación es tal que la composición formada pueda desempeñar su función pretendida.

La terapia de combinación puede incluir uno o más antagonistas de IL-13, e.g., anticuerpos anti-IL-13 o fragmentos de los mismos, coformulados con, y/o coadministrados con, uno o más agentes terapéuticos adicionales, e. g., uno o más inhibidores del factor de crecimiento y citoquinas, inmunosupresores, agentes anti-inflamatorios (e.g., agentes sistémicos anti-inflamatorios), agentes anti- fibróticos, inhibidores metabólicos, inhibidores de enzimas, y/o agentes citotóxicos o citostáticos, como se describe aquí más adelante.

Ejemplos de agentes terapéuticos adicionales preferidos que pueden ser coadministrados y/o coformulados con uno o más antagonistas de IL-13, e.g., anticuerpos anti-IL-13 o fragmentos del mismo, incluyen, pero no se limitan a, uno

o más de: esteroides inhalados; agonistas beta, e.g., agonistas beta de corta acción o de larga acción; antagonistas de leucotrienos o receptores de leucotrienos; fármacos de combinación tales como ADVAIR; inhibidores de IgE, e.g., anticuerpos anti-IgE (e.g., XOLAIR); inhibidores de fosfodiesterasa (e.g., inhibidores de PDE4); xantinas; fármacos anticolinérgicos; agentes estabilizantes de mastocitos tales como cromolín; inhibidores de IL-4; inhibidores de IL-5; inhibidores de eotaxina/CCR3; antagonistas de histamina o sus receptores incluyendo H1, H2, H3, y H4, y antagonistas de prostaglandina D o sus receptores (DP1 y CRTH2). Tales combinaciones se pueden usar para tratar el asma y otros trastornos respiratorios. Ejemplos adicionales de agentes terapéuticos que pueden ser coadministrados y/o coformulados con uno o más anticuerpos anti-IL-13 o fragmentos del mismo incluyen uno o más de: antagonistas de TNF (e.g., un fragmento soluble de un receptor de TNF, e.g., receptor de TNF humano p75 o p55 o su derivados, e.g., TNFR-IgG de 75 kD (proteína de fusión receptor de TNF-IgG de 75 kD, ENBREL)); antagonistas enzimáticos de TNF, e.g., inhibidores de la enzima convertidora de TNF (TACE); antagonistas del receptor muscarínico; antagonistas de TGF-beta; interferón gamma; perfenidona; agentes quimioterapéuticos, e.g., metotrexato, leflunomida, o un sirolimus (rapamicina) o un análogo del mismo, e.g., CCI-779; inhibidores de cPLA2 y COX2; AINEs; inmunomoduladores; inhibidores de p38, inhibidores de NFkB, TPL-2 y MK-2, entre otros.

Otras combinaciones preferidas son fármaco(s) anti-inflamatorio(s) supresor(es) de citoquina y (CSAIDs, por sus siglas en inglés); anticuerpos a o antagonistas de otros factores de crecimiento o citoquinas humanas, por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, IL-21, IL-31, interferones, EMAP-II, GM-CSF, FGF, EGF, PDGF, y edotelina-1, así como los receptores de estas citoquinas y factores de crecimiento. Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos, se pueden combinar con anticuerpos a moléculas de superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, CTLA o sus ligandos incluyendo CD154 (gp39 o CD40L).

Las combinaciones preferidas de agentes terapéuticos pueden interferir en diferentes puntos en la cascada inflamatoria; ejemplos preferidos incluyen antagonistas de TNF como anticuerpos a TNF quiméricos, humanizados o humanos, D2E7, (Publicación PCT No. WO 97/29131), CA2 (RemicadeTM), CDP 571, y receptores de TNF p55 o p75 solubles, sus derivados, (p75TNFR1gG

(Enbrel™) o p55TNFR1gG (Lenercept), y además inhibidores de la enzima convertidora de TNF (TACE); de manera similar, los inhibidores de IL- 1 (inhibidores de la enzima convertidora de Interleucina-1, IL-1RA etc.) pueden ser efectivos por la misma razón. Otras combinaciones preferidas incluyen Interleucina 4. Incluso otra combinación preferida son otros actores clave de la respuesta asmática que pueden actuar de manera paralela a, dependiente de, o en conjunto con, la función de IL-13; especialmente preferidos son los antagonistas de IL-9 incluyendo anticuerpos a IL-9. Se ha mostrado que IL-13 e IL-9 tiene funciones que se solapan pero son distintas y una combinación de antagonistas a ambos podría ser más efectiva. Aún otra combinación preferida son anticuerpos anti-IL-5. Aún otras combinaciones preferidas incluyen antagonistas de quimioquinas incluyendo MCP-1, MCP-4, eotaxinas, RANTES, MDC, CCL-12 y CCL-17 (TARC) y receptores de quimioquinas incluyendo CCR2, CCR3, CCR4, y CXCR4. Incluso, las combinaciones pueden incluir antagonistas a mediadores del asma incluyendo quitinasa ácida de mamífero, CRHT2, quimasa, S1P1, S1P2, Tyk2, ROCKII, Stat6, p38, NFkB, fosfodiesterasa 4 (PDE-4), tritasa de mastocitos, NO, adenosina, IKK2, GATA3, ICAM-1, VCAM-1, e ICOS.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente efectiva" o una "cantidad profilácticamente efectiva" de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo o porción de anticuerpo puede ser determinada por una persona versada en la materia y puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo, y peso del individuo, y la habilidad del anticuerpo o porción de anticuerpo para elicitar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo, o porción del anticuerpo, es superada considerablemente por los efectos terapéuticos benéficos. Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. De manera típica, dado que se usa una dosis profiláctica en los sujetos de manera previa a o en una etapa temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva será menor a la cantidad terapéuticamente efectiva.

Los regímenes de dosis se pueden ajustar para proveer la respuesta óptima deseada (e.g., una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas en el tiempo o la dosis puede ser reducida o incrementada proporcionalmente como se indica mediante las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosis unitaria por facilidad de administración y uniformidad de dosis. Forma de dosis unitaria, como se usa aquí se refiere a unidades físicamente discretas ajustadas como dosis unitarias para los sujetos mamíferos a ser tratados; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada del compuesto activo, que se ha calculado produce el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosis unitaria de la invención está determinada por y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico o profiláctico particular a ser alcanzado, y (b) las limitaciones inherentes en el arte de formular tal compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en los individuos.

Un rango ejemplar no limitante para una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención es 0.1-20 mg/kg, más preferiblemente 1-10 mg/kg. Debe notarse que los valores de dosis pueden variar con el tipo y severidad de la condición a ser aliviada. Se debe entender además que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosis específicos deben ajustarse con el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los rangos de dosis aquí establecidos solo son ejemplares y no pretenden limitar el alcance o práctica de la composición reclamada.

Para aquellos versados en la materia, será aparente fácilmente que otras modificaciones y adaptaciones adecuadas de los métodos de la invención aquí descritos son obvias y pueden realizarse usando equivalentes adecuados sin alejarse del alcance de la invención o de las realizaciones aquí descritas. Habiendo ahora descrito la presente invención en detalle, la misma será ahora más claramente entendida mediante referencia a los siguientes ejemplos, los cuales se incluyen solamente con propósitos de ilustración y no pretenden ser limitantes de la invención.

35 **Ejemplos**

Ejemplo 1: **Generación y aislamiento de anticuerpos monoclonales anti IL-13 humana**

Ejemplo 1.1: **Ensayos para identificar anticuerpos anti IL-13 humana**

A lo largo del Ejemplo 1, se usaron los siguientes ensayos para identificar y
5 caracterizar anticuerpos anti IL-13 humana a menos que se indique lo contrario.

Ejemplo 1.1.A: **ELISA**

Los ensayos de inmunosorbente unido a enzima para hacer una selección de anticuerpos que se unen a IL-13 humana se llevaron a cabo como sigue.

Se recubrieron placas de ELISA (Corning Costar, Acton, MA) con 50 μ L/pozo de
10 5 μ g/ml IgG de cabra anti-ratón específica a Fc (Pierce # 31170, Rockford, IL.) en amortiguador fosfato salino (PBS) durante toda la noche a 4 grados Celsius. Las placas se lavaron una vez con PBS que contenía Tween-20 0.05%. Las placas se bloquearon mediante la adición de 200 μ L/pozo de solución bloqueadora diluida al 2% en PBS (BioRad #170-6404, Hercules, CA.) durante 1 hora a temperatura
15 ambiente. Las placas se lavaron una vez después de bloquearlas, con PBS que contenía Tween-20 0.05%.

Se adicionaron cincuenta microlitros por pozo de sobrenadantes de hibridoma o sera de ratón diluidos en PBS que contenía Albúmina de suero Bovino (BSA) 0.1% (Sigma, St. Louis, MO.) a la placa de ELISA preparada como se describió
20 anteriormente y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pozos se lavaron tres veces con PBS que contenía Tween-20 0.05%. Se adicionaron cincuenta microlitros de variante de IL-13 humana recombinante biotinilada purificada (R110Q) diluida a 100ng/mL en PBS que contenía BSA 0.1% a cada pozo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las cajas se lavaron 3
25 veces con PBS que contenía Tween-20 0.05%. Se diluyó estreptavidina HRP (Pierce # 21126, Rockland, IL.) 1:20000 en PBS que contenía BSA 0.1%; se adicionaron 50 μ L/pozo y las cajas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las cajas se lavaron 3 veces con PBS que contenía Tween-20 0.05%. Se adicionaron cincuenta microlitros de solución de TMB (Sigma # T0440, St.
30 Louis, MO.) a cada pozo y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de ácido sulfúrico 1N. Las cajas se leyeron espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm.

Ejemplo 1.1.B: **Determinaciones de afinidad usando tecnología BIAcore**

El ensayo BIACORE (Biacore, Inc, Piscataway, NJ) determina la afinidad de anticuerpos con medidas cinéticas de constantes de velocidad de asociación y disociación. La unión de anticuerpos a IL-13 humana recombinante purificada o variante de IL-13 humana recombinante purificada (R110Q) se determinó mediante medidas basadas en resonancia de plasmón de superficie con un instrumento Biacore® 3000 (Biacore® AB, Uppsala, Suecia) usando HBS-EP de corrida (HEPES 10 mM [pH 7.4], NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, y tensioactivo P20 0.005%) a 25°C. Todas las sustancias químicas se obtuvieron de Biacore® AB (Uppsala, Suecia) o de lo contrario, de una fuente diferente como se describe en el texto. Aproximadamente 5000 RU de IgG de cabra anti-ratón, (Fcγ), anticuerpo policlonal específico a fragmento (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, EL) diluido en acetato de sodio 10 mM (pH 4.5) se inmovilizaron directamente a lo largo de un chip biosensor CM5 grado investigación usando un kit de acoplamiento de amina estándar de acuerdo con los procedimientos e instrucciones del fabricante a 25 µg/ml. Los fragmentos en la superficie del biosensor que no habían reaccionado, se bloquearon con etanolamina. Se usó superficie carboximetil dextran modificado en las celdas de flujo 2 y 4 como una superficie de reacción. Se usó carboximetil dextran no modificado sin IgG de cabra anti-ratón en las celdas de flujo 1 y 3 como la superficie de referencia. Para los análisis cinéticos, las ecuaciones de velocidad derivadas del modelo de unión de Langmuir 1:1 se ajustaron simultáneamente a fases de asociación y disociación de todas las ocho inyecciones (usando análisis de ajuste global) con el uso del software Biaevaluation 4.0.1. Los anticuerpos purificados se diluyeron en solución salina amortiguada con HEPES para captura a través de superficies de reacción específicas a IgG de cabra anti-ratón. Los anticuerpos de ratón que serían capturados como un ligando (25 µg/ml) se inyectaron sobre matrices de reacción a una velocidad de flujo de 5 µl/min. Las constantes de velocidad de asociación y disociación, k_{on} (unidad $M^{-1}s^{-1}$) y k_{off} (unidades s^{-1}) se determinaron a una velocidad de flujo continuo de 25 µl/min. Las constantes de velocidad se derivaron haciendo medidas cinéticas de unión a diez concentraciones diferentes de antígeno en el rango de 10-200 nM. La constante de equilibrio de disociación (unidad M) de la reacción entre anticuerpos de ratón e IL-13 humana recombinante purificada o IL-13 humana recombinante purificada se calculó posteriormente a partir de las constantes cinéticas de velocidad mediante la siguiente fórmula: $K_D = k_{off}/k_{on}$. Se registra la unión como una función del tiempo y se calculan las constantes cinéticas de velocidad. En este ensayo, se pueden

medir velocidades de asociación tan rápidas como $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ y velocidades de disociación tan lentas como 10^{-6}s^{-1} .

Ejemplo 1.1.C: Actividad funcional de anticuerpos anti IL- 13 humana

Para examinar la actividad funcional de los anticuerpos anti-IL13 humana de la invención, se usaron los anticuerpos en los siguientes ensayos que miden la habilidad de un anticuerpo para inhibir la actividad de IL-13.

Ejemplo 1.1.C 1 Bioensayo A-549

Se analizó la habilidad de los anticuerpos anti-IL13 humana para inhibir la producción de TARC (CCL-17) inducida por IL-13 por células A-549. En el día 1, se realizó una siembra de células A-549 en una caja de 96 pozos (2E5 células/pozo) en medio de crecimiento RPMI (con FBS 10%). En el día dos, se reemplazó el medio con medio de crecimiento RPMI fresco que contenía 400ng/ml de rhTNF (100 μ l/pozo). Entretanto, se preincubaron diversas concentraciones de suero de ratón inmunizado, sobrenadante de hibridoma murino o anticuerpos anti-IL13 humana purificados durante una hora a 37°C con 10 ng/ml de IL-13 humana recombinante purificada o variante de IL- 13 en 100 μ L de medio completo RPMI en una placa de microtítulo (con fondo en U, de 96 pozos, Costar). Posteriormente, se adicionó la mezcla del anticuerpo junto con IL- 13 humana recombinante purificada (100 μ l/pozo) a las células A-549 tratadas con TNF, con el volumen final de 200 μ l/pozo (las concentraciones finales de IL-13 y TNF eran 5ng/ml y 200ng/ml, respectivamente), y se incubó durante 18 horas a 37°C. Tras la incubación, se retiraron 150 μ L de sobrenadante libre de células de cada pozo y se midió el nivel de TARC humana producida usando un ELISA de TARC humana (R&D Systems Cat#DDN00).

Las células A-549 también respondían a IL-13 de otras especies, incluyendo mono cynomolgus, ratón, rata, y oveja, con valores ED₅₀ similares a aquellos de IL-13 humana. Por lo tanto, ésta se empleó para análisis reactivo cruzado de mAbs anti-hIL-13 a IL-13 de otras especies usando el mismo protocolo experimental.

Ejemplo 1.2: Generación de anticuerpos monoclonales Anti IL-13 humana

Los anticuerpos monoclonales de ratón anti-IL-13 humana se obtuvieron como sigue:

Ejemplo 1.2.A: Inmunización de ratón con antígeno IL-13 humana

Veinte microgramos de variante de IL-13 humana recombinante purificada IL-13 (Peprotech) mezclada con adyuvante completo de Freund o adyuvante Immunoeasy (Qiagen, Valencia, CA) se inyectaron de manera subcutánea en
5 cinco ratones Balb/C de 6 a 8 semanas de edad, cinco ratones C57B/6, y cinco ratones AJ en el Día 1. En los días 24, 38, y 49, veinte microgramos de variante de IL-13 humana recombinante purificada mezclada con adyuvante incompleto de Freund o adyuvante Immunoeasy se inyectaron de manera subcutánea en el
10 mismo ratón. En el día 84 o día 112 o día 144, los ratones se inyectaron de manera intravenosa con 1 ug de variante de IL-13 humana recombinante purificada.

Ejemplo 1.2.B: Generación de Hibridoma

Los esplenocitos obtenidos a partir de los ratones inmunizados descritos en el Ejemplo 1.2.A, se fusionaron con células SP2/O-Ag-14 en una relación de 5:1 de
15 acuerdo con el método establecido descrito en Kohler, G. y Milstein 1975, Nature, 256:495 para generar hibridomas. Los productos de fusión se llevaron a medio de selección que contenía azaserina e hipoxantina en placas de 96 pozos a una densidad de 2.5×10^6 células de bazo por pozo. De siete a diez días después de la fusión, se observaron colonias macroscópicas de hibridoma. Se evaluó mediante
20 ELISA la presencia del anticuerpo a variante de IL-13 en el sobrenadante de cada pozo que contenía colonias de hibridoma (como se describió en el Ejemplo 1.1.A). Los sobrenadantes que exhibían actividad específica a variante de IL-13 fueron evaluados posteriormente para la habilidad para neutralizar la variante de IL-13 y el tipo nativo de IL-13 en el ensayo de A-549 para TARC (como se describió en el
25 Ejemplo 1.1.C).

Ejemplo 1.2.C: Identificación y caracterización de anticuerpos monoclonales anti IL-13 humana

Los hibridomas que producían anticuerpos que se unían a la variante de IL-13, generados de acuerdo con los Ejemplos 1.2.B y 1.2.C, y capaces de unir
30 específicamente variante de IL-13 y particularmente aquellos con valores IC_{50} en el ensayo A-549 de 5nM o menos de 5nM se escalonaron y se clonaron mediante dilución limitante.

Las células de hibridoma se expandieron en medio que contenía suero fetal bovino bajo en IgG 10% (Hyclone #SH30151, Logan, UT.). En promedio, 250 mL de cada sobrenadante de hibridoma (derivado de una población de clones) se recolectaron, se concentraron y purificaron mediante cromatografía de afinidad a proteína A, como se describe en Harlow, E. y Lane, D. 1988 "Antibodies: A Laboratory Manual". La habilidad de los mAbs purificados para inhibir la actividad de IL-13 se determinó usando el bioensayo A-549 como se describe en los Ejemplos 1.1.C. La Tabla 7 muestra valores de IC₅₀ de los bioensayos A-549 para 17 anticuerpos monoclonales.

10 **Tabla 7: Neutralización de IL-13 mediante mAbs anti IL-13 en bioensayo A-549**

Anticuerpo monoclonal murino	Isotipo	IC ₅₀ (nM) promedio IL-13 humana tipo nativo	IC ₅₀ (nM) promedio variante de IL-13 humana	IC ₅₀ (nM) promedio IL-13 de cynomolgus
4A8	IgG1λ	ND	2.70 E-10	ND
6C8	IgG1κ	7.20 E-10	3.40 E-10	1.61 E-10
5F1	IgG1κ	9.70 E-11	9.00 E-11	1.88 E-09
1B6	IgG1κ	8.40 E-10	2.40 E-10	5.21 E-10
5G1	IgG1κ	7.60 E-11	4.80 E-11	6.12 E-10
29G5	IgG2aκ	2.90 E-10	2.00 E-10	4.39 E-09
33C3	IgG1κ	1.50 E-10	1.00 E-10	8.47 E-10
25C8	IgG1κ	2.30 E-10	2.60 E-10	1.88 E-10
13C5	IgG1κ	1.90 E-10	1.70 E-10	5.00 E-09
3E5	IgG2aκ	1.30 E-10	3.00 E-10	1.61 E-10
3H7	IgG2aκ	NA	5.80 E-10	7.97 E-10
5D3	IgG1κ	7.05 E-10	2.90 E-10	2.91 E-10
8B6	IgG1κ	ND	4.80 E-10	3.95 E-10
21D9	IgG2bκ	6.82 E-11	1.36 E-10	3.40 E-10
14B2	IgG1κ	ND	4.36 E-10	NA
9C11	IgG1κ	1.06 E-10	1.70 E-10	6.40 E-10
22D10	IgG1κ	2.84 E-10	5.40 E-10	6.11 E-09

Las afinidades de unión de loa anticuerpos monoclonales a tipo nativo y variante de IL-13 humana recombinante purificada se determinaron usando medida de resonancia de plasmón de superficie (Biacore®) como se describió en el Ejemplo

1.1.B. La Tabla 8 muestra la afinidad de los 18 anticuerpos monoclonales descritos anteriormente a IL-13 humana.

Tabla 8: Afinidad de mAbs anti IL-13 para tipo nativo y variante de IL-13 humana

mAb	IL-13 humana de tipo nativo			Variante de IL-13 humana		
	k_{on} (1/M·s)	k_{off} (1/s)	K_D (M)	k_{on} (1/M·s)	k_{off} (1/s)	K_D (M)
4A8			8.90E-11			1.57E-10
6C8	1.45E+06	7.02E-04	4.84E-10	9.78E+05	3.94E-04	4.03E-10
5F1	7.74E+05	2.24E-05	2.89E-11	5.02E+05	1.57E-05	3.14E-11
1B6	9.51E+05	5.18E-04	5.45E-10	1.06E+05	2.22E-04	2.10E-10
5G1	6.26E+05	5.49E-06	8.77E-12	1.57E+05	2.05E-05	1.30E-10
29G5	8.59E+05	1.75E-04	2.04E-10	3.16E+05	1.04E-04	3.29E-10
33C3	2.33E+06	1.49E-04	6.39E-11	7.70E+05	9.59E-05	1.24E-10
25C8	3.45E+05	2.60E-05	7.54E-11	1.34E+05	8.45E-06	6.31E-11
13C5	1.25E+06	9.31E-05	7.45E-11	5.74E+05	4.35E-05	7.59E-11
3E5	1.44E+06	6.58E-04	4.57E-10	1.85E+06	4.68E-04	2.53E-10
3H7	NB			2.54E+05	5.58E-05	2.20E-10
5D3	1.63E+06	4.83E-04	2.96E-10	1.51E+06	5.84E+04	3.87E-10
8B6	1.16E+06	6.07E-04	5.23E-10	9.831E+05	9.60E-04	8.76E-10
21D9	8.52E+05	6.58E-05	7.72E-11	8.31E+05	6.18E-05	7.44E-11
14B2	6.69E+05	1.84E-04	2.75E-10	8.08E+05	2.79E-04	3.46E-10
9C11	5.79E+05	6.50E-05	1.12E-10	6.37E+05	5.86E-05	9.21E-11
22D10	1.82E+05	6.50E-05	3.56E-10	2.45E+05	1.55E-04	6.32E-10

5 **Ejemplo 1.2.C.1: Especificidad a Especie de anticuerpos monoclonales murinos anti-IL-13 humana**

Para determinar si los 17 anticuerpos monoclonales descritos anteriormente reconocían a la IL-13 murina, se configuró un ELISA indirecto recubriendo placas de ELISA con 5ug/ml de IgG de cabra anti-ratón, anticuerpo específico a
10 fragmento Fc (Pierce # 31170, Rockland, IL). Se prepararon mAbs murinos anti-IL-13 humana a diferentes concentraciones en el rango de 0.1 a 100 ng/ml en PBS que contenía BSA 0.1%; se adicionaron 50 ul de cada dilución de anticuerpo a la placa de ELISA recubierta y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pozos se lavaron 3 veces con PBS que contenía Tween-20 0.05%.

Se diluyó IL-13 recombinante biotinilada de de ratón (R&D Systems) a 0.1 ug/ml en PBS que contenía BSA 0.1%; se adicionaron 50 ul/pozo y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pozos se lavaron 3 veces con PBS que contenía Tween-20 0.05%. Se diluyó estreptavidina HRP (Pierce # 21126, Rockland, IL.) 1:20000 en PBS que contenía BSA 0.1%; se adicionaron 50 mL/pozo y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con PBS que contenía Tween-20 0.05%. Se adicionaron cincuenta microlitros de la solución de TMB (Sigma # T0440, St. Louis, MO.) a cada pozo y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de ácido sulfúrico 1N. Las placas se leyeron espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm. Los resultados del ELISA indirecto indicaron que el mAb 3H7 era capaz de unirse a mL-13. En bioensayos posteriores, se mostró que 3H7 podría inhibir la producción de TARC estimulada por mL-13 en una manera dependiente de la dosis, con un IC₅₀ de 2.4nM. El análisis Biacore también demostró unión positiva de 3H7 a mL-13, con una K_D de 12nM. Todos los otros mAbs en la tabla 8 no mostraron ninguna unión positiva a IL-13 de ratón.

En el bioensayo A-548, también se midió la potencia de neutralización de mAbs anti-hIL-13 contra IL-13 de primate no humano (cynomolgus) e IL-13 de oveja. Para generar IL-13 de cyno y oveja, se obtuvo cADN para cada proteína mediante PCR en plantilla de ADN genómico usando cebadores degenerados basados en la secuencia de IL-13 humana. Las proteínas IL-13 recombinantes de cyno y oveja se expresaron posteriormente en células COS transfectadas transientemente. También se generó IL-13 humana de tipo nativo en paralelo como un control en todos los estudios funcionales. Las células A-549 respondieron a IL-13 cyno y de oveja con una ED₅₀ similar a aquella de IL-13 humana. La mayoría de los mAbs neutralizaron la actividad de IL-13 cyno, lo que demuestra reactividad cruzada a IL-13 de cyno (Tabla 7). Sin embargo, ninguno de los anticuerpos mostró neutralización significativa de IL-13 de oveja.

Ejemplo 1.2.C.2: Anticuerpos monoclonales murinos anti-IL-13 humana bloquean la unión de IL-13 a los receptores de IL-13 (IL-13R α 1 e IL-13R α 2)

La actividad de IL-13 está mediada a través de un complejo receptor que consiste de las cadenas de IL-13R α 1 e IL-4R α . Primero, la citoquina sufre una interacción de afinidad relativamente baja con IL-13R α 1 en la superficie de las células.

Posteriormente el complejo IL-13/IL-13R α 1 recluta IL-4R α para formar el receptor de IL-13 completo, el cual se une a su ligando (IL-13) con alta afinidad (Zurawski y cols. (1993) EMBO J. 12:2663; Zurawski y cols. (1995) J. Biol. Chem. 270:23869). La unión de IL-13 con el receptor de alta afinidad envía luego señales corriente
5 abajo a lo largo de la cadena de IL-4R α que involucra la vía quinasa Janus-transductora de señal y activadora de la transcripción (JAK-STAT), e.g., mediante fosforilación de STAT6, que puede monitorearse como una de las respuestas celulares a IL-13 más tempranas (Murata y cols., supra).

Existe otro receptor que se une a IL-13, la cadena IL-13R α 2 (IL-13Ra2), que se
10 une a IL-13 con alta afinidad (0.25-1.2 nM) (Caput, y cols., 1996 J. Biol. Chem. 271, 16921-16926; Donaldson y cols., 1998 J. Immunol. 161, 2317-2324). No se sabe de ninguna otra molécula receptora que esté involucrada en el complejo IL-13/IL-13R α 2. Inicialmente, se pensó que IL-13R α 2 actuaba como un receptor "señuelo" no señalizante. Sin embargo, posteriormente se descubrió que podía
15 unirse a IL-13, y señalizar a través de la vía AP-1, llevando a la producción de TGF-beta en ciertos tipos de células incluyendo macrófagos, lo que a su vez origina fibrosis pulmonar (Fichtner-Feigl. 2006 Nat Med 12:99-106). Por lo tanto, las vías IL-13R α 2 y complejo IL-13R α 1/IL-4R contribuyen a la patofisiología global del asma y otras enfermedades mediadas por IL-13. Se usaron diversos
20 enfoques, tales como mapeo de epítopes, ensayos de unión a receptor, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, por sus siglas en inglés), y análisis BIACORE posterior, para elucidar la interacción entre los anticuerpos anti-IL-13 de la invención e IL-13 humana.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales descritos anteriormente son
25 capaces de bloquear la unión de IL-13 a receptores de IL-13 (IL-13R α 1 e IL-13R α 2), se desarrolló un ELISA de unión a receptor como sigue. Se recubrieron placas de ELISA de alta unión de 96 pozos con 4 ug/ml de IL-13R α 2/Fc o IL-13R α 1/Fc recombinante (R&D Systems) en 100ul/pozo de amortiguador de recubrimiento (amortiguador carbonato-bicarbonato, Pierce) a 4°C. Después de
30 16hr, se removió la solución de recubrimiento desechando los contenidos de la placa en el lavabo, y las placas se lavaron y se bloquearon 4 veces con amortiguador de bloqueo Superblock (240ul/pozo) (Pierce). Se adicionaron mAbs Anti-IL13 (diluidos serialmente 1:4 a partir de 40ug/ml, 50ul/pozo) y Biotina-IL-13 (50ul/pozo, concentraciones finales de 5nM para hIL-13R α 1/Fc, y 0.5nM para hIL-
35 13R α 2/Fc) y se incubó durante 2hr a temperatura ambiente (TA). Las cajas se lavaron 5 veces con 300ul de PBST 0.1%, y luego se adicionaron 100ul de 1:5000

1
mAb de ratón anti-Biotina (Jackson Immunosciences) y se incubó a TA durante 45 min. Las placas se lavaron nuevamente 5 veces con 300ul de PBST 0.1%, seguido de la adición de reactivo sustrato TMB (100ul/pozo, Pharmingen); se desarrollaron durante 5 min, y se detuvieron adicionando 50ul de H₂SO₄ 2M (VWR). Se determinaron las densidades ópticas a 450nm mediante espectrofotometría.

Adicionalmente, también se evaluaron las propiedades bloqueadores de receptor de los mAbs mediante ensayo de unión a receptor usando células COS trasfectadas con IL-13R α 2. La IL-13 humana recombinante se marcó con ¹²⁵I (Amersham, Arlington Heights, IL), usando reactivo IODO-GEN (Pierce, Rockford, IL) como se describió previamente (Obiri NI y cols., (1995) J Biol Chem. 270:8797-8804). Se estimó que la actividad específica de la IL-13 radiomarcada era 158 μ Ci/ μ g proteína. La IL-13 marcada exhibía bioactividad similar a la IL-13 sin marcar, según se evaluó mediante el bioensayo A-549. Para los experimentos de unión, las células COS se transfectaron transientemente con IL-13R α 2 humana con Lipofectamine 2000 (Invitrogen), y se incubaron durante 48 hr. Las células COS transfectadas (5×10^5 células en 100 μ L de amortiguador de unión: RPMI 1640 que contenía albúmina de suero humano 0.2% y 10 mmol de HEPES) se incubaron con ¹²⁵I-IL-13 1.0 nM con o sin IL-13 no marcada 1 μ M a 4°C durante 2 horas. Se separó la ¹²⁵I-IL-13 unida a célula de ¹²⁵I-IL-13 no unida mediante centrifugación a través de un gradiente de aceite ftalato, y se determinó la radioactividad con un contador gamma (Wallac, Gaithersburg, MD). Para el ensayo de desplazamiento de anticuerpo, se incubaron células COS transfectadas con ¹²⁵I-IL-13 (1.0 nM) con o sin concentraciones crecientes (hasta 50 μ g/ml) de anticuerpos anti-IL-13, como se describió anteriormente. Ambas formas de ensayo de unión a receptor demostraron lo siguiente: Primero, 13C5 y 9C11 bloquearon la unión de IL-13 a IL-13R α 1; segundo, 13C5 bloqueó fuertemente la unión de IL-13 a IL-13R α 2 (IC₅₀ ~ 1-3 nM tanto en ELISA RB y RBA de superficie celular), mientras que 9C11 bloqueó la unión a IL-13 de IL-13R α 2 con una menor potencia (IC₅₀ > 10 nM); y tercero, 5G1 y 3E5 no bloquearon la unión de IL-13 a IL-13R α 1 o IL-13R α 2. También se analizó la habilidad de otros tres anticuerpos anti-IL-13, BAK502G9 (CAT PCT WO 2005/007699), mAb13.2 (Wyeth PCT WO 2005/123126A2) y MJ2-7 (Wyeth PCT WO 2006/0073148A1) para bloquear la unión de IL-13 humana a IL-13 R α 2 en ELISA de unión a receptor y RBA de superficie celular. El anticuerpo mAb13.2 no bloqueó la unión de IL-13 a IL-13R α 1 o IL-13R α 2. BAK502G9 y MJ2-7 eran capaces de bloquear la unión de IL-13 a IL-13R α 1; sin embargo, exhibían baja

potencia para bloquear la unión de IL-13 a IL-13R α 2 con concentraciones de anticuerpo de hasta 50 μ g/ml (330 nM).

La interacción entre IL-13 e IL-13R α 1/ α 2 en la presencia de mAbs anti-IL-13 se analizó mediante BIACORE. Este análisis se realizó en varios formatos. Primero, se unió IL-13R α 1/Fc al chip de Biacore y se esparció IL-13 sobre el chip, en presencia y ausencia de mAbs anti-IL-13. Los MAb 13C5 y 9C11, entre otros, fueron capaces de bloquear la unión de IL-13 a IL-13R α 1, mientras que 5G1 y 3E5 no inhibieron la unión de IL-13 a IL-13R α 1, lo que es consistente con los ensayos de unión a receptor. Segundo, se unió IL-4R al chip BIACORE, y se esparció un complejo de IL-13 pre-unida a IL-13R α 1 sobre el chip. En ausencia de mAbs anti-IL-13, se demostró la formación de un complejo trimolecular. Sin embargo, la adición de anticuerpo 5G1 anti-IL-13 a la mezcla de IL-13 pre-unida a IL-13R α 1 evitó la unión a IL-4R en el chip. Esto indicó que, aún cuando 5G1 no pudo bloquear la unión de IL-13 a IL-13R α 1, pudo bloquear la unión de IL-13 a IL-4R, proveyendo una base mecánica para su actividad neutralizante de IL-13. Estas observaciones fueron confirmadas posteriormente mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, por sus siglas en inglés), donde se observaron complejos hetero-triméricos (mAb-IL-13-IL-13R α 1/Fc) para 5G1, pero no para 13C5. Estudios de mapeo de epítopo posteriores, que utilizaban procesamiento de proteínasa del complejo mAb-IL-13 seguido de análisis de espectrometría de masas indicaron lo siguiente: Primero, 5G1 se une a residuos de IL-13 que incluyen el péptido N-terminal de 11 aa (GPVPPSTALRE), que cubre parte de la región de hélice-A que se ha mostrado interactúa con IL-4R (Moy y cols., 2001 J Mol Biol. 310:219 y Horita y cols., (2001) J Mol Biol. 310:231); segundo, el anticuerpo 9C11 interactúa con una región entre hélice C y hélice D (VSAGQFSSLHVR); y tercero, el anticuerpo 13C5 interactúa con residuos de IL-13 que incluyen una región que cubre la hélice D (VRDTK IEVAQ FVKDL LLHLK KLFRE GR correspondiente al aminoácido 104-130 de ID de SEC No.1). Se ha mostrado que la hélice D interactúa con los receptores de IL-13 (Moy y cols., 2001 J Mol Biol. 310:219; Horita y cols., 2001 J Mol Biol. 310:231; y Madhankumar y cols., 2002 JBC 277:43194). Dado que 13C5 se une a la variante de IL-13 humana (K_D =50 pM) mucho más fuertemente que IL-13 de cynomolgus (K_D =1800 pM), y la única diferencia en la secuencia entre la variante de IL-13 humana e IL-13 de cynomolgus en esta región epítopo potencial 13C5 es L en IL-13 humana y V en cyno en la posición 120, generamos una IL-13 de cyno V120L mutante y evaluamos si esta mutación tendría afinidad de unión a 13C5 incrementada con respecto a IL13 de cyno de tipo nativo. Con base en los resultados de Biacore y

bioensayo, la afinidad de unión así como la potencia de neutralización de 13C5 para IL-13 de cyno V120L mutante era equivalente a la de IL-13 de cyno de tipo nativo, lo que indica que esta diferencia V/L en la posición 120 en la región C-terminal no contribuye a la diferencia en la afinidad de 13C5 por la variante de IL-13 humana versus IL-13 de cyno, y que deben haber otros residuos fuera de la región C-terminal que contribuyen a la afinidad de unión diferencial de 13C5 a IL-13 humana y de cyno. Esto es consistente con la observación que 13C5 no reconoce IL-13 humana desnaturalizada mediante análisis Western blot, lo que indica que el epítipo de unión de 13C5 en IL-13 humana es fuertemente conformacional.

Los estudios de unión y mapeo de epítopes indicaron que 5G1 no inhibía la interacción de IL-13 con IL-13R α 1 pero perturbaba la interacción de IL-13/IL-13R α 1 con IL-4R α . Se cree que esta perturbación interfiere con la formación de un complejo de señalización del IL-13 funcional. Estas observaciones proveen un modelo teórico para la actividad neutralizante de este anticuerpo en un sistema mediado por IL-13R α 1/IL-4R tal como las células A-549. En contraste, 13C5 bloqueó la unión de IL-13 a IL-13R α 1 e IL-13R α 2. De manera interesante, aunque 9C11 era capaz de bloquear la unión de IL-13 a IL-13R α 1, éste solo mostro inhibición parcial (o de baja potencia) de la unión de IL-13 a IL-13R α 2. Aunque IL-13R α 1 y R α 2 adoptaron un plegamiento tridimensional y orientación de la unión a IL-13 similares, tienen una baja identidad de secuencia y por lo tanto los residuos específicos responsables de la unión a IL-13 pueden variar (Arima 2005 JBC 280:24915; y Madhankumar y cols., 2002 JBC 277:43194). En consecuencia, los residuos específicos en IL-13 para la unión a IL-13R α 1 e IL-13R α 2 pueden diferir, lo que podría explicar las propiedades diferenciales como bloqueador de receptor de 9C11.

Los ensayos de unión a receptor, mapeo de epítipo, Biacore, y bioensayos descritos anteriormente, indican colectivamente que un anticuerpo neutralizante anti-IL-13 puede inhibir la actividad asociada a IL-13 mediante los siguientes mecanismos:

- 1) Inhibir la unión de IL-13 a IL-13R α 1 e IL-13R α 2 al interactuar con IL-13 en la región involucrada en la unión a receptor tanto a IL-13R α 1 como a IL-13R α 2. Un ejemplo de tal anticuerpo es 13C5. Tales anticuerpos inhibirán la señalización de IL-13 a través de IL-13R α 2 y el complejo IL-13R α 1/IL-4R.

2) No inhibe la unión de IL-13 a IL-13R α 1 o IL-13R α 2. Sin embargo, el anticuerpo inhibe la interacción con el receptor de IL-4, por lo tanto, inhibe la señalización de IL-13 a través del complejo IL-13R α 1/IL-4R. Dicho anticuerpo puede no inhibir la señalización de IL-13R α 2. Ejemplos de tales anticuerpos son 5G1 y mAb13.2 (Wyeth PCT WO 2005/123126).

3) Inhibe la unión de IL-13 a IL-13R α 1 pero no inhibe efectivamente la unión de IL-13 a IL-13R α 2. Esto puede ocurrir por las siguientes razones: a) epítipo: una región que está involucrada en la unión a IL-13R α 1 pero no en la unión a IL-13R α 2 o no está involucrada tan fuertemente como en la unión a IL-13R α 2. Un ejemplo es 9C11; b) afinidad: dado que IL-13R α 2 tiene una afinidad mucho mayor que IL-13R α 1 por IL-13, un anticuerpo de baja afinidad puede ser capaz de bloquear la unión de IL-13 a IL-13R α 1 pero no a IL-13R α 2 a concentraciones fisiológicas de un anticuerpo terapéutico. Un ejemplo es BAK502G9, que mostró una afinidad de 2.11nM a IL-13 humana recombinante de tipo nativo según se evaluó mediante Biacore (CAT PCT WO 2005/007699). Otro ejemplo es MJ2-7, que mostró una afinidad de 1.4 nM a IL-13 humana recombinante de tipo nativo y una mayor afinidad (43 pM) por IL-13 de mono según se evaluó mediante Biacore (Wyeth PCT WO 2006/0073148A1). Debido a la diferencia de afinidad, este mAb puede inhibir la unión de IL-13 de mono a IL-13R α 2 de manera efectiva; sin embargo, éste inhibe la unión de IL-13 humana al mismo receptor con una potencia mucho menor.

Los mAbs BAK502G9 y MJ2-7 tienen epítopes similares (CAT PCT WO 2005/007699 y Wyeth PCT WO 2006/0073148A1) y compiten por la unión a IL-13 según se evaluó mediante ELISA de competencia. De manera breve, se inmovilizó BAK502G9 en una placa de ELISA seguida de lavado y bloqueo. Posteriormente se adicionó IL-13 humana biotinilada (10ng/ml) a la placa en presencia de varias concentraciones de MJ2-7 (0.2ng/ml a 20ug/ml), seguida del lavado y detección usando anticuerpo anti-biotina conjugado a HRP. Este estudio demostró que MJ2-7 competía de manera dependiente de la dosis con BAK502G9 para la unión a IL-13 humana. Una IgG de control negativo no mostró competencia con BAK502G9.

Ejemplo 1.2.D Determinación de la secuencia de aminoácidos de la región variable para cada mAb murino anti-IL-13 humana

Para cada determinación de la secuencia de aminoácidos, se aislaron aproximadamente 10×10^6 células de hibridoma mediante centrifugación y se procesaron para aislar el ARN total con Trizol (Gibco BRL/Invitrogen, Carlsbad, CA.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN total se sometió a síntesis de primera hebra de ADN usando el Sistema de Síntesis de primera hebra Superscript (Invitrogen, Carlsbad, CA) según las instrucciones del fabricante. Se usó Oligo(dT) para la síntesis de primera hebra para hacer la selección de ARN poli(A)⁺. El producto cADN de primera hebra se amplificó posteriormente mediante PCR con cebadores diseñados para la amplificación de regiones variables de inmunoglobulina murina (Ig-Primer Sets, Novagen, Madison, WI). Los productos de PCR se resolvieron en un gel de agarosa, se retiraron, se purificaron, y posteriormente se subclonaron con el kit de clonación TOPO en vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se transformaron en E. coli TOP10 químicamente competente (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se realizó PCR de colonia en los transformantes para identificar los clones que contenían el inserto. Se aisló ADN de plásmido a partir de clones que contenían el inserto usando un kit QIAprep Miniprep (Qiagen, Valencia, CA). Se secuenciaron los insertos en los plásmidos en ambas hebras para determinar las secuencias de ADN de cadena pesada variable o cadena liviana variable usando los cebadores M13 directo y M13 inverso (Fermentas Life Sciences, Hanover MD). En la Tabla 5 se describen las secuencias variable de cadena pesada y variable de cadena liviana de los 17 anticuerpos monoclonales descritos en el Ejemplo 1.2.C.

Ejemplo 2: Anticuerpos recombinantes anti-IL-13 humana

Ejemplo 2.1: Construcción y expresión de anticuerpos recombinantes quiméricos anti-IL-13 humana

Se reemplazó el ADN que codifica la región constante de cadena pesada de los anticuerpos monoclonales murinos anti-IL-13 humana 5G1, 13C5, 9C11, 21D9, y 3H7 por un fragmento de cADN que codifica la región constante de IgG1 humana que contiene 2 mutaciones de aminoácidos de la región bisagra mediante recombinación homóloga en bacterias. Estas mutaciones son un cambio de leucina a alanina en la posición 234 (numeración EU) y un cambio leucina a alanina en la posición 235 (Lund y cols., 1991, J. Immunol., 147:2657). La región constante de cadena liviana de cada uno de estos anticuerpos se reemplazó con una región constante humana kappa. Los anticuerpos quiméricos de longitud total se expresaron de manera transiente en células COS mediante co-transfección de

141

cADNs quiméricos de cadena pesada y liviana ligados en el plásmido de expresión pBOS (Mizushima y Nagata, Nucleic Acids Research 1990, Vol 18, pg 5322). Los sobrenadantes de células que contenían el anticuerpo quimérico recombinante se purificaron mediante cromatografía con sefarosa Proteína A y el anticuerpo unido se eluyó mediante la adición de amortiguador ácido. Los anticuerpos se neutralizaron y se dializaron en PBS.

Posteriormente, se evaluó la habilidad de los anticuerpos monoclonales quiméricos purificados anti-IL-13 humana para inhibir la producción de TARC inducida por IL-13 en células A-549 como se describe en los Ejemplos 1.1.C2 y 1.1.C3. La Tabla 12 muestra los valores de IC₅₀ de los bioensayos A-549 para tres anticuerpos quiméricos.

Tabla 9. Neutralización de rhIL-13 wt por Anticuerpos Quiméricos anti IL-13 en bioensayo A-549

Quimérico	IC ₅₀ promedio (M)
5G1-Quim	4.10 E-11
13C5-Quim	1.91 E-10
9C11-Quim	1.23 E-10

Ejemplo 2.2: Construcción y expresión de anticuerpos humanizados anti-IL-13 humana

Ejemplo 2.2.1: Selección de marcos de anticuerpo humano

Cada secuencia variable de cadena pesada y variable cadena liviana de genes murinos (como se describe en la Tabla 3) se alineó de manera separada contra 44 secuencias variables de cadena pesada de línea germinal de inmunoglobulina humana o 46 secuencias variables de cadena liviana de línea germinal (derivadas del sitio web NCBI Ig Blast en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/retrieveig.html>.) usando el software Vector NTI.

La humanización se basó en la homología en la secuencia de aminoácidos, análisis de grupo CDR, frecuencia de uso entre anticuerpos humanos expresados, e información disponible acerca de las estructuras cristalinas de los anticuerpos humanos. Teniendo en cuenta los posibles efectos en la unión a anticuerpo, pareamiento VH-VL, y otros factores, se mutaron los residuos murinos a residuos humanos donde los residuos marco murinos y humanos eran diferentes, con unas pocas excepciones. Se diseñaron estrategias de humanización adicionales con

base en un análisis de secuencias de anticuerpo de línea germinal humana, o un subgrupo de las mismas, que poseían un alto grado de homología, i.e., similitud en la secuencia, a la secuencia de aminoácidos real de las regiones variables del anticuerpo murino.

- 5 Se usó modelamiento de homología para identificar los residuos únicos a las secuencias de anticuerpo murino que se predijo serían críticas para la estructura del sitio de combinación del anticuerpo (las CDRs). El modelamiento de homología es un método computacional mediante el cual se generan coordenadas tridimensionales aproximadas para una proteína. La fuente de las
- 10 coordenadas iniciales y la guía para su refinamiento posterior es una segunda proteína, la proteína de referencia, para la que se conocen las coordenadas tridimensionales y cuya secuencia está relacionada con la secuencia de la primera proteína. La relación entre las secuencias de las dos proteínas se usa para generar una correspondencia entre la proteína de referencia y la proteína
- 15 para la cual se desean las coordenadas, la proteína objetivo. Las secuencias primarias de las proteínas objetivo y de referencia se alinean con coordenadas de porciones idénticas de las dos proteínas transferidas directamente desde la proteína de referencia a la proteína objetivo. Las coordenadas de las porciones dispares de las dos proteínas, e.g. de mutaciones de residuos, inserciones, o
- 20 eliminaciones, se construyen a partir de plantillas estructurales genéricas y energía refinada para asegurar la consistencia con las coordenadas del modelo que ya han sido transferidas. Esta estructura computacional de la proteína puede ser refinada posteriormente o empleada directamente en los estudios de modelamiento. A partir de esta descripción, debe ser claro que la calidad de la
- 25 estructura modelo está determinada por la certeza del supuesto que las proteínas objetivo y de referencia están relacionadas y la precisión con que se construya la alineación de las secuencias.

Para las secuencias murinas 5G1, 13C5 y 9C11, se usó una combinación de búsqueda BLAST e inspección visual para identificar estructuras de referencia

30 adecuadas. Se considera que una identidad de secuencia del 25% entre las secuencias de aminoácido objetivo y de referencia es la mínima necesaria para intentar realizar un ejercicio de modelamiento de homología. Las alineaciones de secuencia se construyeron manualmente y las coordenadas del modelo se generaron con el programa Jackal (ver Petrey, D., Xiang, Z., Tang, C.L., Xie, L.,

35 Gimpelev, M., Mitros, T., Soto, C.S., Goldsmith-Fischman, S., Kernytsky, A., Schlessinger, A., y cols. 2003. Using multiple structure alignments, fast model

building, y energetic analysis in fold recognition and homology modeling. *Proteíns* 53 (Supl. 6): 430-435).

Las secuencias primarias de las regiones marco murina y humana de los anticuerpos seleccionados comparten una identidad significativa. Las posiciones
5 de los residuos que difieren son candidatas para la inclusión del residuo murino en la secuencia humanizada con el fin de retener la potencia de unión observada del anticuerpo murino. Se construyó manualmente una lista de residuos marco que difieren entre las secuencias humana y murina.

La probabilidad de que un residuo marco dado impacte las propiedades de unión
10 del anticuerpo depende de su proximidad a los residuos de la CDR. Por lo tanto, usando las estructuras modelo, se clasificaron los residuos que diferían entre las secuencias murina y humana, de acuerdo con su distancia desde cualquier átomo en las CDRs. Aquellos residuos que caían dentro de 4.5 Å de cualquier átomo de CDR fueron identificados como más importantes y se recomendaron como
15 candidatos para la retención del residuo murino en el anticuerpo humanizado (i.e. retromutación).

Para la humanización de las regiones variables de 5G1, se siguió el enfoque general provisto en la presente invención. Primero, se construyó un modelo molecular de las regiones variables de 5G1 con la ayuda de los programas de
20 computador ABMOD y ENCAD (Levitt, M., J. Mol. Biol. 168: 595-620 (1983)). Posteriormente, con base en una búsqueda de homología contra secuencias segmento V y J humanas, se seleccionaron el segmento VH 21/28 (Dersimonian, H., y cols., J. Immunol. 139: 2496-2501 (1987)) y el segmento J JH4 (Ravetch, J.V., y cols., Cell 27: 583-591 (1981)) para proveer los marcos para la región
25 variable de cadena pesada de Hu5G1. Para la región variable de cadena liviana de 5G1, se usaron el segmento VL HF-21/28 (Chastagner, P., y cols., Gene 101: 305-306 (1991)) y el segmento J JK4 (Hieter, P.A., y cols., J. Biol. Chem. 257: 1516-1522 (1982)). La identidad de los aminoácidos marco entre 5G1 VH y los segmentos aceptores humanos 21/28 y JH4 era 72%, mientras que la identidad
30 entre 5G1 VL y los segmentos aceptores humanos HF21/28 y JK4 era 83%. En las posiciones marco en las que el modelo de computador sugería un contacto significativo con las CDRs, se sustituyeron los aminoácidos de las regiones V de ratón con los aminoácidos marco humanos originales. Esto se hizo en los residuos 48, 67, 68, 70, 72, 74 y 97 de la cadena pesada. Para la cadena liviana,
35 el reemplazo se hizo en el residuo 50. Los residuos marco que aparecían muy

- raramente en sus posiciones respectivas en los subgrupos de la región V humana correspondiente, se reemplazaron con aminoácidos humanos de consenso en esas posiciones. Esto se realizó en los residuos 44 y 76 de la cadena pesada, y en los residuos 2, 15, 41, 42, 44 y 51 de la cadena liviana.
- 5 Para la humanización de las regiones variables de 13C5, se siguió el enfoque general provisto en la presente invención. Primero, se construyó un modelo molecular de las regiones variables de 13C5 con la ayuda de los programas de computador ABMOD y ENCAD (Levitt, M., J. Mol. Biol. 168: 595-620 (1983)). Luego, con base en una búsqueda de homología contra las secuencias de los
- 10 segmentos V y J humanos, se seleccionaron el segmento VH M60 (Schroeder, Jr., H.W. y Wang, J. Y., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6146-6150 (1990)) y el segmento J JH4 (Ravetch, J.V., y cols., Cell 27: 583-591 (1981)) para proveer los marcos para la region variable de cadena pesada de Hu13C5. Para la región variable de cadena liviana de Hu13C5, se usaron el segmento VL III-3R
- 15 (Manheimer-Lory, A., y cols., J. Exp. Med. 174: 1639-1652 (1991)) y el segmento J JK4 (Hieter, P.A., y cols., J. Biol. Chem. 257: 1516-1522 (1982)). La identidad de los aminoácidos marco entre 13C5 VH y los segmentos aceptores humanos M60 y JH4 era 74%, mientras que la identidad entre 13C5 VL y los segmentos aceptores humanos III-3R y JK4 era 75%.
- 20 En las posiciones marco en las que el modelo de computador sugería un contacto significativo con las CDRs, se sustituyeron los aminoácidos de las regiones V de ratón por los aminoácidos marco humanos originales. Esto se hizo en los residuos 22, 49 y 71 para la cadena liviana. Los residuos marco que raramente se encontraban en sus posiciones respectivas en los subgrupos de región humana V
- 25 correspondientes, se reemplazaron con aminoácidos humanos de consenso en esas posiciones. Esto se hizo en los residuos 10, 46, 83, 84, 86 y 87 de la cadena pesada, y en los residuos 62 y 73 de la cadena liviana.

Las secuencias de aminoácidos de VL y VH de mAbs humanizados se muestran en la Tabla 10.

30 **Tabla 10:** **Lista de secuencias de aminoácidos de mAbs humanizados**

ID de SEC No.	Región de la proteína		Secuencia

			123456789012345678901234567890
70	VH 5G1.1		EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT TYGVSWVRQAPGQGLEWIGETIYPGNYNTYY NEKFRGKATMTTDTSTSTAYMELRSLRSDD TAVYYCSRWRTSYFSDYGYFDYWGQGTIVT VSS
71	VL 5G1.1		DVVMTQSPPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLV HSHGNTYLHWYQQRPGQSPRLLIYTVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCSQSTHVPYTFGGGTKVEIKR
72	VH 5G1.2		EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT TYGVSWVRQAPGQGLEWIGETIYPGNYNTYY NEKFRGKATLTADKSTSTAYMELSSLRSDD TAVYFCSRWRTSYFSDYGYFDYWGQGTIVT VSS
73	VL 5G1.2		DVVMTQSPPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLV HSHGNTYLHWYQQRPGQSPRLLIYTVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YFCSQSTHVPYTFGGGTKVEIKR
74	VH 5G1.3		EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT TYGVSWVRQAPGQGLEWIGETIYPGNYNTYY NEKFRGKATLTADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYVCSRWRTSYFSDYGYFDYWGQGTIVT VSS
75	VL 5G1.3		DIVMTQSPPLSLPVTFGQPASISCRSSQSLV HSHGNTYLHWYQKPGQSPKLLIYTVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCSQSTHVPYTFGGGTKVEIK
76	VH 13C5.1		EVTLKESGPVLVKPTETLTTLCTFSGFSL TSDMGVDWIRPPGKALEWLAHIWDDVVR YNPALKSRLTISKDTSKSQVLTMTNMDPV DTATYYCARTVSSGYIYYAMDYWGQGTIVT VSS
77	VL 13C5.1		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIR NYLNWYQKPGKVVKLLIYTSKLHSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQ GNTLPLTFGGGTKVEIKR
78	VH 13C5.2		EVTLEKESGPVLVKPTETLTTLCTFSGFSL TSDMGVDWIRPPGKALEWLAHIWDDVVR YNPALKSRLTISKDTSKSQVLTMTNMDPV DTATYYCARTVSSGYIYYAMDYWGQGTIVT VSS
79	VL 13C5.2		DIQMTQTPSSLSASVGDRVTISCRASQDIR NYLNWYQKPGKVVKLLIFYTSKLHSGVPS RFSGSGSGTDYTLTISLQPEDVATYFCQQ GNTLPLTFGGGTKVEIKR
80	VH 13C5.5		EVTLRSGPGLVKPTQTLTLCTLYGFSL TSDMGVDWIRPPGKLEWLAHIWDDVVR YNPALKSRLTISKDTSKNQVVKLTSDVPV DTATYYCARTVSSGYIYYAMDYWGQGTIVT VSS
81	VL 13C5.5		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTISCRASQDIR NYLNWYQQKPGKAPKLLIFYTSKLHSGVPS RFSGSGSGTDYTLTISLQPEDVATYYCQQ GNTLPLTFGGGTKVEIK

146

82	VH 9C11.1		EVOLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT SSWIHWVRQAPGQGLEWIGMIHPSDSETRL NQKFKDRATMTVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCASTATDFDYWGOGTTVTVSS
83	VL 9C11.1		DVVLQTQPLSLPVTGPGEPAISCRSTQTLL NSDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCFQNNYLPLTFGAGTKLEIKR
84	VH 9C11.2		EVOLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT SSWIHWVNQAPGQGLEWIGMIHPSDSETRL NQKFKDKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCASTATDFDYWGOGTTVTVSS
85	VL 9C11.2		DVVLQTQPLSLPVTGPGEPAISCRSTQTLL NSDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCFQNNYLPLTFGAGTKLEIKR
90	VH 5G1.5		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT TYGVSWVRQAPGQGLEWIGETYPGNYNTFY NEKFRGKATLTADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCSRWRTSYFSDYGYFDYWGOGTLVT VSS
91	VL 5G1.5		DIVMTQSPSLPVTGPQPASISCRSSQSLV HSHGNTYLDWYLQKPGQSPKLLIYTVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCSQSTHVPYTFGGGKVEIK
80	VH 13C5.5L2E		EVTLRSGPGLVKPTQTLTLTCTLYGFSLS TSDMGVDWIRQPPGKGLEWLAHIWDDVKR YNPALKSRLTISKDTSKNQVVLKLTSDVPV DTATYYCARTVSSGYIYYAMDYWGOGTLVT VSS
92	VL 13C5.5L2E		DIQ MTQSPSSLSASVGDRVTISCRASQDIRNYL NWKYQQKPGKAPKLLIFYTSMKPRGVPSRFS GSGSGTDYTLTISSLPEDIATYYCQQGNT LPLTFGGGKVEIK
80	VH 13C5.5L3F		EVTLRSGPGLVKPTQTLTLTCTLYGFSLS TSDMGVDWIRQPPGKGLEWLAHIWDDVKR YNPALKSRLTISKDTSKNQVVLKLTSDVPV DTATYYCARTVSSGYIYYAMDYWGOGTLVT VSS
93	VL 13C5.5L3F		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTISCRASQDIR NYLNWKYQQKPGKAPKLLIFYTSMKPRGVPS RFSGSGSGTDYTLTISSLPEDIATYYCQQ GLTPPLTFGGGKVEIK
80	VH 13C5.5L2EL3F		EVTLRSGPGLVKPTQTLTLTCTLYGFSLS TSDMGVDWIRQPPGKGLEWLAHIWDDVKR YNPALKSRLTISKDTSKNQVVLKLTSDVPV DTATYYCARTVSSGYIYYAMDYWGOGTLVT VSS
94	VL 13C5.5L2EL3F		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTISCRASQDIR NYLNWKYQQKPGKAPKLLIFYTSMKPRGVPS RFSGSGSGTDYTLTISSLPEDIATYYCQQ GLTPPLTFGGGKVEIK

Ejemplo 2.2.2: Construcción de anticuerpos humanizados

147

Los anticuerpos humanizados contruidos *in silico* descritos anteriormente se construyeron *de novo* usando oligonucleótidos. Para cada región variable de cADN, 6 oligonucleotidos de 60-80 nucleótidos cada uno fueron diseñados para solaparse entre ellos por 20 nucleótidos en el extremo 5' y/o 3' de cada oligonucleótido. En una reacción de anillamiento, todos los 6 oligos se combinaron, se hirvieron, y anillaron en presencia de dNTPs. Posteriormente se adicionó ADN polimerasa I, fragmente grande (Klenow) (New England Biolabs #M0210, Beverley, MA.) para llenar las brechas de aproximadamente 40bp entre los oligonucleótidos que se solapaban. Posteriormente se realizó PCR para amplificar la región variable entera del gen usando dos cebadores extremos que contenían secuencias sobresalientes complementarias al sitio de multiple clonación en un vector pBOS modificado (Mizushima, S. y Nagata, S., (1990) Nucleic acids Research Vol 18, No. 17)). Los productos de PCR derivados de cada montaje de cADN se separaron en un gel de agarosa y la banda correspondiente al tamaño predicho de cADN de región variable se retiró y se purificó. La región variable pesada se insertó en el marco en un fragmento de cADN que codificaba la región constante de IgG1 humana que contenía 2 mutaciones de aminoácidos en la región bisagra mediante recombinación homóloga en bacteria. Esas mutaciones son un cambio leucina a alanina en la posición 234 (numeración EU) y un cambio leucina a alanina en la posición 235 (Lund y cols., 1991, J. Immunol., 147:2657). La región variable de cadena liviana se insertó en el marco con la región constante kappa humana mediante recombinación homóloga. Se aislaron colonias de bacterias y se extrajo ADN de plásmido; Los insertos de cADN se secuenciaron en su totalidad. Las cadenas liviana y pesada humanizadas correctas correspondientes a cada anticuerpo se co-transfectaron en células COS para producir de manera transiente anticuerpos humanizados de longitud completa anti-IL-13 humana. Para 13C5, los vectores pBOS que contenían cADN con injerto de cadena pesada de 13C5 y cADN con injerto de cadena liviana de 13C5 se co-transfectaron en células COS. Los sobrenadantes de células que contenían anticuerpo quimérico recombinante se purificaron mediante cromatografía en sefarosa proteína A y el anticuerpo unido se eluyó mediante la adición de amortiguador ácido. Los anticuerpos se neutralizaron y se dializaron en PBS. En la tabla 10 se describen diversos anticuerpos humanizados.

Se determinó la habilidad de los anticuerpos humanizados purificados para inhibir la actividad de IL-13 usando el bioensayo A-549 como se describió en los Ejemplos 1.1.C. Las afinidades de unión a IL-13 recombinante humana de los

anticuerpos humanizados se determinaron usando medidas de resonancia de plasmón de superficie (Biacore®) como se describió en el Ejemplo 1.1.B. La Tabla 11 muestra valores de IC₅₀ de los bioensayos A-549 y la afinidad de los primeros seis anticuerpos humanizados descritos en la Tabla 10 para IL-13 humana wt y variante de IL-13.

Tabla 11: Potencia de neutralización y afinidad de mAbs humanizados anti IL-13.

mAb	Potencia (IC ₅₀), M		Afinidad a hIL-13 wt		
	hIL-13 wt	hIL-13v	k _{on} (1/M·s)	k _{off} (1/s)	K _D (M)
5G1-Quim	7.69 E-11	6.92 E-11	9.15 E+05	3.82 E-05	4.17 E-11
5G1.1	2.90 E-11	7.41 E-11	7.86 E+05	2.14 E-05	2.72 E-11
5G1.2	2.95 E-11	5.53 E-11	8.35 E+05	8.81 E-05	1.05 E-11
5G1.5	1.14 E-10	6.55 E-11	8.69 E+05	1.91 E-05	2.20 E-11
13C5-Quim	1.07 E-10	3.70 E-11	1.70 E+06	9.65 E-05	5.68 E-11
13C5.1	8.68 E-10	3.69 E-10	6.68 E+05	4.74 E-04	7.10 E-10
13C5.2	1.93 E-10	1.30 E-10	1.26 E+06	1.23 E-04	9.79 E-11
13C5.5	1.24 E-10	6.90 E-11	2.51 E+06	1.76 E-04	7.01 E-11

Posteriormente, se mutaron las secuencias CDR del anticuerpo humanizado 13C5.5 usando técnicas conocidas en el arte, y se generaron tres anticuerpos humanizados adicionales. Se determinó la habilidad de esos anticuerpos humanizados adicionales para inhibir la actividad de IL-13 humana, de cynomolgus y de rhesus usando el bioensayo A-549 como se describió en los Ejemplos 1.1. C. Se determinaron las afinidades de unión de los anticuerpos humanizados adicionales a IL-13 recombinante humana, de cynomolgus y de rhesus usando medidas de resonancia de plasmón de superficie (Biacore®) como se describe en el Ejemplo 1.1.B. Adicionalmente a la unión a y la inhibición de IL-13 humana, estos tres anticuerpos adicionales mostraron una afinidad mejorada a IL-13 de cynomolgus y de rhesus. La Tabla 12 muestra los valores de IC₅₀ de los bioensayos A-549, y la Tabla 13 muestra la afinidad de los anticuerpos humanizados adicionales a IL-13 humana, de cynomolgus y de rhesus.

Tabla 12: Potencia de neutralización de mAbs humanizados adicionales anti-IL13

mAb	Potencia (IC ₅₀ , nM)		
	IL-13 humana	IL-13 de cynomolgus	IL-13 de Rhesus
13C5.5L2E	0.18	1.20	0.40
13C5.5L3F	0.15	0.46	0.14
13C5.5L2EL3F	0.12	0.48	0.26

Tabla 13: **Afinidad de unión de mAbs humanizados adicionales anti IL-13**

mAb	Afinidad (K _D , nM)		
	IL-13 humana	IL-13 de cynomolgus	IL-13 de rhesus
13C5.5L2E	0.12	0.52	0.29
13C5.5L3F	0.24	0.19	0.11
13C5.5L2EL3F	0.25	0.32	0.13

Ejemplo 2.2.3: **Caracterización de anticuerpos humanizados anti IL-13**

Hemos aislado anticuerpos monoclonales que bloquean la unión de IL-13 a IL-13Rα1 e IL-13Rα2. El ensayo de unión a receptor basado en ELISA y el ensayo de unión a IL-13 marcada con ¹²⁵I sobre la superficie celular demostraron que 13C5, versión murina y versión humanizada (i.e. 13C5.5), era capaz de bloquear de manera efectiva la unión de IL-13 a ambos receptores. Los anticuerpos del mismo linaje que 13C5, incluyendo 25C8 y 33C3, también eran capaces de bloquear la unión de IL-13 a ambos receptores.

Ejemplo 2.2.3.a: **Anticuerpos humanizados anti IL-13 bloquean la unión de IL-13 al receptor de IL-13**

Para determinar la habilidad del anticuerpo humanizado 13C5.5 para bloquear la unión de IL-13 a los receptores de IL-13 (IL-13Rα1 e IL-13Rα2), se usó un ensayo de unión a receptor basado en ELISA. Se recubrieron placas de ELISA de alta unión de 96 pozos con 4 ug/ml de IL-13Ra1/Fc o IL-13Ra2/Fc humano recombinante (R&D Systems) en 100ul/pozo de amortiguador de recubrimiento (amortiguador carbonato-bicarbonato, Pierce) a 4°C. Después de 16hr, se removió la solución de recubrimiento desechando el contenido de las placas en el lavabo, y las placas se lavaron y se bloquearon 4 veces con Amortiguador de bloqueo Superblock (240ul/pozo) (Pierce). Se adicionaron mAb humanizado anti-

ASD

IL-13 13c5.5 y mAbs de control (diluidos serialmente 1:4 a partir de 40ug/ml, 50ul/pozo) y Biotina-IL-13 (50ul/pozo, concentraciones finales de 5nM para hIL-13Ra1/Fc, y 0.5nM para hIL-13Ra2/Fc) y se incubó durante 2hr a temperatura ambiente (TA). Las placas se lavaron 5 veces con 300ul de PBST 0.1%, y luego se adicionaron 100 ul de mAb de ratón anti-Biotina (Jackson Immunosciences) diluido 1:5000 y se incubó a TA durante 45 min. Las cajas se lavaron nuevamente 5 veces con 300ul de PBST 0.1%, seguido de la adición de reactivo sustrato TMB (100ul/pozo, Pharmingen); se desarrollaron durante 5 min, y se detuvieron adicionando 50ul de H2SO4 2M (VWR). Se determinaron las densidades ópticas a 450nm mediante espectrofotometría. Los resultados se muestran en la Tabla 14.

Adicionalmente, también se evaluaron las propiedades de bloqueo de receptor de los mAbs humanizados mediante ensayo de unión a receptor basado en superficie celular usando células COS transfectadas con IL-13R α 2. La IL-13 humana recombinante se marcó con ¹²⁵I (Amersham, Arlington Heights, EL), usando reactivo IODO-GEN (Pierce, Rockford, EL) como se describió previamente (Obiri NI y cols., (1995) J Biol Chem. 270:8797-8804). Se estimó que la actividad específica de la IL-13 radiomarcada era 158 μ Ci/ μ g proteína. La IL-13 marcada exhibía bioactividad similar a la IL-13 sin marcar, según se evaluó mediante el bioensayo A-549. Para los experimentos de unión, las células COS se transfectaron transientemente con IL-13Ra2 humana mediante Lipofectamine 2000 (Invitrogen), y se incubó durante 48 hr. Las células COS transfectadas (5 x 10⁵ células en 100 μ L de amortiguador de unión: RPMI 1640 que contenía albúmina de suero humano 0.2% y 10 mmol de HEPES) se incubaron con ¹²⁵I-IL-13 1.0 nM con o sin IL-13 sin marcar 1 μ M a 4°C durante 2 horas. Se separó la ¹²⁵I-IL-13 unida a células de la ¹²⁵I-IL-13 sin unir mediante centrifugación a través de un gradiente de aceite ftalato, y se determinó la radioactividad con un contador gamma (Wallac, Gaithersburg, MD). Para el ensayo de desplazamiento de anticuerpos, se incubaron células COS transfectadas con ¹²⁵I-IL-13 (1.0 nM) con o sin concentraciones crecientes (hasta 50 ug/ml) de anticuerpo humanizado anti-IL-13 13C5.5, como se describió anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14: **Potencia de mAbs para bloquear la unión de IL-13 humana (wt) a IL-13R α 2 humano en ensayos de unión a receptor basados en superficie celular y basados en ELISA**

1571

mAb	Potencia (IC ₅₀ , nM)	
	Superficie celular	ELISA
13C5.5	2.7	1.1
BAK502G9	75.8	34.3
5G1.5	P.B.	P.B.
mAb13.2	P.B.	P.B.
MJ2-7	17.6	19.0

P.B. bloqueo parcial que no alcanza una inhibición del 50%.

La Tabla 15 muestra la afinidad de unión del anticuerpo humanizado 13C5.5 y otros anticuerpos anti-IL-13.

Tabla 15: Afinidad de unión de mAbs anti-IL-13 evaluada mediante Biacore

mAb	Afinidad (K _D , nM)	
	IL-13 humana wt	variante de IL-13 humana
13C5.5	0.07	0.05
BAK502G9	2.10	0.17
mAb13.2	0.11	0.20
MJ2-7	1.14	0.79

En los ensayos de unión a receptor basados en superficie celular y basados en ELISA, 13C5.5 exhibe una alta potencia en el bloqueo de la unión de IL-13 humana a IL-13Rα2 humano, con un IC₅₀ entre 1 y 3 nM. Dado que BAK502G9 y MJ2-7 también eran capaces de reducir la señal de unión, sus potencias eran mucho menores que aquella de 13C5.5 (ver Tabla 14), al menos parcialmente debido a su menor afinidad por IL-13 humana wt (ver Tabla 15). El mAb13.2 no era capaz de inhibir la unión de IL-13 a IL-13Ra2, consistente con su epítope. Adicionalmente, 13C5.5 podría lograr una inhibición del 100% en ambos ensayos a una concentración de 100 nM (o 15ug/ml). A la misma concentración, BAK502G9 y MJ2-7 exhibieron una inhibición de solo 40% y 70% respectivamente, en el ensayo de unión a receptor basado en superficie celular, y ambos exhibían una inhibición de solo 60% en el ensayo de unión a receptor basado en ELISA.

Para un mAb terapéutico con vida media en suero de entre 10 y 20 días en el hombre, la concentración en suero está normalmente entre 5-15 ug/ml, con un

régimen de dosis semanal o bi-semanal IV o SC 3mpk o menos. Con base en este cálculo, 13C5.5 es actualmente el único mAb anti-IL-13 que podría bloquear completamente (100%) la unión de IL-13 humana a IL-13R α 2 *in vivo* como un mAb terapéutico, a una concentración en suero de 100 nM (o 15ug/ml), bajo un
5 régimen de dosis convencional de un anticuerpo monoclonal.

Ejemplo 2.2.3.b: Unión de anticuerpos anti IL-13 a un epítipo específico en IL-13

Se realizó un mapeo de los epítopes en IL-13 humana a los que unen los mAbs anti-IL-13 13C5, 13C5.5, 9C11 y 5G1 usando una técnica de excisión de epítipo, seguida de análisis de péptidos con espectrometría de masas (EM). En la excisión de epítopes, primero se unía la proteína a un mAb inmovilizado y posteriormente se hacía una digestión con enzimas proteolíticas. Las regiones de epítipo en la proteína se determinaron usando EM y EM/EM para identificar los péptidos que contenían el epítipo. Se suspendieron esferas de sefarosa activadas con CNBr
10 (Amersham Biosciences, 10mg/reacción) en 500uL de HCl 0.1 M y se equilibraron durante 15 min. Las esferas se transfirieron a columnas de reacción compactas (USB Corporation) y se lavaron con HCl 0.1 M seguido de amortiguador de acoplamiento de NaHCO₃ 0.1 M. Se adicionó el mAb (100ug) a la suspensión y se incubó durante 2 h con rotación lenta a temperatura ambiente. Las esferas con
15 el mAb enlazado de manera covalente se lavaron con amortiguador Tris-HCl 0.1 M ~pH 8.0. El bloqueo de los grupos de las esferas de sefarosa CNBr que no reaccionaron se llevó a cabo mediante la incubación durante 2 h con un amortiguador Tris-HCl 0.1 M ~pH 8.0. Se removió el mAb no acoplado mediante lavado secuencial con dos amortiguadores de diferente pH; 1) amortiguador acetato de sodio 0.1 M, NaCl 0.5 M ~pH 4.0 y, 2) amortiguador Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.5M ~pH 8.0 buffer. Las esferas se equilibraron en PBS NaCl ~0.14 M, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 4.3 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM, pH 7.2 y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente, con y sin IL-13. Después de lavar las esferas con PBS ~pH 7.2, se removió una alícuota de la suspensión para análisis MALDI-TOF.
20
25

30 La proteína unida por afinidad se sometió a digestión con diferentes proteasas (relación enzima:sustrato 1:100~1:20) durante 12 h. Las proteasas usadas incluían: Tripsina, GluC, Quimiotripsina, Carboxipeptidasa Y y aminopeptidasa M. Después de la proteólisis, se lavaron las esferas con 500uL de amortiguador de digestión. Los últimos 100uL de solución de lavado se guardaron como el
35 control. Se adicionaron aproximadamente 100 uL de TFA 2% a las esferas y se

recolectaron. Las soluciones de control y de lavado ácido se concentraron a aproximadamente 20uL bajo vacío. Posteriormente los péptidos se desalinizaron con puntas ziptips C18. Las muestras se analizaron mediante MALDI-ToF EM, usando un sistema Voyager DE o Voyager DE-Pro. El análisis mediante nano-ESI-CL-EM/EM se realizó en un sistema capilar de HPLC Agilent 1100 con una interface a un sistema Sciex Q-Star Pulsar i MS.

Al estudiar los epítopes de 13C5, dos proteasas usadas en pasos secuenciales daban los mejores resultados. Con quimiomotripsina, se detectó un péptido principal que consistía de los residuos de aminoácido 100-130 de ID de SEC No., lo que indica que éste podría contener el(los) epítipo(s). También se detectaron pequeñas cantidades de péptidos de residuos de aminoácido 103-130 y 104-130 de ID de SEC No. 1.

Después de la digestión con quimiotripsina se usó aminopeptidasa M. el principal péptido detectado fueron los residuos de aminoácido 104-130 de ID de SEC No., lo que sugiere que los 4 residuos amino N-terminal (80-83) no eran parte del epítipo. La posterior digestión con carboxipeptidasa Y resultó en pérdida de la afinidad. No se observó ningún péptido después de la digestión y el lavado. Todas las secuencias de péptidos se confirmaron usando nano-ESI-CL-EM/EM.

El mapeo de epítipo de 13C5 y 13C5.5 indicó que su(s) sitio(s) de unión incluían la región Hélice D C-terminal de IL-13 humana (residuos VRDTK IEVAQ FVKDLL HLK KLFRE GR, correspondientes a los aminoácidos 104-130 de ID de SEC No. 1). Se ha propuesto que la región hélice D C-terminal está involucrada en las interacciones con el receptor de IL-13 (Zuegg y cols., 2001 Immunol Cell Biol. 79:332-9).

25 **Ejemplo 2.3: Cristalización de anti-IL-13 acomplejado a IL-13.**

Se acomplejó la porción Fab de 13C5.5 con IL-13 humana y se generaron los cristales del complejo como sigue.

Ejemplo 2.3.1: Preparación y Purificación del Fragmento Fab 13C5.5.

Para preparar el fragmento Fab 13C5.5, primero se concentró 13C5.5 IgG en amortiguador PBS 0.15 M hasta 2 mg/ml usando un dispositivo de filtro de centrifugación Ultrafree-15 Biomax (Millipore) de 10 kDa de corte de peso molecular (MWCO, por sus siglas en inglés). Se pre-lavó una suspensión de gel de papaína (Pierce) y se cargó en 2-3X con amortiguador A (Na₂HPO₄ 20 mM,

EDTA 10 mM, cisteína 20 mM) en una relación 1:1 en volumen. Posteriormente se mezcló el anticuerpo concentrado con suspensión de gel de papaína 50% y se incubó a 37°C durante 24 horas con agitación vigorosa. La mezcla de anticuerpo/suspensión se centrifugó (Beckman 6KR) y el sobrenadante se cargó en Superdex 75 pre-equilibrado con PBS. Un pico principal eluyó y se hizo un pool de proteína. Se preparó una columna de afinidad de 25 mL de Sefarosa Proteína A de flujo rápido (Amersham Pharmacia) lavando con 100 mL de PBS. Los fragmentos de anticuerpos del pool se aplicaron a la columna de afinidad (velocidad de flujo de 2 mL/min). Se recolectaron las fracciones que contenían fragmentos Fab 13C5.5 (monitoreados mediante la absorbancia UV a 280 nm) en el flujo de salida. Las fracciones que contenían una concentración de fragmento Fab 13C5.5 mayor a 0.3 mg/mL (determinadas mediante la absorbancia UV a 280 nm) se reunieron y se congelaron a -80°C. La pureza de la muestra se evaluó con SDS-PAGE.

15 **Ejemplo 2.3.2: Preparación del Complejo IL-13/13C5.5 Fab.**

La IL-13 humana recombinante se expresó en un sistema de expresión mamífero y posteriormente se purificó usando técnicas bien conocidas en el arte. La IL-13 humana recombinante y la proteína 13C5.5 Fab se mezclaron en una relación molar 1:1 y se incubaron durante 1 hora a 4°C. La muestra del complejo se cargó en una columna Superdex 200 preequilibrada (Tris 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM) a 0.5 mL/min. Se realizó un pool de complejo y éste se concentró hasta 24 mg/mL usando un dispositivo de filtro de centrifugación Ultrafree-15 Biomax (Millipore) de corte de peso molecular (MWCO, por sus siglas en inglés) de 10 kDa y se congeló a -80°C. La pureza de la muestra se evaluó con SDS-PAGE.

25 **Ejemplo 2.3.3: Cristalización del complejo IL-13/13C5.5 Fab**

La mezcla stock congelada del complejo IL-13/13C5.5 (~24 mg/mL) se descongeló sobre hielo. El complejo (1.0 µL) se mezcló con 1.0 µL de solución de reservorio (Sulfato de amonio 1.75 M, MES 100 mM pH 6.5, CaCl₂ 10 mM). La gota resultante se mezcló en un pozo de asentamiento de gota (placa sitting-drop CrysChem) sobre el reservorio a aproximadamente 18°C. En una semana aparecieron cristales tipo diamante.

Ejemplo 2.3.4: Crioprotección y enfriado extra rápido de los cristales del complejo IL-13/13C5.5 Fab

Se recolectaron los cristales del complejo IL-13/13C5.5 Fab usando un aro de fibra en licor madre + glicerol 20%. Posteriormente se enfriaron los cristales muy rápidamente sumergiéndolos en nitrógeno líquido.

Ejemplo 2.3.5: Recolección de datos de difracción de rayos X del complejo

IL-13/13C5.5 Fab

Los datos de difracción de rayos X de los cristales de IL-13/13C5.5 Fab se recolectaron en la línea de haz IMCA en la Fuente Avanzada de Fotones en Argonne, IL. Los cristales se mantuvieron a una temperatura de 100 K con un enfriador Cryostream de Oxford Cryosystems durante la recolección de los datos.

Se recolectaron un total de 180 marcos a un rango de oscilación de 1.0°. Los datos se procesaron con el conjunto de programas HKL2000 (Otwinowski y Minor, 1997). Después de determinar la orientación del cristal, se integraron los datos con DENZO y se hizo un escalamiento y superposición con SCALEPACK, y se pusieron en una escala absoluta y se redujeron a amplitudes de factor estructural con TRUNCATE (French y Wilson, 1978). Se asignó un cinco por ciento de reflexiones únicas, de manera aleatoria, al conjunto "libre", para el cálculo del factor R libre (R_{free}) (Brünger, 1992); el 95% restante de las reflexiones constituyó el conjunto "de trabajo", para el cálculo del factor R (R). Los datos de difracción de rayos x se resumen en la Tabla 16. Las siguientes listas que proveen un resumen para la forma cristalina: (1) IL-13/13C5.5 Fab: grupo espacial P2(1)2(1)2(1), a=163.578 Å, b=163.318 Å, c=228.627 Å, α = 90.0°,β= 90.0°γ =90.0°. La Tabla 17 presenta la estadística de difracción de rayos x para el conjunto de datos.

Tabla 16: Resumen de la Información Cristalográfica de Celda Unitaria del Complejo IL-13/13C5.5 Fab

Cristal	Grupo Espacial	a (Å)	b (Å)	c (Å)
1	P2(1)2(1)2(1)	163.578	163.318	228.627

Tabla 17: Resumen de la Estadística de Difracción de Rayos X para el Complejo IL-13/13C5.5 Fab

Cristal	Grupo Espacial	Resolución (Å)	Reflecciones únicas	R _{sim} (%)*	Cubrimiento (%)*	Multiplicidad *
---------	----------------	-------------------	------------------------	--------------------------	---------------------	--------------------

1	P2(1)2(1)2(1)	47.1 – 2.60	188.937	0.085	100.0	7.3
				(0.562)	(100.0)	(7.3)

* armazón de mayor resolución en paréntesis.

Ejemplo 2.3.6: Solución de Reemplazo Molecular y Refinamiento de la Estructura del Cristal del Complejo IL-13/13C5.5 Fab 5

Se determinó una solución de máxima probabilidad de reemplazo molecular usando el programa PHASER (Read, 2001). Se resolvieron un total de seis monómeros 13C5.5 a una resolución de 3.0 Å en el grupo espacial P2(1)2(1)2(1). El modelo de búsqueda fue la estructura del cristal de Fab reportado previamente (entrada del Proteína Data Bank IBJ; Muller y cols. 1998). Se generaron coordenadas con base en la solución de reemplazo molecular.

El refinamiento de la estructura del cristal del complejo IL-13/13C5.5 Fab comenzó con las coordenadas de la solución de reemplazo molecular, descrita anteriormente, en el grupo espacial P2(1)2(1)2(1). El refinamiento comenzó usando refinamiento de cuerpo rígido mediante el programa REFMAC disponible en el conjunto de programas CCP4 (Murshudov y cols., 1997, Collaborative Computational Project, 1994), lo que resultó en las siguientes estadísticas a 2.6 Å: R de 40.00% (Rfree 39.00%). Se observó la densidad de electrones de IL-13 *de novo*. La construcción manual de seis monómeros IL-13 fue guiada por la estructura RMN pública de IL-13 1IJZ (Moy y cols., 2001) usando el programa de gráficas moleculares O (Jones y cols., 1991) y el examen de mapas de densidad electrónica de 2Fo-Fc y Fo-Fc. El programa de refinamiento REFMAC (Murshudov y cols., 1997) se usó para rondas iterativas de refinamiento contenido resultando en las siguientes estadísticas: R de 25.8% (Rfree 30.5%). Los resultados se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18: Resumen de la estadística de refinamiento cristalográfico del complejo IL-13/13C5.5 Fab.

Cristal	Resolución	Rfree	R
	(Å)	(%)	(%)
1	10.0 – 1.50	30.5	25.8

Ejemplo 2.3.6: Estructura del complejo IL-13/13C5.5 Fab

157

Se observaron contactos extensivos entre IL-13 humana y múltiples CDRs de 13C5.5. La superficie oculta en la interface anticuerpo-antígeno es 1415.50 Å². Los contactos están compuestos de enlace de hidrógeno crítico e interacciones hidrofóbicas que estabilizan la interface. Los dos segmentos de secuencia mínimos que comprenden la mayoría de contactos de interface están sobre las hélices A y D de IL-13 (para la estructura de IL-13 ver la publicación de patente U.S. 2003-0013851 A1 incorporada aquí por referencia). Estos contactos comprometen las CDRs L1 y L3, y H2 y H3. Con base en lo anterior, el rango de unión de epítipo a 13C5.5 comprende la región topográfica definida por Ser26-Asn38, Lys123-Arg130 de ID de SEC No 1. Más preferiblemente, el rango de unión de epítipo a 13C5.5 comprende la región topográfica definida por Arg30-Asn38, Lys123-Arg127 de ID de SEC No. 1.

Ejemplo 2.4: Eficacia *in vivo* de anticuerpos a IL-13 humanizada

Se evaluó la eficacia *in vivo* de los anticuerpos anti-hIL-13 como sigue.

Ejemplo 2.4.1: Eficacia *in vivo* de anticuerpos a IL-13 humanizada en un modelo de asma inducida por IL-13 humana.

Se evaluó la eficacia de los anticuerpos anti-hIL-13 5G1, 13C5, y 13C5.5 en un modelo de asma inducida por IL-13 humana en ratón. Los ratones fueron desafiados con IL-13 humana recombinante en una dosis de 1 µg en 50 µl de PBS estéril, administrado en la tráquea con un microaspirador usando un laringoscopio de roedor para visualizar la apertura de la tráquea. Se dieron un total de 2 dosis de IL-13 en los días 1 y 2 del estudio y se midió la hiperreactividad de las vías aéreas (AHR; Hoymann, H.G.; J Pharmacol Toxicol Métodos. 2007 Jan-Feb; 55(1): 16-26) así como moco, quitinasa ácida de mamífero (AMCas, Donnelly LE, Barnes PJ., 1: Trends Pharmacol Sci. 2004 Oct;25(10):509- 11) y quimioquina regulada y activada del timo (TARC; Bisset LR, Schmid-Grendelmeier P., Curr Opin Pulm Med. 2005 Jan;11(1):35-42) en el fluido de lavado bronco-alveolar 24 hr después del desafío final. Se administraron dosis de anticuerpo de 100, 300, y 1000 µg mediante inyección intraperitoneal 1 día antes del primer desafío con IL-13 y los resultados se resumen en la Tabla 19. El anticuerpo 5G1, que no bloquea la unión de IL-13 a IL-13Rα1 o IL-13Rα2, no fue capaz de neutralizar la bioactividad de IL-13 en este modelo *in vivo* con niveles comparables de AHR, AMCasa, y Muc5ac detectados en animales tratados con 5G1 en comparación con animales control tratados con PBS. En contraste, el anticuerpo 13C5 que bloquea la unión a los receptores α1 y α2, fue efectivo

reduciendo todos los parámetros. El tratamiento con IL-13 incrementó la resistencia de las vías aéreas de 3.6 cm H₂O/ml/sec a 5.7 cm H₂O/ml/sec. El tratamiento con 13C5 (1000 µg) redujo la resistencia de las vías aéreas a 4.3 cm H₂O/ml/sec. La hipersecreción de moco, según se midió mediante los niveles de muc5ac disminuyó de 356.5 unidades a un máximo de 211 U con el tratamiento con anticuerpo correspondiente a una reducción del 40%. De manera similar, se redujeron los niveles de AMCasa de 202 U a 68 U correspondiente a una reducción del 66% con una reducción comparable vista en los niveles de TARC (n=10, p < .05, todas las dosis). El anticuerpo humanizado recombinante 13C5.5 demostró resultados similares en este modelo. La IL-13 indujo un incremento en la resistencia de las vías aéreas luego del desafío con 30 µg/ml de metacolina de 3.9 a 5.5 cm H₂O/ml/sec. El anticuerpo 13C5.5 inhibió la resistencia de las vías aéreas a 4.1, 4.45, y 4.3 cm H₂O/ml/sec para dosis de 100, 300 y 1000 µg respectivamente. La hipersecreción de moco, medida mediante los niveles de muc5ac se redujo de 247 U inducidas por el tratamiento con IL-13 a 154, 30.2, y 11.1 U para el tratamiento con dosis de anticuerpo de 100, 300, y 1000 µg respectivamente. Esto representa una inhibición del 38, 88, y 96% de la producción de moco con este anticuerpo. El tratamiento con IL-13 indujo actividad AMCasa de 130 U que fue reducida a 113, 98, y 55 U con el tratamiento con anticuerpo (dosis de 100, 300, y 1000 µg) lo que representa una inhibición del 14, 24, y 68%. Estos datos demuestran que 13C5 y el anticuerpo humanizado recombinante 13C5.5 que bloquea la unión de IL-13 a IL-13Rα1 y α2 pueden neutralizar las respuestas inducidas por IL-13 de AHR, moco, y la producción de AMCasa en el pulmón mientras que los anticuerpos que no bloquean la unión de IL-13 a los receptores α1 y α2 no son efectivos para bloquear todas esas respuestas biológicas.

Tabla 19: Eficacia de los anticuerpos anti-IL-13 humana en modelo de asma inducida por IL-13

Anticuerpo	Dosis	AHR		Moco		AMCasa		TARC	
		Resistencia (SEM)	% de inhibición	Unidades Muc5ac (SEM)	% de inhibición	Unidades arbitrarias (SEM)	% de inhibición	pg/ml (SEM)	% de inhibición
5G1	0	5.7 (0.38)	-0-	258 (37.2)	-0-	314.9 (26.1)	-0-	63.2 (14)	-0-
	100			315 (61)	-0-	225.2 (17.1)	9	111 (34.5)	-0-
	300			367.2 (63.2)	-0-	277 (21.3)	12	94.1 (24.2)	-0-
	1000	5.3 (0.35)	7	345.9 (61.6)	-0-	255.1 (18.6)	19	90.2 (17.1)	-0-

13C5	0	5.7 (0.38)		356.5 (15.8)	-0-	202.2 (18.8)	-0-	91.7 (41.7)	-0-
	100			246 (30.6)	31	146.6 (17.9)**	28	36 (10.3)	61
	300			243.2 (36.7)	32	97.2 (10.8)**	52	23.3 (4.1)	75
	1000	4.3 (0.77)*		211.6 (28)***	41	68.3 (9.2)***	66	34.4 (12.1)	62
13C5.5	0	5.54 (0.53)	-0-	247.1 (96.4)	-0-	130.4 (20.6)	-0-	NT	
	100	4.16 (0.29)*	89	153.8 (67.6)	38	113.4 (18)	13	NT	
	300	4.45 (0.41)*	70	30.2 (15.2)**	88	98.9 (10.6)	24	NT	
	1000	4.3 (0.27)*	79	11.1 (5.8)***	96	55.5 (6.4)***	57	NT	

*p<0.05, prueba T de Student

**p<0.05, ANOVA, Bonferroni

***p<0.01, ANOVA, Bonferroni

En otro estudio, se comparó la eficacia de los anticuerpos anti-hIL-13 BAK502G9, MJ2-7 y 13C5.5 en el modelo de asma inducida por IL-13 humana en ratón. Los ratones se desafiaron con IL-13 humana recombinante en una dosis de 1 µg en 50 µl de PBS estéril, administrado intranasalmente bajo sedación leve. Se dieron un total de 2 dosis de IL-13 en los días 1 y 2 del estudio y se midió la hiperreactividad de las vías aéreas, así como moco, y AMCasa, en el fluido de lavado broncoalveolar 24 hr después del reto final. Se administraron dosis de anticuerpo de 1000 µg mediante inyección intra-peritoneal 1 día antes del primer desafío con IL- 13.

Los resultados del estudio se resumen en la Tabla 20. El anticuerpo 13C5.5, que bloquea la unión de IL-13 a los receptores IL-13α1 y α2 receptores, fue efectivo en la reducción significativa de todos los parámetros. El tratamiento con IL-13 incrementó la resistencia de las vías aéreas tras el desafío con 30 mg/ml de metacolina de 4.2 cm H₂O/ml/seg a 7.2 cm H₂O/ml/seg. El tratamiento con 13C5.5 (1000 µg) redujo la resistencia de las vías aéreas en 86.8% a 4.6 cm H₂O/ml/seg. La hipersecreción de moco medida mediante los niveles de muc5ac disminuyó de 768.2 unidades a 412.9 U con el tratamiento con anticuerpo correspondiendo a una reducción de 58.8%. De manera similar, se redujeron los niveles de AMCasa de 316.5 U a 147 U correspondiendo a una reducción del 52% (n=10, p < .001).

160

Los anticuerpos BAK502G9 y MJ2-7, que inhiben la unión de IL-13 a IL-13R α 1 pero que no inhiben de manera efectiva la unión de IL-13 a IL-13R α 2 demostraron una habilidad comparable para neutralizar la AHR inducida por IL-13 en este modelo. Los anticuerpos BAK502G9 y MJ2-7 solo inhibieron la resistencia de las vías aéreas de 7.2 a 5.96 cm H₂O/ml/seg y 5.93 cm H₂O/ml/seg respectivamente, lo que representa una reducción del 42% y 41.5% en la AHR. La hipersecreción de moco medida mediante los niveles de muc5ac se redujo de 768.2 U inducida por el tratamiento con IL-13 a 627.8 y 380 U en dosis de anticuerpo de 1000 μ g lo que corresponde a una inhibición del 23% y 64% por los anticuerpos BAK502G9 o MJ2-7 respectivamente. El anticuerpo BAK502G9 era menos efectivo para inhibir la AMCasa en comparación con los anticuerpos 13C5.5 o MJ2-7. El tratamiento con IL-13 indujo 316.5 U de actividad AMCasa que fue reducida a 279, y 169 U por el tratamiento con anticuerpo BAK502G9 o MJ2-7 (dosis 1000 μ g) lo que representa una inhibición del 8% y 45%, respectivamente. Estos datos demuestran que el anticuerpo humanizado recombinante 13C5.5 que bloquea la unión de IL-13 a IL- 13R α 1 y α 2 es más efectivo al neutralizar las respuestas inducidas por IL-13 de AHR, moco, y producción de AMCasa en el pulmón mientras que los anticuerpos que bloquean la unión de IL-13 al receptor IL-13 α 2 con menor afinidad no son tan efectivos al bloquear estas respuestas biológicas que contribuyen a la patogénesis del asma.

Tabla 20: Comparación de los anticuerpos 13C5.5, BAK502G9, y MJ2-en el modelo de asma inducida por IL-13

Anticuerpo	Dosis (ug)	AHR		Moco		AMCasa	
		Resistencia (SEM)	% de inhibición	Unidades Muc5ac (SEM)	% de inhibición	Unidades arbitrarias (SEM)	% de inhibición
PBS	0	7.2 (0.77)	-0-	768.2 (108)	-0-	316.5 (43)	-0-
13C5.5	1000	4.6 (0.3)	86.8	412.9 (77.3)	46	147 (27)	54
BAK502G9	1000	5.9 (0.38)	41.7	627.8 (59.7)	18	279.4 (28.5)	12
MJ2-7	1000	5.9 (0.67)	42.5	380 (48.5)	50.5	169 (20)	47

Ejemplo 2.4.2: Eficacia *in vivo* de anticuerpos a IL-13 en un modelo de asma en ratón inducida por OVA

Para determinar si las propiedades de bloqueo de receptor (particularmente con respecto a IL-13R α 2) impactan la eficacia *in vivo* de los mAbs en modelos de asma en ratón, se generó un panel de anticuerpos de rata anti-IL-13 de ratón que

16A

exhibían diferentes propiedades de bloqueo de receptor, como se determinó mediante ELISA de unión a receptor usando proteínas mL-13Rα1/Fc y mL-13Rα2/Fc (R&D Systems) (ver Tabla 21). Dado que el mAb 3H7 anti-hIL-13 presenta reacción cruzada con IL-13 de ratón, sus propiedades anti-mIL-13 también se incluyen en la Tabla 21. Las afinidades de unión de los anticuerpos a IL-13 de ratón se midieron usando ensayo BIACORE contra IL-13 recombinante de ratón (R&D Systems), y se determinaron las potencias (IC50) de los anticuerpos contra IL-13 de ratón mediante ensayo A-549 contra IL-13 recombinante de ratón. Los dominios de secuencia variable de 51D9 y 48D3 se muestran en la Tabla 22.

Tabla 21. Caracterización de anticuerpos monoclonales anti-mIL-13

# de Clon	Isotipo	K _D (M)	IC ₅₀ (M)	Bloquea la unión de IL-13 de ratón a	
				mIL-13Rα1	mIL-13Rα2
3H7	IgG1de ratón	1.12 E-08	2.43 E-9	Si	Si
51D9	IgG1κ de rata	1.45 E-10	3.43 E-10	Si	Si
48D3	IgG1κ de rata	1.05 E-10	4.91 E-11	Si	No
53F5	IgG1κ de rata	2.82 E-10	2.89 E-10	No	Si
74H2	IgG2ακ de rata	3.92 E-10	9.76 E-10	No	Si
25C7	IgG2αλ de rata	4.22 E-10	6.09 E-10	Si	Si
54D1	IgG1κ de rata	3.40 E-11	2.40 E-11	Si	Si

Tabla 22. Lista de secuencias de aminoácidos de regiones VH y VL de mAbs de rata anti-mIL-13

ID de SEC No.	Región de la proteína		Secuencia
			123456789012345678901234567890

162

86	VH 51D9		OTQLVQSGPELKKPGESVKISCRASGYTFT DYAMHWVKQAPGKGLKWMAWINTYTGKPTY ADDFKGRFVFSLEASASTATLQISNLKNE TATYFCARAGRTEGTHYAMDAGQGTSVT VSS
87	VL 51D9		DIVLTQSPVLAVSLGQRATISCRASQSVSI SSSDLMHWYQQRPGHQPKLLIYRTSNLVSG IPARFSGSGSGTDFTLTIDPVQADDIAAYY CQQGRESPTWTFGGGTKLELKR
88	VH 48D3		EVQLVESGGDLVQPGRSLKLSCAASGFTFS DYMAWVRQAPTKGLEWVASISNDGISTYY RDSVKGRFTISREKAKSSLYLQMDSLRSED TATYYCTTWNWEFGFFDYWGQGVMTVSA
89	VL 48D3		DIVLTQSPALAVSLGQRATISCRASQSVTI SRYNRMHWYQQRPGQPKLLIYRSSYLASG IPARFSGSGSGTDFTLTIIYPVQADDIATYY CQQNRESPTWTFGGGTKLELNR

Para el estudio de eficacia *in vivo* en un modelo de asma murino, se compraron los animales (ratones hembra Balb/c) en Taconic, se mantuvieron en el Centro de bioinvestigación de Abbott, y se utilizaron a las 8-12 semanas de edad. Todos los protocolos fueron aprobados por IACUC. Los ratones se sensibilizaron a OVA (Sigma, la endotoxina se removió de la ovalbumina usando DetoxiGel (Pierce) de acuerdo con el protocolo del fabricante y el material final contenía menos de 0.1 EU/mg de proteína) en los días 0 y 7 con una inyección intraperitoneal de 8 ug de OVA en 2 mg de alum (Pierce). En los días 14 y 16, los animales recibieron un desafío intranasal de 0.3 mg de OVA en 50 ml de PBS estéril. Se administraron los anticuerpos 51D9 y 48D3 (purificados a partir del sobrenadante de los clones de hibridoma 51D9 y 48D3 de acuerdo con procedimientos estándar, que contenían menos de 0.1 EU/mg de proteína y eran negativos para patógenos de roedores mediante evaluación por PCR) en el día 13 como una sola inyección intraperitoneal en PBS estéril. Se administró dexametasona (Sigma) oralmente una vez al día en los días 13-17 en una dosis de 3 mg/kg. Todos los puntos finales se analizaron en el día 17, 24 hr después del segundo desafío con OVA. Se evaluó la hiperreactividad de las vías aéreas (AHR) usando pletismografía de sangre completa. Brevemente, se indujo un plano quirúrgico de anestesia con una inyección intraperitoneal de quetamina y xilazina. Se insertó una cánula traqueal de manera quirúrgica entre el tercer y el cuarto anillo de la tráquea. Se evitó la respiración espontánea mediante inyección intravenosa en la yugular de bromuro de pancuronio y los animales se ubicaron en un pletismógrafo de sangre completa (Buxco) y se ventilaron mecánicamente con 0.2 ml de aire ambiental a 150 respiraciones por minuto con un ventilador de volumen controlado (Harvard

Apparatus). Se midió la presión en el pulmón y el flujo dentro del pletismógrafo usando transductores y se calculó la resistencia pulmonar como presión/flujo usando un software Biosystem Xa. Se midieron la resistencia de línea base así como la resistencia tras el desafío con metacolina (3, 10, & 30 mg/ml) que fue administrada con un nebulizador ultrasónico en línea. Al completar la evaluación de la función pulmonar, se lavaron los pulmones 4 veces con 0.5 ml de PBS estéril. Se analizó el contenido de TARC, AMCasa e infiltrado celular en el fluido de lavado. Se recolectó el suero para la cuantificación de los niveles de anticuerpo al final del estudio.

Se determinaron los niveles de TARC Murina mediante ELISA (R&D) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se determinó la actividad AMCasa en el fluido de lavado broncoalveolar (BAL) (dilución 1 a 10 con BSA 0.01%, citrato de sodio 30 mM, fosfato de sodio 60 mM pH 5.2 en presencia de 4-metilumbeliferil β -D-N,N'-diacetilquitobiosida 80 uM. Las reacciones se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y se detuvieron mediante la adición de 100 uL de glicina 1 M /NaOH pH 10.6. Se determinó la formación de producto mediante emisión de fluorescencia a 460 nm usando excitación a 385 nm en un fluorómetro Fluoroskan Ascent. Para evaluar hiperplasia de células calciformes, se inflaron los pulmones con formalina neutra amortiguada 10% a una altura de 22 cm durante 15 minutos para lograr un área consistente de superficie celular. Las secciones se sumergieron en parafina, se seccionaron y se tiñeron con ácido peryódico de Schiff (PAS, por sus siglas en inglés). Se cuantificó el área de las células positivas a PAS a lo largo del bronquio principal del pulmón izquierdo usando el Software ImagePro Plus. Se determinaron los niveles de Muc5ac mediante ELISA. Se recubrió una caja de 96 pozos con fluido BAL, se secó toda la noche y posteriormente se adicionó anticuerpo biotinilado anti-Muc5ac y se detectó con estreptavidina conjugada a HRP, seguida del rompimiento del sustrato colorimétrico TMB.

Se evaluó la contribución relativa de IL-13R α 1 y α 2 en la patogénesis del asma en un modelo estándar de asma en ratón inducida por ovalbumina. Se evaluaron los anticuerpos que bloqueaban la unión de IL-13 a los receptores α 1 y α 2 (51D9, 54D1, y 3H7 con potencias de 340, 24, y 2430 pM respectivamente) así como un anticuerpo que bloqueaba la unión de IL-13 a solo el receptor α 1 (48D3, potencia de 50 pM) tratando animales con los anticuerpos un día antes de los desafíos locales con ovalbumina y se presentan los resultados en la Tabla 23. El desafío con OVA indujo incrementos en la resistencia pulmonar tras el desafío con

metacolina, hipersecreción de moco como se midió mediante niveles incrementados de Muc5ac en el fluido BAL así como tinción positiva de PAS incrementada de las células epiteliales mediante evaluación histológica, infiltración del pulmón con eosinófilos & células T, y producción de las proteínas relacionadas con el asma AMCasa y TARC.

Los anticuerpos que bloquearon la unión de IL-13 a IL-13 R α 1 y α 2 demostraron todos eficacia y la potencia *in vivo* de los reactivos se desplazó de acuerdo con su potencia *in vitro* medida. Se evaluó 51D9 a dosis de 100, 300, y 1000 μ g/ratón. El tratamiento con OVA causó un incremento en la resistencia de las vías aéreas tras el desafío con 30mg/ml de metacolina a 6.2 cm H₂O /ml/sec en comparación con 3.6 cm H₂O /ml/sec en animales no asmáticos. El tratamiento de los ratones con 51D9 previno completamente el incremento en la resistencia pulmonar con valores comparables a aquellos observados en animales control no asmáticos de 4.1, 4.0, y 3.5 cm H₂O/ml/sec para dosis de 100, 300, y 1000 μ g respectivamente (n=8-10/grupo; p < .05). La cantidad de inhibición observada con 51D9 era comparable a aquella alcanzada con tratamiento con esteroides (3.3 cm H₂O /ml/sec). El tratamiento con 51D9 también inhibió de manera dependiente de la dosis la hipersecreción de moco de 404 unidades de Muc5ac hasta 55 U en animales tratados con 1000 μ g de 51D9. También se observó la inhibición de la hipersecreción de moco mediante la evaluación histológica de células epiteliales reactivas a PAS. El porcentaje de área de las células positivas disminuyó de 1.0% a 0.6 % y 0.5 % con 300 y 1000 μ g de dosis de anticuerpo 51D9 respectivamente lo que representa una disminución del 47-65% (n=8, p < .01). El tratamiento con 51D9 también inhibió TARC y AMCasa. El desafío con OVA indujo 61 pg/ml de TARC que se redujo a 7.8 pg/ml con tratamiento con 1000 μ g de 51D9 (n=10, p < .05). El desafío con OVA indujo 96 unidades arbitrarias de actividad AMCasa que se redujo de manera dependiente de la dosis con 51D9 a 52, 45 y 21 U con 100, 300 y 1000 μ g de anticuerpo respectivamente (n=9-10, p < .01). 54D1, que tiene una potencia *in vitro* 10 veces más grande (24 pM) demostró la inhibición de AHR a la dosis de 30 μ g con reducción de la resistencia de las vías aéreas de 6.58 cm H₂O /ml/sec a 4.4 cm H₂O/ml/sec y se observó una inhibición máxima con el tratamiento con 300 μ g de anticuerpo para reducir la resistencia de las vías aéreas a un valor de 3.65 cm H₂O/ml/sec. Se observó una potencia similar en la inhibición de moco, AMCasa y producción de TARC. Un tercer anticuerpo 3H7, que tiene una potencia de 2.5 nM, demostró la inhibición de AHR, moco, y niveles de AMCasa pero solo a una dosis de 1000 μ g de tratamiento con anticuerpo lo

que es consistente con un desplazamiento de 10 veces en la potencia descrita en los bioensayos *in vitro*.

Se evaluó la eficacia de los anticuerpos que bloquean la unión de IL-13 a solo IL-13R α 1 con el anticuerpo 48D3. Los animales se trataron con 30, 100, 300, y 1000 μ g/ratón. El desafío con OVA indujo un incremento en la resistencia de las vías aéreas a 5.69 cm H2O/ml/seg en comparación con 4.1 cm H2O/ml/seg en animales no asmáticos tratados con PBS. El tratamiento con 30 μ g de 48D3 no tuvo efecto en la resistencia pulmonar inducida por OVA mientras que el tratamiento con 100, 300 y 1000 ug de 48D3 inhibió los cambios en la resistencia pulmonar inducidos por OVA hasta un máximo de 4.4 cm H₂O /ml/seg o hasta ~80% de los niveles de control de OVA (n=10, p <.05). En contraste a los efectos observados con 51D9, 48D3 no inhibió la hipersecreción de moco inducida por OVA según se midió mediante ELISA Muc5ac o células epiteliales reactivas a PAS. Se observó una reducción leve pero estadísticamente significativa en el moco (30%) con el tratamiento con 48D3 en una dosis de 30 μ g, mientras que todas las otras dosis eran equivalentes a animales desafiados con OVA. La cuantificación histológica de la tinción positiva con PAS demostró 0.6% en animales desafiados con OVA vs 0.8 % en animales desafiados con OVA y tratados con 1000 ug de 48D3. En estos estudios, el 48D3 inhibió la expresión de AMCasa inducida por OVA de 196 U detectada en animales tratados con OVA a 63, 90, 87, y 96 U para dosis de 30, 100, 300 y 1000 ug respectivamente. El análisis de los niveles de anticuerpo indicó que niveles comparables de 48D3 y 51D9 eran detectables en suero y fluido BAL de los ratones tratados con anticuerpo. A pesar de la potencia 7 veces mayor del anticuerpo 48D3 en comparación con el anticuerpo 51D9, y la exposición equivalente de los dos anticuerpos, el anticuerpo 48D3 no fue capaz de inhibir la AHR o AMCasa en la misma magnitud que el anticuerpo que bloqueó la unión de IL-13 a IL-13R α 1 y α 2 y no fue capaz de atenuar la producción de moco. Estos datos juntos sugerían que IL-13R α 2 juega un papel central en la mediación de la hipersecreción de moco inducida por OVA y que IL-13R α 2 contribuye en la regulación del fenotipo asmático *in vivo*.

Tabla 23: Eficacia de anticuerpos anti-IL-13 de ratón en un modelo murino de asma inducida por ovalbumina.

Anticuerpo	Dosis	AHR	Moco	AMCasa	TARC
------------	-------	-----	------	--------	------

166

		Resistencia (SEM)	% de inhibición	Unidades Muc5ac (SEM)	% de inhibición	Unidades arbitrarias (SEM)	% de inhibición	pg/ml (SEM)	% de inhibición
54D1	0	6.585 (.89)	-0-	573 (96.2)	-0-	112.1 (19.3)	-0-	141 (43.2)	-0-
	30	4.486 (0.3)*	34	203 (22)*	65	30.8 (4.8)*	72.5	38.3 (10.6)*	63
	100	4.2 (0.32)*	37	153 (44)*	74	14.4(2.7)*	87.3	23.8 (7.3)	83
	300	3.65 (0.22)*	45	77.3 (6.9)*	87	11.0 (1.5)*	90.2	17.2 (4.5)*	88
	1000	3.58 (0.34)*	46	79 (8.5)*	87	10.4 (1.2)	90.1	20 (12.3)*	86
51D9	0	6.24 (1.4)	-0-	409.2 (36.4)	-0-	97.6 (11)	-0-	61.8 (12.1)	-0-
	100	4.13 (0.91)*	33.8	188.8 (24.8)*	54	52.9 (10.9)*	46	25.2 (12.8)	60
	300	4.06 (0.32)*	34.8	180.8 (32.4)*	56	45.8 (13.7)*	53	23.1 (12.9)	62
	1000	3.57 (0.78)*	43	55,1 (23.4)*	87	21.2 (7.8)*	79	7.8 (4.2)*	87
3H7	0	7.9 (1.2)	-0-	965 (59.9)	-0-	129.7 (17.2)	-0-	173.9 (32.0)	-0-
	1000	6.02 (0.31)*	24	587 (48.4)***	40	78.18 (12.3)*	40	77.3 (18.5)*	56
48D3	0	5.69 (0.42)	-0-	666.7 (74.7)	-0-	196.6 (35.5)	-0-	NT	
	30	5.288 (0.43)	8.1	445.4 (33.8)	34	63.1 (18.2)*	68	NT	
	100	4.5 (0.42)*	19.5	567.5 (62.6)	15	90.4 (15.4)*	54	NT	
	300	5.25 (0.42)	14.1	606.3 (71.2)	9	87.4 (19.6)*	55	NT	
	1000	4.4 (0.33)*	20.7	534.9 (31)	20	96.5 (10.4)*	51	NT	

* denota $p < 05$, ANOVA

167

REIVINDICACIONES

Reivindicamos:

1. Una proteína de unión que comprende un dominio de unión a antígeno, siendo dicha proteína de unión capaz de unirse a IL- 13, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de:

CDR-H1. X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 (ID de SEC No: 64), en donde;

X_1 es T, D, G, o S;

X_2 es S;

X_3 es D;

X_4 es M, S, Y, L, o H;

X_5 es G, W, Y, A, S, o N;

X_6 es V, I, o M; y

X_7 es D, H, S, Y, N, o G;

15 CDR- H2. X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} - X_{16} - X_{17}

(ID de SEC No: 65), en donde;

X_1 es M, E, H, R, S, G, o L;

X_2 es I o no está presente;

X_3 es H, Y, A, D, S, o W;

X_4 es P, S, W, o G;

X_5 es S, G, E, o D;

X_6 es D, G, S, E, o N;

X_7 es S, Y o G;

X_8 es E, N, Y, V, o R;

X₉ es T, I, o K;

X₁₀ es R, Y, I, D, o A;

X₁₁ es L, Y, D, o F;

X₁₂ es N, P, S, o D;

5 X₁₃ es Q, E, D, P, o S;

X₁₄ es K, M, S, T, A, o V;

X₁₅ es F, L, V, o M;

X₁₆ es K, R, o Q; y

X₁₇ es D, G, o S;

10 CDR-H3. X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄ (ID de SEC No: 66),
en donde;

X₁ es W, T, G, Y, D, o I;

X₂ es R, A, S, G, o V;

X₃ es T, F, Y, o S;

15 X₄ es S, T, o Y;

X₅ es Y, F, o G;

X₆ es F, o Y;

X₇ es S, Y, I, o F;

X₈ es D, L, Y, o P;

20 X₉ es Y;

X₁₀ es G;

X₁₁ es Y, A, P, o E;

X₁₂ es F, M, S, L, o I;

X_{13} es D, V, N, o K; y

X_{14} es Y, o F;

CDR-L1. X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} - X_{16} - X_{17}

(ID de SEC No: 67), en donde;

5 X_1 es K, o R;

X_2 es S, o A;

X_3 es S o T;

X_4 es Q, K, o I;

X_5 es N, S, T, G, o E;

10 X_6 es L, T, o S;

X_7 es L, Q, o V;

X_8 es Y, N, H, D, o T;

X_9 es S, I, o T;

X_{10} es S, D, N, H, o Y;

15 X_{11} es N, o G;

X_{12} es Q;

X_{13} es K, F, N, E, o S;

X_{14} es N, T, o S;

X_{15} es Y, o F;

20 X_{16} es L, A, o M; y

X_{17} es A, D, E, H, o N

CDR-L2. X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 (ID de SEC No: 68), en donde;

X_1 es L, S, K, T, W, o Y;

X_2 es V, T, o A;

X_3 es S, o N;

X_4 es N, K, T, M, o R;

X_5 es R, K, o L;

5 X_6 es F, D, E, H, P, o A; y

X_7 es S, R, o P;

y

CDR-L3. X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 (ID de SEC No: 69), en donde;

X_1 es F, W, Q o A;

10 X_2 es Q o L;

X_3 es H, G, Y, W, o N;

X_4 es N, S, T, L, o Y;

X_5 es Y, T, S, E, o H;

X_6 es L, V, F, Y, N, G, P, o D;

15 X_7 es P, o, H;

X_8 es L, F, Y, W, o R; y

X_9 es T, o V.

2. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha al menos una CDR comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de:

20

residuos 31-35 de ID de SEC No.: 32;	residuos 24-34 de ID de SEC No.:47;
residuos 50-66 de ID de SEC No.: 32;	residuos 50-56 de ID de SEC No.:47;
residuos 99-105 de ID de SEC No.:32;	residuos 89-97 de ID de SEC No.:47;
residuos 24-39 de ID de SEC No.: 33;	residuos 31-37 de ID de SEC No.:48;
25 residuos 55-61 de ID de SEC No.: 33;	residuos 52-67 de ID de SEC No.:48;

	residuos 94-102 de ID de SEC No.:33;	residuos 100-112 de ID de SEC No.:48;
	residuos 31-35 de ID de SEC No.: 34;	residuos 24-34 de ID de SEC No.:49;
	residuos 50-66 de ID de SEC No.:34;	residuos 50-56 de ID de SEC No.:49;
	residuos 99-105 de ID de SEC No.:34;	residuos 89-97 de ID de SEC No.:49;
5	residuos 24-39 de ID de SEC No.:35;	residuos 31-37 de ID de SEC No.:50;
	residuos 55-61 de ID de SEC No.:35;	residuos 52-67 de ID de SEC No.:50;
	residuos 94-102 de ID de SEC No.:35;	residuos 100-112 de ID de SEC No.:50;
	residuos 31-35 de ID de SEC No.:36;	residuos 24-34 de ID de SEC No.:51;
	residuos 50-66 de ID de SEC No.: 36;	residuos 60-66 de ID de SEC No.:51;
10	residuos 99-109 de ID de SEC No.:36;	residuos 89-97 de ID de SEC No.:51;
	residuos 24-39 de ID de SEC No.: 37;	residuos 31-35 de ID de SEC No.:52;
	residuos 55-61 de ID de SEC No.:37;	residuos 50-66 de ID de SEC No.:52;
	residuos 94-102 de ID de SEC No.:37;	residuos 99-107 de ID de SEC No.:52;
	residuos 31-35 de ID de SEC No.:38;	residuos 23-36 de ID de SEC No.:53;
15	residuos 50-66 de ID de SEC No.:38;	residuos 52-58 de ID de SEC No.:53;
	residuos 99-109 de ID de SEC No.:38;	residuos 91-99 de ID de SEC No.:53;
	residuos 31-35 de ID de SEC No.:39;	residuos 31-35 de ID de SEC No.:54;
	residuos 50-66 de ID de SEC No.:39;	residuos 50-65 de ID de SEC No.:54;
	residuos 99-112 de ID de SEC No.:39;	residuos 98-107 de ID de SEC No.:54;
20	residuos 24-39 de ID de SEC No.:40;	residuos 24-38 de ID de SEC No.:55;
	residuos 55-61 de ID de SEC No.:40;	residuos 54-60 de ID de SEC No.:55;
	residuos 94-102 de ID de SEC No.:40;	residuos 93-101 de ID de SEC No.:55;
	residuos 31-35 de ID de SEC No.:41;	residuos 31-35 de ID de SEC No.:56;
	residuos 50-66 de ID de SEC No.:41;	residuos 50-65 de ID de SEC No.:56;
25	residuos 99-112 de ID de SEC No.:41;	residuos 98-107 de ID de SEC No.:56;
	residuos 31-35 de ID de SEC No.:42;	residuos 24- 38 de ID de SEC No.:57;
	residuos 50-66 de ID de SEC No.:42;	residuos 54- 60 de ID de SEC No.: 57;
	residuos 99-100 de ID de SEC No.:42;	residuos 93- 101 de ID de SEC No.:57;
	residuos 24-39 de ID de SEC No.:43;	residuos 31- 35 de ID de SEC No.:58;
30	residuos 55-61 de ID de SEC No.:43;	residuos 50- 65 de ID de SEC No.:58;
	residuos 94-102 de ID de SEC No.:43;	residuos 98- 107 de ID de SEC No.:58;
	residuos 31-35 de ID de SEC No.:44;	residuos 24- 38 de ID de SEC No.:59;
	residuos 50-65 de ID de SEC No.:44;	residuos 54- 60 de ID de SEC No.:59;
	residuos 98-106 de ID de SEC No.:44;	residuos 93- 101 de ID de SEC No.:59;
35	residuos 24-40 de ID de SEC No.:45;	residuos 31- 35 de ID de SEC No.:60;
	residuos 56-62 de ID de SEC No.:45;	residuos 50- 65 de ID de SEC No.:60;
	residuos 95-103 de ID de SEC No.:45;	residuos 98- 107 de ID de SEC No.:60;

- residuos 32-38 de ID de SEC No.:46; residuos 24- 38 de ID de SEC No.:61;
 residuos 52-67 de ID de SEC No.:46; residuos 54- 60 de ID de SEC No.:61;
 residuos 100-112 de ID de SEC No.:46; residuos 93- 101 de ID de SEC No.:61;
 residuos 31-35 de ID de SEC No.:62;
- 5 residuos 50-65 de ID de SEC No.:62;
- residuos 98-107 de ID de SEC No.:62;
 residuos 24-38 de ID de SEC No.:63;
- residuos 54-60 de ID de SEC No.:63;
 y
- 10 residuos 93-101 de ID de SEC No.:63.
3. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha proteína de unión comprende al menos 3 CDRs.
4. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dichas al menos 3 CDRs se seleccionan de un conjunto de CDR de dominio variable que
- 15 consiste de:

Conjunto de CDR VH 25C8	
VH 25C8 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.:32
VH 25C8 CDR-H2	Residuos 50-66 de ID de SEC No.:32
VH 25C8 CDR-H3	Residuos 99-105 de ID de SEC No.:32
Conjunto de CDR VL 25C8	
VL 25C8 CDR-L1	Residuos 24-39 de ID de SEC No.:33
VL 25C8 CDR-L2	Residuos 55-61 de ID de SEC No.:33
VL 25C8 CDR-L3	Residuos 94-102 de ID de SEC No.:33
Conjunto de CDR VH 9C11	
VH 9C11 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.:34
VH 9C11 CDR-H2	Residuos 50-66 de ID de SEC No.:34
VH 9C11 CDR-H3	Residuos 99-105 de ID de SEC No.:34
Conjunto de CDR VL 9C11	
VL 9C11 CDR-L1	Residuos 24-39 de ID de SEC No.:35
VL 9C11 CDR-L2	Residuos 55-61 de ID de SEC No.:35
VL 9C11 CDR-L3	Residuos 94-102 de ID de SEC No.:35
Conjunto de CDR VH 21D9	
VH 21D9 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.:36

VH 21D9 CDR-H2	Residuos 50-66 de ID de SEC No.:36
VH 21D9 CDR-H3	Residuos 99-109 de ID de SEC No.:36
Conjunto de CDR VL 21D9	
VL 21D9 CDR-L1	Residuos 24-39 de ID de SEC No.:37
VL 21D9 CDR-L2	Residuos 55-61 de ID de SEC No.:37
VL 21D9 CDR-L3	Residuos 94-102 de ID de SEC No.:37
Conjunto de CDR VH 22D10	
VH 22D10 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.:38
VH 22D10 CDR-H2	Residuos 50-66 de ID de SEC No.:38
VH 22D10 CDR-H3	Residuos 99-109 de ID de SEC No.:38
Conjunto de CDR VL 22D10	
VL 22D10 CDR-L1	Residuos 24-39 de ID de SEC No.:37
VL 22D10 CDR-L2	Residuos 55-61 de ID de SEC No.:37
VL 22D10 CDR-L3	Residuos 94-102 de ID de SEC No.:37
Conjunto de CDR VH 5F1	
VH 5F1 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.:39
VH 5F1 CDR-H2	Residuos 50-66 de ID de SEC No.:39
VH 5F1 CDR-H3	Residuos 99-112 de ID de SEC No.:39
Conjunto de CDR VL 5F1	
VL 5F1 CDR-L1	Residuos 24-39 de ID de SEC No.:40
VL 5F1 CDR-L2	Residuos 55-61 de ID de SEC No.:40
VL 5F1 CDR-L3	Residuos 94-102 de ID de SEC No.:40
Conjunto de CDR VH 5G1	
VH 5G1 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.:41
VH 5G1 CDR-H2	Residuos 50-66 de ID de SEC No.:41
VH 5G1 CDR-H3	Residuos 99-112 de ID de SEC No.:41
Conjunto de CDR VL 5G1	
VL 5G1 CDR-L1	Residuos 24-39 de ID de SEC No.:40
VL 5G1 CDR-L2	Residuos 55-61 de ID de SEC No.:40
VL 5G1 CDR-L3	Residuos 94-102 de ID de SEC No.:40
Conjunto de CDR VH 3H7	
VH 3H7 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.:42
VH 3H7 CDR-H2	Residuos 50-66 de ID de SEC No.:42
VH 3H7 CDR-H3	Residuos 99-100 de ID de SEC No.:42
Conjunto de CDR VL 3H7	
VL 3H7 CDR-L1	Residuos 24-39 de ID de SEC No.:43

VL 3H7 CDR-L2	Residuos 55-61 de ID de SEC No.:43
VL 3H7 CDR-L3	Residuos 94-102 de ID de SEC No.:43
Conjunto de CDR VH 14B2	
VH 14B2 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.:44
VH 14B2 CDR-H2	Residuos 50-65 de ID de SEC No.:44
VH 14B2 CDR-H3	Residuos 98-106 de ID de SEC No.:44
Conjunto de CDR VL 14B2	
VL 14B2 CDR-L1	Residuos 24-40 de ID de SEC No.:45
VL 14B2 CDR-L2	Residuos 56-62 de ID de SEC No.:45
VL 14B2 CDR-L3	Residuos 95-103 de ID de SEC No.:45
Conjunto de CDR VH 13C5	
VH 13C5 CDR-H1	Residuos 32-38 de ID de SEC No.:46
VH 13C5 CDR-H2	Residuos 52-67 de ID de SEC No.:46
VH 13C5 CDR-H3	Residuos 100-112 de ID de SEC No.:46
Conjunto de CDR VL 13C5	
VL 13C5 CDR-L1	Residuos 24-34 de ID de SEC No.:47
VL 13C5 CDR-L2	Residuos 50-56 de ID de SEC No.:47
VL 13C5 CDR-L3	Residuos 89-97 de ID de SEC No.:47
Conjunto de CDR VH 29G5	
VH 29G5 CDR-H1	Residuos 31-37 de ID de SEC No.:48
VH 29G5 CDR-H2	Residuos 52-67 de ID de SEC No.:48
VH 29G5 CDR-H3	Residuos 100-112 de ID de SEC No.:48
Conjunto de CDR VL 29G5	
VL 29G5 CDR-L1	Residuos 24-34 de ID de SEC No.:49
VL 29G5 CDR-L2	Residuos 50-56 de ID de SEC No.:49
VL 29G5 CDR-L3	Residuos 89-97 de ID de SEC No.:49
Conjunto de CDR VH 33C3	
VH 33C3 CDR-H1	Residuos 31-37 de ID de SEC No.:50
VH 33C3 CDR-H2	Residuos 52-67 de ID de SEC No.:50
VH 33C3 CDR-H3	Residuos 100-112 de ID de SEC No.:50
Conjunto de CDR VL 33C3	
VL 33C3 CDR-L1	Residuos 24-34 de ID de SEC No.:51
VL 33C3 CDR-L2	Residuos 60-66 de ID de SEC No.:51
VL 33C3 CDR-L3	Residuos 89-97 de ID de SEC No.:51
Conjunto de CDR VH 4A8	
VH 4A8 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.:52

VH 4A8 CDR-H2	Residuos 50-66 de ID de SEC No.:52
VH 4A8 CDR-H3	Residuos 99-107 de ID de SEC No.:52
Conjunto de CDR VL 4A8	
VL 4A8 CDR-L1	Residuos 23-36 de ID de SEC No.:53
VL 4A8 CDR-L2	Residuos 52-58 de ID de SEC No.:53
VL 4A8 CDR-L3	Residuos 91-99 de ID de SEC No.:53
Conjunto de CDR VH 1B6	
VH 1B6 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.:54
VH 1B6 CDR-H2	Residuos 50-65 de ID de SEC No.:54
VH 1B6 CDR-H3	Residuos 98-107 de ID de SEC No.:54
Conjunto de CDR VL 1B6	
VL 1B6 CDR-L1	Residuos 24-38 de ID de SEC No.:55
VL 1B6 CDR-L2	Residuos 54-60 de ID de SEC No.:55
VL 1B6 CDR-L3	Residuos 93-101 de ID de SEC No.:55
Conjunto de CDR VH 3E5	
VH 3E5 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.:56
VH 3E5 CDR-H2	Residuos 50-65 de ID de SEC No.:56
VH 3E5 CDR-H3	Residuos 98-107 de ID de SEC No.:56
Conjunto de CDR VL 3E5	
VL 3E5 CDR-L1	Residuos 24-38 de ID de SEC No.:57
VL 3E5 CDR-L2	Residuos 54-60 de ID de SEC No.:57
VL 3E5 CDR-L3	Residuos 93-101 de ID de SEC No.:57
Conjunto de CDR VH 6C8	
VH 6C8 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.:58
VH 6C8 CDR-H2	Residuos 50-65 de ID de SEC No.:58
VH 6C8 CDR-H3	Residuos 98-107 de ID de SEC No.:58
Conjunto de CDR VL 6C8	
VL 6C8 CDR-L1	Residuos 24-38 de ID de SEC No.:59
VL 6C8 CDR-L2	Residuos 54-60 de ID de SEC No.:59
VL 6C8 CDR-L3	Residuos 93-101 de ID de SEC No.:59
Conjunto de CDR VH 5D3	
VH 5D3 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.:60
VH 5D3 CDR-H2	Residuos 50-65 de ID de SEC No.:60
VH 5D3 CDR-H3	Residuos 98-107 de ID de SEC No.:60
Conjunto de CDR VL 5D3	
VL 5D3 CDR-L1	Residuos 24-38 de ID de SEC No.:61

176

VL 5D3 CDR-L2	Residuos 54-60 de ID de SEC No.:61
VL 5D3 CDR-L3	Residuos 93-101 de ID de SEC No.:61
Conjunto de CDR VH 8B6	
VH 8B6 CDR-H1	Residuos 31-35 de ID de SEC No.:62
VH 8B6 CDR-H2	Residuos 50-65 de ID de SEC No.:62
VH 8B6 CDR-H3	Residuos 98-107 de ID de SEC No.:62
Conjunto de CDR VL 8B6	
VL 8B6 CDR-L1	Residuos 24-38 de ID de SEC No.:63
VL 8B6 CDR-L2	Residuos 54-60 de ID de SEC No.:63
VL 8B6 CDR-L3	Residuos 93-101 de ID de SEC No.:63

5. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende al menos dos conjuntos de CDR de dominio variable.
6. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dichos al menos dos conjuntos de CDR de dominio variable se seleccionan de un grupo que consiste de:

	Conjunto de CDR VH 25C8	&	Conjunto de CDR VL 25C8;
	Conjunto de CDR VH 9C11	&	Conjunto de CDR VL 9C11;
	Conjunto de CDR VH 21D9	&	Conjunto de CDR VL 21D9;
	Conjunto de CDR VH 22D10	&	Conjunto de CDR VL 22D10;
10	Conjunto de CDR VH 5F1	&	Conjunto de CDR VL 5F1;
	Conjunto de CDR VH 5G1	&	Conjunto de CDR VL 5G1;
	Conjunto de CDR VH 3H7	&	Conjunto de CDR VL 3H7;
	Conjunto de CDR VH 14B2	&	Conjunto de CDR VL 14B2;
	Conjunto de CDR VH 13C5	&	Conjunto de CDR VL 13C5;
15	Conjunto de CDR VH 29G5	&	Conjunto de CDR VL 29G5;
	Conjunto de CDR VH 33C3	&	Conjunto de CDR VL 33C3;
	Conjunto de CDR VH 4A8	&	Conjunto de CDR VL 4A8;
	Conjunto de CDR VH 1B6	&	Conjunto de CDR VL 1B6;
	Conjunto de CDR VH 3E5	&	Conjunto de CDR VL 3E5;
20	Conjunto de CDR VH 6C8	&	Conjunto de CDR VL 6C8;
	Conjunto de CDR VH 5D3	&	Conjunto de CDR VL 5D3; y
	Conjunto de CDR VH 8B6	&	Conjunto de CDR VL 8B6.

7. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende además un marco aceptor humano.

8. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicho marco aceptor humano comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de:

	ID de SEC No.:6	ID de SEC No.:16	ID de SEC No.:26
5	ID de SEC No.: 7	ID de SEC No.: 17	ID de SEC No.: 27
	ID de SEC No.:8	ID de SEC No.:18	ID de SEC No.:28
	ID de SEC No.:9	ID de SEC No.: 19	ID de SEC No.:29
	ID de SEC No.:10	ID de SEC No.:20	ID de SEC No.:30
	ID de SEC No.:11	ID de SEC No.:21	y
10	ID de SEC No.:12	ID de SEC No.:22	ID de SEC No.:31.
	ID de SEC No.:13	ID de SEC No.:23	
	ID de SEC No.: 14	ID de SEC No.: 24	
	ID de SEC No.: 15	ID de SEC No.:25.	

9. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 7 (o 9), en donde dicho marco aceptor humano comprende al menos una sustitución de aminoácido en la región marco, en donde la secuencia de aminoácidos del marco es idéntica en al menos un 65% a la secuencia de dicho marco aceptor humano y comprende al menos 70 residuos de aminoácidos idénticos a dicho marco aceptor humano.

10. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho marco aceptor humano comprende al menos una sustitución de aminoácido en la región marco en un residuo clave, siendo dicho residuo clave seleccionado del grupo que consiste de:

- un residuo adyacente a una CDR;
- un residuo en el sitio de glicosilación;
- 25 un residuo raro;
- un residuo capaz de interactuar con IL-13 humana;
- un residuo capaz de interactuar con una CDR;
- un residuo canónico;

17B

un residuo de contacto entre la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena liviana;

un residuo en una zona de Vernier; y

un residuo en una región que se solapa entre una CDR1 variable de cadena pesada definida por Chothia

5 y un primer marco de cadena pesada definido por Kabat.

11. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el residuo clave se selecciona del grupo que consiste de 2L, 15L, 22L, 41L, 42L, 44L, 49L, 50L, 51L, 62L, 71L, 73L, 10H, 44H, 46H, 48H, 67H, 68H, 70H, 72H, 74H, 76H, 83H, 84H, 86H, 87H, y 97H.

10

12. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la proteína de unión es un dominio variable humano de consenso.

13. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha proteína de unión comprende al menos un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de;

15

- | | |
|---------------------|-------------------|
| ID de SEC No.:70 | ID de SEC No.:81 |
| ID de SEC No.:71 | ID de SEC No.:82 |
| ID de SEC No.:72 | ID de SEC No.:83 |
| ID de SEC No.:73 | ID de SEC No.:84 |
| 20 ID de SEC No.:74 | ID de SEC No.:85 |
| ID de SEC No.:75 | ID de SEC No.:92 |
| ID de SEC No.:76 | ID de SEC No.:93 |
| ID de SEC No.:77 | y |
| ID de SEC No.:78 | ID de SEC No.:94. |
| 25 ID de SEC No.:79 | |
| ID de SEC No.:80. | |

14. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 13 en donde dicha proteína de unión comprende dos dominios variables, en donde dichos dos dominios variables tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste de;

30

	ID de SEC No.:70	&	ID de SEC No.:71,
	ID de SEC No.:72	&	ID de SEC No.:73,
	ID de SEC No.:74	&	ID de SEC No.:75,
	ID de SEC No.:76	&	ID de SEC No.:77,
5	ID de SEC No.:78	&	ID de SEC No.:79,
	ID de SEC No.:80	&	ID de SEC No.:81,
	ID de SEC No.:82	&	ID de SEC No.:83,
	ID de SEC No.: 84	&	ID de SEC No.:85,
	ID de SEC No.:80	&	ID de SEC No.:92,
10	ID de SEC No.:80	&	ID de SEC No. 93, y
	ID de SEC No.:80	&	ID de SEC No. 94.

15. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicha proteína de unión comprende al menos un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de;

15	ID de SEC No.:70	ID de SEC No.:78	ID de SEC No.:92
	ID de SEC No.:71	ID de SEC No.:79	ID de SEC No.:93
	ID de SEC No.:72	ID de SEC No.:80	y
	ID de SEC No.:73	ID de SEC No.:81	ID de SEC No.:94.
	ID de SEC No.:74	ID de SEC No.:82	
20	ID de SEC No.:75	ID de SEC No.:83	
	ID de SEC No.:76	ID de SEC No.:84	
	ID de SEC No.:77	ID de SEC No.:85.	

16. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la proteína de unión se une a IL-13.

25 17. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la proteína de unión se une a IL-13.

18. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la proteína de unión es capaz de modular una función biológica de IL-13.

30 19. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la proteína de unión es capaz de neutralizar la IL-13.

20. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 17, en donde dicha proteína de unión tiene una constante de velocidad de asociación (K_{on}) a dicho objetivo seleccionada del grupo que consiste de: al menos

ABD

aproximadamente $10^2 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; al menos aproximadamente $10^3 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; al menos aproximadamente $10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; al menos aproximadamente $10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; y al menos aproximadamente $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; medida mediante resonancia de plasmón de superficie.

5 21. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 17, en donde dicha proteína de unión tiene una constante de velocidad de disociación (K_{off}) a dicho objetivo seleccionada del grupo que consiste de: como máximo aproximadamente 10^{-3}s^{-1} ; como máximo aproximadamente 10^{-4}s^{-1} ; como máximo aproximadamente 10^{-5}s^{-1} ; y como máximo aproximadamente 10^{-6}s^{-1} , medida mediante resonancia de
10 plasmón de superficie.

22. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 17, en donde dicha proteína de unión tiene una constante de disociación (K_D) a dicho objetivo seleccionada del grupo que consiste de: como máximo aproximadamente 10^{-7}M ; como máximo aproximadamente 10^{-8}M ; como máximo aproximadamente 10^{-9}M ;
15 como máximo aproximadamente 10^{-10}M ; como máximo aproximadamente 10^{-11}M ; como máximo aproximadamente 10^{-12}M ; y como máximo 10^{-13}M .

23. Un constructo de anticuerpo que comprende una proteína de unión descrita en la reivindicación 1, comprendiendo además dicho constructo de anticuerpo un polipéptido enlazante o un dominio constante de inmunoglobulina.

20 24. El constructo de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 23, en donde dicha proteína de unión se selecciona del grupo que consiste de;

una molécula inmunoglobulina,	un Fv unido por disulfuro,
un anticuerpo monoclonal,	un scFv,
un anticuerpo quimérico,	un anticuerpo de dominio sencillo,
25 un anticuerpo con injerto de CDR	un diacuerpo,
un anticuerpo humanizado,	un anticuerpo multiespecífico,
un Fab,	un anticuerpo específico dual, y
un Fab',	un anticuerpo bi-específico.
un F(ab') ₂ ,	
30 un Fv.	

25. El constructo de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 23, en donde dicha proteína de unión comprende un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina seleccionado del grupo que consiste de;

un dominio constante de IgM humana, un dominio constante de IgG4 humana,
un dominio constante de IgG1 humana, un dominio constante de IgE humana,
un dominio constante de IgG2 humana, y
un dominio constante de IgG3 humana, un dominio constante de IgA humana.

- 5 26. El constructo de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 23, que comprende un dominio constante de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de:

ID de SEC No.:2

ID de SEC No.:3

- 10 ID de SEC No.:4

e

ID de SEC No.:5.

- 15 27. Un conjugado de anticuerpo que comprende un constructo de anticuerpo de la reivindicación 24, comprendiendo además dicho conjugado de anticuerpo un agente seleccionado del grupo que consiste de; una molécula de inmuno adhesión, un agente de aplicaciones de imagen, un agente terapéutico, y un agente citotóxico.

- 20 28. El conjugado de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 27, en donde dicho agente es un agente de aplicaciones de imagen seleccionado del grupo que consiste de una radiomarcación, una enzima, una marcación fluorescente, una marcación luminiscente, una marcación bioluminiscente, una marcación magnética, y biotina.

- 25 29. El conjugado de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 27, en donde dicho agente de aplicación de imagen es una radiomarcación seleccionada del grupo que consiste de: ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , y ^{153}Sm .

- 30 30. El conjugado de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 27, en donde dicho agente es un agente terapéutico o citotóxico seleccionado del grupo que consiste de; un anti-metabolito, un agente alquilante, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citoquina, un agente anti-angiogénico, un agente anti-mitótico, una antraciclina, toxina, y un agente apoptótico.

31. El constructo de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 24, en donde dicha proteína de unión posee un patrón de glicosilación humana.
32. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha proteína de unión es una proteína de unión cristalizada.
- 5 33. El constructo de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 23, en donde dicho constructo de anticuerpo es un constructo anticuerpo de cristalizado.
34. El constructo de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 33, en donde dicho constructo de anticuerpo cristalizado es un constructo de anticuerpo farmacéutico cristalizado de liberación controlada libre de portador.
- 10 35. El constructo de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 34, en donde dicho constructo de anticuerpo tiene una vida media *in vivo* mayor que la contraparte soluble de dicho constructo de anticuerpo.
36. El constructo de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 34, en donde dicho constructo de anticuerpo retiene la actividad biológica.
- 15 37. Un ácido nucleico aislado que codifica una secuencia de aminoácidos de proteína de unión de la reivindicación 1.
38. Un ácido nucleico aislado que codifica una secuencia de aminoácidos de de constructo de anticuerpo de la reivindicación 23.
- 20 39. Un vector que comprende un ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 38.
40. El vector de la reivindicación 39 en donde dicho vector se selecciona del grupo que consiste de pcADN, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV, y pBJ.
41. Una célula huésped que comprende un vector de acuerdo con la reivindicación 39.
- 25 42. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 41, en donde dicha célula huésped es una célula procariota.
43. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 42, en donde dicha célula huésped es E.Coli.

44. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 41, en donde dicha célula huésped es una célula eucariota.
45. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 44, en donde dicha célula eucariota se selecciona del grupo que consiste de célula protista, célula animal, célula vegetal y célula fúngica.
46. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 44, en donde dicha célula eucariota es una célula animal seleccionada del grupo que consiste de; una célula de mamífero, una célula de ave y una célula de insecto.
47. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 44, en donde dicha célula huésped es una célula CHO.
48. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 44, en donde dicha célula huésped es COS.
49. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 44, en donde dicha célula huésped es una célula de levadura.
50. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 49, en donde dicha célula de levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.
51. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 44, en donde dicha célula huésped es una célula Sf9 de insecto.
52. Un método para producir una proteína capaz de unirse a IL-13, que comprende cultivar una célula huésped de la reivindicación 41 en medio de cultivo bajo condiciones suficientes para producir una proteína de unión capaz de unirse a IL-13.
53. Una proteína producida de acuerdo con el método de la reivindicación 52.
54. Una composición para la liberación de una proteína de unión, comprendiendo dicha composición:
- (a) una formulación, en donde dicha formulación comprende una proteína de unión cristalizada, de acuerdo con la reivindicación 33, y un ingrediente; y
 - (b) al menos un portador polimérico.

55. La composición de acuerdo con la reivindicación 54, en donde dicho portador polimérico es un polímero seleccionado de uno o más del grupo que consiste de: poli(ácido acrílico), poli(cianoacrilatos), poli(aminoácidos), poli(anhídridos), poli(depsipéptido), poli(ésteres), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-co-glicólico) o PLGA, poli(b-hidroxibutirato), poli(caprolactona), poli(dioxanona); poli(etilenglicol), poli((hidroxipropil)metacrilamida, poli[(organo)fosfaceno], poli(ortoésteres), poli(alcohol vinílico), poli(vinilpirrolidona), copolímeros de anhídrido maléico-alquilvinil éter, polioles plurónicos, albúmina, alginato, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glicaminoglicanos, polisacáridos sulfatados, mezclas y copolímeros de los mismos.

56. La composición de acuerdo con la reivindicación 54, en donde dicho ingrediente se selecciona del grupo que consiste de albúmina, sacarosa, trehalosa, lactitol, gelatina, hidroxipropil- β -ciclodextrina, metoxipolietilenglicol y polietilenglicol.

57. Un método para tratar un mamífero que comprende el paso de administrar al mamífero una cantidad efectiva de la composición de acuerdo con la reivindicación 54.

58. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de unión de la reivindicación 1, y un portador farmacéuticamente aceptable.

59. La composición farmacéutica de la reivindicación 58 en donde dicho portador farmacéuticamente aceptable funciona como adyuvante útil para incrementar la absorción, o dispersión de dicha proteína de unión.

60. La composición farmacéutica de la reivindicación 59 en donde dicho adyuvante es hialuronidasa.

61. La composición farmacéutica de la reivindicación 58 que comprende además al menos un agente terapéutico adicional para tratar un trastorno en el cual la actividad de IL-13 es perjudicial.

62. La composición farmacéutica de la reivindicación 61, en donde dicho agente adicional se selecciona del grupo que consiste de: agente terapéutico, agente de aplicaciones de imagen, agente citotóxico, inhibidores de la angiogénesis; inhibidores de quinasa; bloqueadores de las moléculas de co-estimulación; bloqueadores de las moléculas de adhesión; anticuerpo anti-

citoquina o fragmento funcional del mismo; metotrexato; ciclosporina; rapamicina; FK506; reportero o marcación detectable; un antagonista de TNF; un antirreumático; un relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esteroidal (AINES), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano, un antipsoriático, un corticosteroide, un esteroide anabólico, una eritropoyetina, una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona de crecimiento, un fármaco de reemplazo hormonal, un radiofarmacéutico, un antidepresivo, un antisicótico, un estimulante, una medicación para el asma, un agonista beta, un esteroide inhalado, un esteroide oral, una epinefrina o análogo, una citoquina, y un antagonista de citoquina.

63. Un método para reducir la actividad de IL-13 humana que comprende poner en contacto IL-13 humana con la proteína de unión de la reivindicación 1 de tal manera que se reduzca la actividad de IL-13 humana.

64. Un método para reducir la actividad de IL-13 humana en un sujeto humano que sufre de un trastorno en el que la actividad de IL-13 es perjudicial, que comprende administrar al sujeto humano la proteína de unión de la reivindicación 1 de tal manera que se reduzca la actividad de IL-13 humana en el sujeto humano.

65. Un método para tratar en un sujeto una enfermedad o trastorno en donde la actividad de IL-13 es perjudicial, administrándole al sujeto la proteína de unión de la reivindicación 1 de tal manera que se logre el tratamiento.

66. El método de la reivindicación 65, en donde dicho trastorno se selecciona del grupo que consiste de trastornos respiratorias; asma; asma alérgica y no alérgica; asma debida a infección; asma debida a infección con virus sincitial respiratorio (RSV); enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); otras condiciones que involucran inflamación de las vías aéreas; eosinofilia; fibrosis y producción excesiva de moco; fibrosis quística; fibrosis pulmonar; trastornos atópicos; dermatitis atópica; urticaria; eczema; rinitis alérgica; y enterogastritis alérgica; condiciones inflamatorias y/o autoinmunes de la piel; condiciones inflamatorias y/o autoinmunes de los órganos gastrointestinales; enfermedades inflamatorias del intestino (IBD); colitis ulcerativa; enfermedad de Crohn; condiciones inflamatorias y/o autoinmunes del hígado; cirrosis en el hígado; fibrosis en el hígado; fibrosis en el hígado causada por el virus de la hepatitis B y/o C; escleroderma; tumores o cánceres; carcinoma hepatocelular; glioblastoma;

linfoma; linfoma Hodgkin; infecciones virales; infección con HTLV-1 (e.g., de HTLV-1); supresión de la expresión de respuestas inmunes protectoras tipo 1, y supresión de la expresión de respuestas inmunes protectoras tipo 1 durante la vacunación.

- 5 66. El método de la reivindicación 63, en donde dicho trastorno se selecciona del grupo que consiste de artritis reumatoide, osteoartritis, artritis juvenil crónica, artritis séptica, artritis de Lyme, artritis psoriática, artritis reactiva, espondiloartropatía, lupus sistémico eritematoso, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, enfermedad inflamatoria del intestino, diabetes mellitus
- 10 insulín dependiente, tiroiditis, asma, enfermedades alérgicas, psoriasis, dermatitis escleroderma, enfermedad injerto versus huésped, rechazo de trasplante de órganos, enfermedad inmune aguda o crónica asociada con el trasplante de órganos, sarcoidosis, aterosclerosis, coagulación intravascular diseminada, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Grave, síndrome nefrótico, síndrome de
- 15 fatiga crónica, granulomatosis de Wegener, púrpura de Schoenlein-Henoch, vasculitis microscópica de los riñones, hepatitis activa crónica, uveitis, choque séptico, síndrome de choque tóxico, síndrome séptico, caquexia, enfermedades infecciosas, enfermedades parasitarias, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, mielitis transversa aguda, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson,
- 20 enfermedad de Alzheimer, apoplejía, cirrosis biliar primaria, anemia hemolítica, malignidades, insuficiencia cardíaca, infarto del miocardio, enfermedad de Addison, deficiencia poliglandular tipo I y deficiencia poliglandular tipo II, síndrome de Schmidt, síndrome de dificultad respiratorio del adulto (agudo), alopecia, alopecia areata, artropatía seronegativa, artropatía, enfermedad de Reiter, artropatía
- 25 psoriática, artropatía colítica ulcerativa, sinovitis enteropática, artropatía asociada a clamidia, yersinia y salmonela, espondiloartropatía, enfermedad ateromatosa/arteriosclerosis, alergia atópica, enfermedad vesiculosa autoinmune, penfigo vulgar, penfigo foliáceo, penfigoide, enfermedad de IgA lineal, anemia hemolítica autoinmune, anemia hemolítica Coombs positiva, anemia perniciosa
- 30 adquirida, anemia perniciosa juvenil, encefalitis miálgica/ Enfermedad Libre Real(síndrome de fatiga crónica), candidiasis mucocutánea crónica, arteritis de célula gigante, hepatitis esclerosante primaria, hepatitis autoinmune criptogénica, Síndrome de Enfermedad de Inmunodeficiencia Adquirida, enfermedades Relacionadas con la Inmunodeficiencia Adquirida, Hepatitis B, Hepatitis C,
- 35 inmunodeficiencia variada común (hipogammaglobulinemia variable común), cardiomiopatía dilatada, infertilidad femenina, insuficiencia ovárica, insuficiencia ovárica prematura, enfermedad fibrótica pulmonar, alveolitis fibrosante

criptogénica, enfermedad pulmonar intersticial postinflamatoria, neumonitis
 intersticial, enfermedad pulmonar intersticial asociada a enfermedad del tejido
 conectivo, enfermedad pulmonar asociada a enfermedad de tejido conectivo
 mixto, enfermedad pulmonar intersticial asociada a esclerosis sistémica,
 5 enfermedad pulmonar intersticial asociada a artritis reumatoidea, enfermedad
 pulmonar asociada a lupus eritematoso sistémico, enfermedad pulmonar asociada
 a dermatomiositis/polimiositis, enfermedad pulmonar asociada a enfermedad de
 Sjögren, enfermedad pulmonar asociada a espondilitis anquilosante, enfermedad
 pulmonar vasculítica difusa, enfermedad pulmonar asociada a hemosiderosis,
 10 enfermedad pulmonar intersticial inducida por fármacos, fibrosis, fibrosis por
 radiación, bronquiolitis obliterante, neumonía eosinofílica crónica, enfermedad
 pulmonar infiltrativa linfocitaria, enfermedad pulmonar intersticial postinfecciosa,
 artritis gotosa, hepatitis autoinmune, hepatitis autoinmune de tipo 1 (hepatitis
 lupoide o autoinmune clásica), hepatitis autoinmune de tipo 2 (hepatitis anticuerpo
 15 anti-LKM), hipoglicemia mediada de manera autoinmune, resistencia a la insulina
 tipo B con acantosis nigricans, hipoparatiroidismo, enfermedad inmune aguda
 asociada a trasplante de órganos, enfermedad inmune crónica asociada a
 trasplante de órganos, osteoartritis, colangitis esclerosante primaria, psoriasis de
 tipo 1, psoriasis de tipo 2, leucopenia idiopática, neutropenia autoinmune, NOS de
 20 enfermedad renal, glomerulonefritis, vasculitis microscópica de los riñones,
 enfermedad de Lyme, lupus eritematoso discoide, infertilidad idiopática masculina
 o NOS, autoinmunidad espermática, esclerosis múltiple (todos los subtipos),
 oftalmia simpática, hipertensión pulmonar secundaria a la enfermedad del tejido
 conectivo, síndrome de Goodpasture, manifestación pulmonar de poliarteritis
 25 nodosa, fiebre reumática aguda, espondilitis reumatoide, enfermedad de Still,
 esclerosis sistémica, síndrome de Sjögren, enfermedad/artritis de Takayasu,
 trombocitopenia autoinmune, trombocitopenia idiopática, enfermedad autoinmune
 de la tiroides, hipertiroidismo, hipotiroidismo autoinmune (enfermedad de
 Hashimoto), hipotiroidismo autoinmune atrófico, mixedema primario, uveitis
 30 facogénica, vasculitis primaria, vitiligo enfermedad aguda del hígado,
 enfermedades crónicas del hígado, cirrosis alcohólica, lesión en el hígado
 inducido por alcohol, colestasis, enfermedad del hígado idiosincrática, hepatitis
 inducida por fármacos, esteatohepatitis no alcohólica, alergia y asma, infección
 por estreptococos del grupo B (GBS), trastornos mentales (e.g., depresión y
 35 esquizofrenia), enfermedades mediadas tipo Th1 y tipo Th2, dolor agudo y crónico
 (diferentes formas de dolor), y cánceres tales como cáncer de pulmón, seno,
 estómago, vejiga, colon, páncreas, ovario, próstata y rectal y malignidades

hematopoyéticas (leucemia y linfoma), Abetalipoproteinemia, Acrocianosis, procesos infecciosos o parasitarios agudos y crónicos, leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA), infección bacteriana aguda o crónica, pancreatitis aguda, insuficiencia renal aguda, adenocarcinomas,

5 latidos ectópicos, complejo SIDA demencia, hepatitis inducida por alcohol, conjuntivitis alérgica, dermatitis de contacto alérgica, rinitis alérgica, rechazo de aloinjertos, deficiencia de alfa-1-antitripsina, esclerosis lateral amiotrófica, anemia, angina de pecho, degeneración de horn de célula anterior, terapia anti cd3, síndrome antifosfolípido, reacciones de hipersensibilidad anti-receptor,

10 aneurismas aórticos y periféricos, disección de la aorta, hipertensión arterial, arterioesclerosis, fistula arteriovenosa, ataxia, fibrilación auricular (sostenida o paroxística), aleteo auricular, bloqueo auroiculoventricular, linfoma de célula B, rechazo de injerto óseo, rechazo de trasplante de médula espinal (BMT), bloqueo de rama izquierda, linfoma Burkitt, quemaduras, arritmias cardíacas, síndrome de

15 aturdimiento cardíaco, tumores cardíacos, cardiomiopatía, respuesta de inflamación por bypass cardiopulmonar, rechazo del trasplante de cartílago, degeneraciones corticales cerebelares, trastornos del cerebelo, taquicardia auricular caótica o multifocal, trastornos asociados a quimioterapia, leucemia mielocítica crónica (LMC), alcoholismo crónico, patologías inflamatorias crónicas,

20 leucemia linfocítica crónica (LLC), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), intoxicación crónica por salicilato, carcinoma colorectal, insuficiencia cardíaca congestiva, conjuntivitis, dermatitis por contacto, cor pulmonale, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, sepsis con cultivo negativo, fibrosis quística, trastornos asociados a la terapia con citoquinas,

25 Demencia pugilística, enfermedades desmielinizantes, fiebre por dengue hemorrágico, dermatitis, condiciones dermatológicas, diabetes, diabetes mellitus, enfermedad aterosclerótica diabética, enfermedad por cuerpos de Lewy difusos, cardiomiopatía congestiva dilatada, trastornos de los ganglios basales, Síndrome de Down en mediana edad, trastornos de movimiento inducidos por fármacos,

30 inducidos por fármacos que bloquean los receptores de dopamina del SNC, sensibilidad a los fármacos, eczema, encefalomiелitis, endocarditis, endocrinopatía, epiglotitis, infección por el virus epstein-barr, eritromelalgia, trastornos extrapiramidales y cerebelares, linfohistiocitosis familiar hematofagocítica, rechazo fetal de implante del timo, ataxia de Friedreich,

35 trastornos arteriales funcionales periféricos, sepsis micótica, gangrena gaseosa, úlcera gástrica, nefritis glomerular, rechazo de injerto de cualquier órgano o tejido, sepsis por gram negativos, sepsis por gram positivos, granulomas debidos a

organismos intracelulares, leucemia de células vellosas, enfermedad de Hallerorden-Spatz, tiroiditis de Hashimoto, fiebre del heno, rechazo de trasplantes de corazón, hemocromatosis, hemodiálisis, síndrome urémico hemolítico / purpura trombocitopénica trombótica, hemorragia, hepatitis (A),

5 arritmias del haz de His, infección por HIV / neuropatía por HIV, enfermedad de Hodgkin, trastornos hiperquinéticos del movimiento, reacciones de hipersensibilidad, neumonitis por hipersensibilidad, hipertensión, trastornos hipoquinéticos del movimiento, evaluación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal, enfermedad de Addison idiopática, fibrosis pulmonar idiopática, citotoxicidad

10 mediada por anticuerpo, Astenia, atrofia muscular espinal infantil, inflamación de la aorta, influenza a, exposición a radiación ionizante, iridociclitis/uveitis/ neuritis óptica, lesión por reperfusión de la isquemia, apoplejía isquémica, artritis reumatoidea juvenil, atrofia muscular espinal juvenil, sarcoma de Kaposi, rechazo de trasplante renal, legionela, leishmaniasis, lepra, lesiones del sistema

15 corticoespinal, lipedema, rechazo de trasplante de hígado, linfedema, malaria, Linfoma maligno, histiocitosis maligna, melanoma maligno, meningitis, meningococcemia, metabólica/idiopática, cefalea migrañosa, trastorno mitocondrial multisistémico, enfermedad del tejido conectivo mixto, gammapatía monoclonal, mieloma múltiple, degeneraciones multisistémicas (Mencel Dejerine-

20 Thomas Shi-Drager y Machado-Joseph), miastenia gravis, mycobacterium avium intracellulare, mycobacterium tuberculosis, síndrome mielodisplásico, infarto del miocardio, trastornos miocárdicos isquémicos, carcinoma nasofaríngeo, enfermedad pulmonar crónica neonatal, nefritis, nefrosis, enfermedades neurodegenerativas, atrofias musculares neurogénicas I, fiebre neutropénica,

25 linfoma no hodgkins, oclusión de la aorta abdominal y sus ramificaciones, trastornos arteriales oclusivos, terapia okt3, orquitis/epididimitis, orquitis/procedimientos para reversar la vasectomía, organomegalia, osteoporosis, rechazo del trasplante de páncreas, carcinoma pancreático, síndrome paraneoplásico /hipercalcemia maligna, rechazo del trasplante de

30 paratiroides, enfermedad pélvica inflamatoria, rinitis perenne, enfermedad pericárdica, enfermedad arterioesclerótica periférica, trastornos vasculares periféricos, peritonitis, anemia perniciosa, neumonía por Pneumocystis carinii, neumonía, síndrome POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammapatía monoclonal, y síndromes de cambios en la piel), síndrome post

35 perfusión, síndrome post bomba, síndrome post cardiectomía por IM, preeclampsia, parálisis supranuclear progresiva, hipertensión pulmonar primaria, radioterapia, enfermedad y fenómeno de Raynaud, enfermedad de Raynaud,

enfermedad de Refsum, taquicardia estrecha regular de QRS, hipertensión renovascular, lesión por reperfusión, cardiomiopatía restrictiva, sarcomas, esclerodermia, corea senil, demencia senil de tipo cuerpo de Lewy, artropatías seronegativas, choque, anemia falciforme, rechazo de aloinjerto de piel, síndrome

5 de cambios en la piel, rechazo de trasplante de intestino delgado, tumores sólidos, arritmias específicas, ataxia espinal, degeneraciones espinocerebelares, miositis estreptocócica, lesiones estructurales del cerebelo, panencefalitis esclerosante subaguda, síncope, sífilis del sistema cardiovascular, anafilaxia

10 sistémica, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, inicio sistémico de artritis reumatoidea juvenil, LLA de célula T o FAB, Telangiectasia, tromboangeitis obliterante, trombocitopenia, toxicidad, trasplantes, trauma/hemorragia, reacciones de hipersensibilidad tipo III, hipersensibilidad tipo IV, angina inestable, uremia, urosepsis, urticaria, enfermedades valvulares cardíacas, vena várice, vasculitis, enfermedades venosas, trombosis venosa, fibrilación ventricular,

15 infecciones micóticas y virales, encefalitis vital/meningitis aséptica, síndrome hemafagocítico vital, síndrome Wernicke-Korsakoff, enfermedad de Wilson, rechazo de xenoinjerto de cualquiera órgano o tejido, síndrome coronario agudo, Polineuritis Idiopática Aguda, Poliradiculoneuropatía Desmielinizante Inflamatoria Aguda, isquemia aguda, Enfermedad de Still del Adulto, Alopecia areata,

20 Anafilaxia, Síndrome del Anticuerpo Anti-Fosfolípido, anemia aplástica, Arterioesclerosis, eczema atópico, dermatitis atópica, dermatitis autoinmune, trastorno autoinmune asociado con infección por Estreptococo, Enteropatía Autoinmune, pérdida autoinmune de la audición, Síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS), miocarditis autoinmune, falla ovárica prematura autoinmune,

25 Blefaritis, Bronquiectasia, pénfigo vesicular, Enfermedad Cardiovascular, Síndrome Antifosfolípido Catastrófico, Enfermedad Celiaca, Espondilosis Cervical, isquemia crónica, pénfigo cicatricial, síndrome clínicamente aislado (CIS) con riesgo de esclerosis múltiple, Conjuntivitis, Trastorno siquiátrico de inicio en la niñez, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), Dacriocistitis,

30 dermatomiositis, retinopatía diabética, Diabetes mellitus, hernia discal, prolapso discal, anemia hemolítica inmune inducida por fármacos, Endocarditis, Endometriosis, endoftalmitis, Episcleritis, Eritema multiforme, eritema multiforme principal, pénfigo gestacional, Síndrome Guillain-Barre (GBS), fiebre del heno, Síndrome de Hughes, Enfermedad de Parkinson Idiopática, neumonía intersticial

35 idiopática, alergia mediada por IgE, anemia hemolítica Inmune, miositis con cuerpos de inclusión, enfermedad ocular inflamatoria Infecciosa, enfermedad inflamatoria desmielinizante, enfermedad cardíaca inflamatoria, enfermedad renal

- inflamatoria, IPF/UIP, Iritis, queratitis, queratoconjuntivitis por sicca, enfermedad de Kussmaul o Enfermedad de Kussmaul-Meier, Parálisis de Landry, Histiocitosis Celular de Langerhan, Livedo reticularis, Degeneración Macular, Poliangeitis Microscópica, Morbus Bechterev, Desordenes Neuronales Motores, pénfigo de
- 5 membrana mucosa, falla orgánica múltiple, Miastenia Gravis, Síndrome Mielodisplásico, Miocarditis, Trastornos de las raíces nerviosas, Neuropatía, Hepatitis No A No B, Neuritis Óptica, Osteolisis, JRA Pauciarticular, enfermedad arterial oclusiva periférica (PAOD), enfermedad vascular periférica (PVD), enfermedad arterial periférica (PAD), Flebitis, Poliarteritis nodosa (o periarteritis
- 10 nodosa), Policondritis, Polimialgia Reumática, Poliosis, JRA Poliarticular, Síndrome de Deficiencia Poliendocrina, Polimiositis, polimialgia reumática (PMR), Síndrome Post-Bomba, parkinsonismo primario, Prostatitis, aplasia de células rojas puras, Insuficiencia Adrenal Primaria, Neuromielitis Óptica Recurrente, Restenosis, enfermedad cardíaca reumática, SAPHO (sinovitis, acné, pustulosis,
- 15 hiperostosis, y osteitis), esclerodermia, Amiloidosis Secundaria, Choque pulmonar, escleritis, ciática, Insuficiencia Adrenal Secundaria, enfermedad del tejido conectivo asociada a sílica, Dermatitis Sneddon-Wilkinson, espondilitis anquilosante, Síndrome de Stevens-Johnson (SJS), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, arteritis temporal, retinitis toxoplásmica, necrólisis
- 20 epidérmica crónica, mielitis transversa, TRAPS (reacción alérgica tipo 1 al receptor del factor de necrosis tumoral, Diabetes Tipo II, Urticaria, neumonía intersticial usual (UIP), Vasculitis, conjuntivitis vernal, retinitis viral, síndrome de Vogt- Koyanagi-Harada (síndrome VKH), degeneración macular húmeda y cicatrización de heridas.
- 25 68. Un método para tratar a un paciente que sufre de un trastorno en el que la IL-13 es perjudicial, que comprende el paso de administrar la proteína de unión de la reivindicación 1, de manera concurrente, o después de la administración de un
- 30 segundo agente, en donde el segundo agente se selecciona del grupo que consiste de esteroides inhalados; agonistas beta; agonistas beta de corta acción o larga acción; antagonistas de leucotrienos o receptores de leucotrienos; ADVAIR;
- inhibidores de IgE; anticuerpos anti-IgE; XOLAIR; inhibidores de la fosfodiesterasa; inhibidores de PDE4; xantinas; fármacos anticolinérgicos; agentes estabilizantes de mastocitos; Cromolyn; inhibidores de IL-4; inhibidores de IL-5; inhibidores de eotaxina/CCR3; antagonistas de histamina o sus
- 35 receptores incluyendo H1, H2, H3, y H4; antagonistas de prostaglandina D o sus receptores DP1 y CRTH2; antagonistas de TNF; un fragmento soluble de un receptor de TNF; ENBREL; antagonistas de la enzima TNF; inhibidores de la

- enzima convertidora de TNF (TACE); antagonistas del receptor muscarínico; antagonistas TGF-beta; interferón gamma; perfenidona; agentes quimioterapéuticos, metotrexato; leflunomida; sirolimus (rapamicina) o un análogo del mismo, CC1-779; inhibidores de COX2 o cPLA2; AINEs; inmunomoduladores;
- 5 inhibidores de p38; inhibidores de TPL-2, MK-2 y NFkB; budesonida; factor de crecimiento epidérmico; corticosteroides; ciclosporina; sulfasalazina; aminosalicilatos; 6-mercaptopurina; azatioprina; metronidazol; inhibidores de lipoxigenasa; mesalamina; olsalazina; balsalazida; antioxidantes; inhibidores de tromboxano; antagonistas del receptor de IL-1; anticuerpos anti-IL-1 β ; anticuerpos
- 10 anti-IL-6; factores de crecimiento; inhibidores de elastasa; compuestos piridinil-imidazol; anticuerpos o agonistas de TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, EMAP-II, GM-CSF, FGF, o PDGF; anticuerpos de CD2, CD3, CD4, CD8, CD25,
- 15 CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 o sus ligandos; FK506; rapamicina; micofenolato mofetil; ibuprofeno; prednisolona; inhibidores de la fosfodiesterasa; agonistas de adenosina; agentes antitrombóticos; inhibidores de complemento; agentes adrenérgicos; inhibidores de IRAK, NIK, IKK, p38, o MAP quinasa; inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 β ; inhibidores de la enzima
- 20 convertidora de TNF α ; inhibidores de la señalización de células T; inhibidores de metaloproteinasas; 6-mercaptopurinas; inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; receptores de citoquinas solubles; receptor de p55 TNF soluble; receptor de p75 TNF soluble; sIL-1RI; sIL-1RII; sIL-6R; citoquinas anti-inflamatorias; IL-4; IL-10; IL-11; y TGF β .
- 25 69. El método de acuerdo con la reivindicación 65, en donde dicha administración al sujeto es mediante al menos un modo seleccionado de parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intra-articular, intrabronquial, intra-abdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitaria, intracelial, intracerebelar, intracerebroventricular, intracolica, intracervical, intragástrica,
- 30 intrahepática, intramiocárdica, intraósea, intrapélvica, intrapericardica, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarectal, intrarenal, intraretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravesical, en bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, y transdérmica.
70. Un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en
- 35 donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a IL-13 humana e inhibe la unión de dicha IL-13 al receptor IL-13 α 2 en un ensayo de

unión a receptor basado en superficie celular con una IC_{50} seleccionada del grupo que consiste de aproximadamente 1.5×10^{-8} a 1×10^{-8} M, 1×10^{-8} M a 1×10^{-9} M, 10^{-9} a 10^{-10} M y 10^{-10} a 10^{-11} M, o en un ensayo de unión a receptor basado en ELISA con una IC_{50} seleccionada del grupo que consiste de aproximadamente 1.8×10^{-8} a 1×10^{-8} M, 1×10^{-8} a 1×10^{-9} M, 10^{-9} a 10^{-10} M y 10^{-10} a 10^{-11} M.

71. Un anticuerpo aislado, un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a IL-13 humana e inhibe la AHR en aproximadamente un 50% en un modelo de asma inducida por IL-13 humana.

72. El anticuerpo de la reivindicación 70, en donde dicho anticuerpo inhibe la AHR en aproximadamente un 80% en un modelo de asma inducida por IL-13 humana.

73. El anticuerpo de la reivindicación 72, en donde dicho anticuerpo es 13C5.5.

74. Un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a IL-13 humana e inhibe la AHR en aproximadamente un 50% e inhibe la producción de moco en aproximadamente un 40% en un modelo de asma inducida por IL-13 humana.

75. El anticuerpo de la reivindicación 74, en donde dicho anticuerpo es 13C5.5.

76. Un anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a IL-13 humana e inhibe la unión de dicha IL-13 al receptor IL-13 α 2 en un ensayo de unión a receptor basado en superficie celular o en un ensayo de unión a receptor basado en ELISA en aproximadamente un 70-100% a una concentración de 100nM.

77. El anticuerpo de la reivindicación 70, en donde dicho anticuerpo no es BAK502G9, mAb13.2 o MJ2-7.

78. El anticuerpo de la reivindicación 70 en donde dicho anticuerpo es 13C5.5.

79. El anticuerpo de la reivindicación 76 en donde dicho anticuerpo es 13C5.5.

80. Un anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une a IL-13 con características de unión seleccionadas del grupo que consiste de:

5 a) una constante de velocidad de asociación (k_{on}) entre aproximadamente $10^5 M^{-1} s^{-1}$ a $10^6 M^{-1} s^{-1}$ o aproximadamente $10^6 M^{-1} s^{-1}$ a $10^7 M^{-1} s^{-1}$;

b) una constante de velocidad de disociación (k_{off}) de aproximadamente $10^{-4} s^{-1}$ a $10^{-5} s^{-1}$; o de aproximadamente $10^{-5} s^{-1}$ a $10^{-6} s^{-1}$, medida mediante resonancia de plasmón de superficie; y

10 c) una constante de disociación (K_D) de aproximadamente 1.5×10^{-10} a $1 \times 10^{-10} M$ o aproximadamente 10^{-10} a $10^{-11} M$.

81. El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo reivindicación 80, en donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una constante de velocidad de asociación (k_{on}) a IL-13 seleccionada del grupo que consiste de: $6.68 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, $7.86 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, $8.35 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, $8.69 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, $9.15 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, $1.26 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$, $1.7 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$, y $2.51 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$.

82. El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo reivindicación 80, en donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una constante de velocidad de disociación (k_{off}) a IL-13 seleccionada del grupo que consiste de: $1.23 \times 10^{-4} s^{-1}$; $1.76 \times 10^{-4} s^{-1}$; $4.74 \times 10^{-4} s^{-1}$; $1.91 \times 10^{-5} s^{-1}$; $2.14 \times 10^{-5} s^{-1}$, $3.82 \times 10^{-5} s^{-1}$; $8.81 \times 10^{-5} s^{-1}$ y $9.65 \times 10^{-5} s^{-1}$, medida mediante resonancia de plasmón de superficie.

83. El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo reivindicación 80, en donde dicho anticuerpo, fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una constante de disociación (K_D) a IL-13 seleccionada del grupo que consiste de: $1.05 \times 10^{-10} M$; $7.10 \times 10^{-10} M$; $1 \times 10^{-11} M$; $2.20 \times 10^{-11} M$; $2.72 \times 10^{-11} M$; $4.17 \times 10^{-11} M$; $5.68 \times 10^{-11} M$; $7.01 \times 10^{-11} M$; $7.10 \times 10^{-11} M$; y $9.79 \times 10^{-11} M$.

84. El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 80, en donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, es capaz de modular una función biológica de IL-13.

30 85. El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 80, en donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, es capaz de neutralizar la IL-13.

86. El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 80, en donde dicho anticuerpo humanizado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se selecciona del grupo que consiste de; una molécula inmunoglobulina, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo con injerto de CDR, un anticuerpo humanizado, un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un Fv, un Fv unido por disulfuro, un scFv, un anticuerpo de dominio sencillo, un diacuerpo, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo específico dual, y un anticuerpo biespecífico.

87. El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 80, en donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, es un anticuerpo humanizado.

88. El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 80, en donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, es un anticuerpo 13C5.5.

89. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 80 y un portador farmacéuticamente aceptable.

90. La composición farmacéutica de la reivindicación 89 que comprende además al menos un agente terapéutico adicional para tratar un trastorno en el que la actividad de IL-13 es perjudicial.

91. Un anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une a IL-13 humana de tal manera que la IL-13 con dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, unido al epítipo definido por las regiones topográficas Ser26-Thr27-Ala28-Leu29-Arg30-Glu31-Leu32-Ile33-Glu34-Glu35-Leu36-Val37-Asn38 y Lys123-Lys124-Leu125-Phe126-Arg127-Glu128-Gly129-Arg130 de ID de SEC No. 1 presenta inhibición de unión al receptor de IL-13.

92. El anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 91 en donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a IL-13 humana de tal manera que la IL-13 con dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, unida al epítipo definido por las regiones topográficas Arg30-Glu31-Leu32-Ile33-Glu34-Glu35-

Leu36-Val37-Asn38 y Lys123-Lys124-Leu125-Phe126-Arg127 de ID de SEC No. 1 presenta inhibición de unión al receptor IL-13.

93. El anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 91 en donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a IL-13 humana de tal manera que la IL-13 con dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, unido al epítipo definido por las regiones topográficas Ser26-Thr27-Ala28-Leu29-Arg30-Glu31-Leu32-Ile33-Glu34-Glu35- Leu36-Val37-Asn38 y Lys123-Lys124-Leu125-Phe126-Arg127-Glu-128-Gly129- Arg130 of ID de SEC No. 1 presenta inhibición de la unión de al receptor IL-13 α 2.

94. El anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 91 en donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a IL-13 humana de tal manera que la IL-13 con dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, unidos al epítipo definido por las regiones topográficas Ser26-Thr27-Ala28-Leu29-Arg30-Glu31 - Leu32-Ile33-Glu34-Glu35- Leu36-Val37-Asn38 y Lys123-Lys124-Leu125-Phe126-Arg127-Glu-128-Gly129- Arg130 de ID de SEC No. 1 presenta inhibición de la unión al receptor IL-13 α 2, con la condición que dicho anticuerpo no sea BAK502G9 o MJ2-7.

95. El anticuerpo de la reivindicación 91 en donde dicho anticuerpo es 13C5.5.

96. Un anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a los aminoácidos 104-130 de ID de SEC No. 1.

97. El anticuerpo de la reivindicación 96 en donde dicho anticuerpo es 13C5.5.

98. Un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une a IL-13 y evita la unión de IL-13 al receptor IL-13 α 2 con características de unión seleccionadas del grupo que consiste de:

- a. unión a un epítipo en IL-13 que incluye Hélice A y D;
- b. una constante de velocidad de asociación (k_{on}) entre aproximadamente $10^5 M^{-1} s^{-1}$ a $10^6 M^{-1} s^{-1}$ o aproximadamente $10^6 M^{-1} s^{-1}$ a $10^7 M^{-1} s^{-1}$;

- c. una constante de velocidad de disociación (k_{off}) de aproximadamente 10^{-4}s^{-1} a 10^{-5}s^{-1} ; o de aproximadamente 10^{-5}s^{-1} a 10^{-6}s^{-1} , medida mediante resonancia de plasmón de superficie; y
- d. una constante de disociación (K_D) de aproximadamente 1.5×10^{-10} a 1×10^{-10} M o aproximadamente 10^{-10} a 10^{-11} M.

99. Un anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une a variante de IL-13 con características de unión seleccionadas del grupo que consiste de:

- a. unión a un epítipo en IL-13 incluyendo Hélice A y D;
- b. una constante de velocidad de asociación (k_{on}) entre aproximadamente $10^5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o aproximadamente $10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $10^7\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$;
- c. una constante de velocidad de disociación (k_{off}) de aproximadamente 10^{-4}s^{-1} a 10^{-5}s^{-1} ; o de aproximadamente 10^{-5}s^{-1} a 10^{-6}s^{-1} , medida con resonancia de plasmón de superficie; y
- d. una constante de disociación (K_D) de aproximadamente 1.5×10^{-10} a 1×10^{-10} M o aproximadamente 10^{-10} a 10^{-11} M.

100. Un anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une a IL-13 de tipo nativo y a variante de IL-13 con características de unión seleccionadas del grupo que consiste de:

- a. unión a un epítipo en IL-13 incluyendo Hélice A y D;
- b. una constante de velocidad de asociación (k_{on}) entre aproximadamente $10^5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o aproximadamente $10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $10^7\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$;
- c. una constante de velocidad de disociación (k_{off}) de aproximadamente 10^{-4}s^{-1} a 10^{-5}s^{-1} ; o de aproximadamente 10^{-5}s^{-1} a 10^{-6}s^{-1} , medida con resonancia de plasmón de superficie; y
- d. una constante de disociación (K_D) de aproximadamente 1.5×10^{-10} a 1×10^{-10} M o aproximadamente 10^{-10} a 10^{-11} M.

101. El anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 94, en donde dicho anticuerpo inhibe en aproximadamente un 50% la AHR en un modelo de asma inducida por IL-13 humana.
- 5 102. El anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 94, en donde dicho anticuerpo inhibe en aproximadamente un 50% la producción de moco en un modelo de asma inducido por IL-13 humana.
103. El anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 94, en donde dicho anticuerpo inhibe en aproximadamente un 50% la TARC en un modelo de asma inducida por IL-13 humana.

8370-US-P1_ST25.txt

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Abbott Laboratories, Inc.
Wu, Chengbin

<120> Interleucina -13 Proteinas de union

<130> 8370 US P1

<160> 94

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
<211> 132
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

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> 2
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

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

8370-US-P1_ST25.txt
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

8370-US-P1_ST25.txt

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 3
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

8370-US-P1_ST25.txt

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 4
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 4

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
20 25 30
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

2/2 09/1966

PCT/US2007/019660

8370-US-P1_ST25.txt

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

<210> 5
<211> 105
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 5

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 6
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6

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

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

<210> 7
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 7

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 8

pagina 5

8370-US-P1_ST25.txt

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

<400> 8

Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 10
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 11
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 13
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

8370-US-P1_ST25.txt

<400> 13

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

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

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His
 1 5 10 15

<210> 15

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Val Leu Thr
 1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 16

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

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

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

<210> 17

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
 1 5 10

<210> 18

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

8370-US-P1_ST25.txt

<400> 18

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 19

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 20

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

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
20

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 22

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 23

8370-US-P1_ST25.txt

<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 24
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 25
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

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

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 26
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 27
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27

Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 28
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

8370-US-P1_ST25.txt

<400> 28

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 29

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 32

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 32

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Trp Ile His Trp Val Asn Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe

pagina 10

50 55 8370-US-P1_ST25.txt 60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ser Thr Ala Thr Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 33
<211> 113
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 33

Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Asn Ile Gly
1 5 10 15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Lys Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30
Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ala Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln His
85 90 95
Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Asn Leu Glu Leu Lys
100 105 110
Arg

<210> 34
<211> 116
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 34

Gln Val Arg Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

8370-US-P1_ST25.txt

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

Trp Ile His Trp Val Asn Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 35
<211> 113
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 35

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Thr Gln Thr Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Asn
85 90 95

Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

Arg

8370-US-P1_ST25.txt

<210> 36
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 36

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Asp Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Asn Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly His Ile Ala Pro Gly Ser Gly Glu Thr Tyr Asp Asn Glu Met Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Lys Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Ile His Leu Ser Ser Leu Ser Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Ser Phe Thr Phe Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 37
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 37

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

pagina 13

8370-US-P1_ST25.txt

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 38
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 38

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

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

Trp Ile Asn Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly His Ile Ala Pro Gly Ser Gly Glu Thr Tyr Asp Asn Glu Met Phe
50 55 60

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

Ile His Leu Ser Ser Leu Ser Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 39
<211> 123
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 39

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

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

213

8370-US-P1-ST25.txt

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

Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Tyr Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ser Arg Trp Arg Thr Ser Tyr Phe Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 40
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 40

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 41
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

8370-US-P1_ST25.txt

<400> 41
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Thr
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30
Gly Val Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Asn Tyr Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ser Arg Trp Arg Thr Ser Tyr Phe Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 42
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 42
Glu Val Gln 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 Ser Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Gly Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Glu Thr Met
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Gly Ser Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

215

100 8370-US-P1_ST25.txt 110
105

<210> 43
<211> 113
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 43

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Glu Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

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

Arg

<210> 44
<211> 117
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 44

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

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

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

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

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

pagina 17

8370-US-P1_ST25.txt

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 45
<211> 114
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 45

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Asn Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

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

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

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

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys Arg

<210> 46
<211> 123
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 46

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

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

217

8370-US-PI_ST25.txt

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

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

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

Phe Leu Met Leu Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Thr Val Ser Ser Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 47
<211> 108
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 47

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Arg Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

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

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

<210> 48
<211> 123
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 48

8370-US-P1_ST25.txt
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30
Asp Met Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Asp Leu Glu
35 40 45
Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Ser Gln Val
65 70 75 80
Phe Leu Met Leu Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Ile Val Ser Ser Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 49
<211> 108
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 49
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Ala Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

8370-US-P1_ST25.txt

<210> 50
<211> 123
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 50

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30
Asp Leu Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Ser Gln Val
65 70 75 80
Phe Leu Met Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Ile Gly Ser Ser Gly Tyr Ile Tyr Tyr Glu Met Asp Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 51
<211> 108
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 51

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Asp Gln
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Leu

8370-US-PI_ST25.txt
90

85

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
100 105<210> 52
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 52

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Phe Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30Tyr Met Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asn Thr Ile Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Gly Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95Ala Arg Tyr Ala Tyr Tyr Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110Thr Leu Thr Val Ser Ser
115<210> 53
<211> 110
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 53

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
1 5 10 15Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Ile Gly Thr Val Thr Thr Asn
20 25 30Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
35 40 45Leu Ile Gly Ser Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60

pagina 22

8370-US-P1_ST25.txt

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

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

His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 54
<211> 118
<212> PRT
<213> MUS musculus

<400> 54

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

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

Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Glu Arg Ile Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

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

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Gly Arg Tyr Phe Cys Ala
85 90 95

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

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 55
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 55

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

8370-US-P1_ST25.txt

Gly Lys Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Ile Ile Asp
65 70 75 80
Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
85 90 95
Glu Gly Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 56
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 56

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Ser
20 25 30
Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Asn Ser Val Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80
Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 57
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 57

8370-US-P1_ST25.txt

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

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

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

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

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

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

Glu Asn Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 58
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 58

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Glu Phe Ser Leu Thr Gly Ser
 20 25 30

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

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

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

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

Arg Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

8370-US-P1_ST25.txt

<210> 59
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 59

Asn 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 Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
20 25 30
Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Ala Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp
65 70 75 80
Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
85 90 95
Glu Asn Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 60
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 60

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr
20 25 30
Asn Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Leu Ile Trp Gly Asp Gly Asn Thr Ala Phe Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80
Lys Leu Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Ile Lys Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 8370-US-P1_ST25.txt 110
105

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 61
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 61

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

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

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

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

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

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

<210> 62
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 62

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly His
20 25 30

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

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Asn Thr Asp Phe Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

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

pagina 27

226

8370-US-P1_ST25.txt

Lys Leu Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Ile Lys Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 63
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 63

His 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 Arg Ala Ser Glu Thr Val Asp Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Glu Gly Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Ser Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 64
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Consenso IL-13 CDR

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X=T,D,G,S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X=M,S,Y,L,H

227

8370-US-P1_ST25.txt

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X=G,W,Y,A,S,N

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X=V,I,M

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X=D,H,S,Y,N,G

<400> 64
Xaa Ser Asp Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 65
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> consensus IL-13 CDR

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X=M,E,H,R,S,G,L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X=I or absent

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X=H,Y,A,D,S,W

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X=P,S,W,G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X=S,G,E,D

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X=D,G,S,E,N

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X=S,Y,G

<220>

8370-US-P1_ST25.txt

<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X=E,N,Y,V,R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X=T,I,K

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X=R,Y,I,D,A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> X=L,Y,D,F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> X=N,P,S,D

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> X=Q,E,D,P,S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> X=K,M,S,T,A,V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> X=F,L,V,M

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> X=K,R,Q

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> X=D,G,S

<400> 65

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa

<210> 66
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> consensus IL-13 CDR

8370-US-P1_ST25.txt

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X=W,T,G,Y,D,I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X=R,A,S,G,V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X=T,F,Y,S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X=S,T,Y

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X=Y,F,G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X=F,Y

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X=S,Y,I,F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X=D,L,Y,P

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> X=Y,A,P,E

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> X=F,M,S,L,I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> X=D,V,N,K

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> X=Y,F

<400> 66
xaa xaa xaa xaa xaa xaa xaa xaa Tyr Gly xaa xaa xaa xaa
1 5 10

8370-US-P1_ST25.txt

<210> 67
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> consensus IL-13 CDR

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X=K,R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X=S,A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X=S,T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X=Q,K,I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X=N,S,T,G,E

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X=L,T,S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X=L,Q,V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X=Y,N,H,D,T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X=S,I,T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X=S,D,N,H,Y

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> X=N,G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)

8370-US-P1_ST25.txt

<223> X=K,F,N,E,S
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> X=N,T,S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> X=Y,F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> X=L,A,M

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> X=A,D,E,H,N

<400> 67
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa

<210> 68
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> consensus IL-13 CDR

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X=L,S,K,T,W,Y

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X=V,T,A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X=S,N

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X=N,K,T,R,M

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X=R,L,K

<220>

Patento de ^{OL}
Invencción ^{RGF}

09/19665

2/2

8370-US-P1_ST25.txt

<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X=F,D,E,H,A,P

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X=S,P,R

<400> 68

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 69
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> consensus IL-13 CDR

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X=F,W,Q,A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X=Q,L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X=H,G,Y,W,N

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X=N,S,T,Y,L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X=Y,T,S,E,H

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X=L,V,F,Y,N,G,D,P

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X=P,H

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X=L,F,Y,W,R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)

8370-US-P1_ST25.txt

<223> X=T,V

<400> 69

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 70

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada humanizada 5G1.1 región variable

<400> 70

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

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

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

Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Asn Tyr Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Arg Gly Lys Ala Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ser Arg Trp Arg Thr Ser Tyr Phe Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 71

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera humanizada 5G1.1 región variable

<400> 71

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

8370-US-P1_ST25.txt

His Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 72
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena pesada humanizada 5G1.2 región variable

<400> 72

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

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

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

Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Asn Tyr Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ser Arg Trp Arg Thr Ser Tyr Phe Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

8370-US-P1_ST25.txt

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

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

Ser Arg Trp Arg Thr Ser Tyr Phe Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 75
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena ligera humanizada 5G1.3 región variable
<400> 75

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 76
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena pesada humanizada 13c5.1 región variable
<400> 76

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

8370-US-P1_ST25.txt

<210> 73
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cadena ligera humanizada 5G1.2 región variable

<400> 73

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

His Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 74
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cadena pesada humanizada 5G1.3 región variable

<400> 74

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

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

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

Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Asn Tyr Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

8370-US-P1_ST25.txt

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Asp Met Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Thr Val Ser Ser Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 77
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cadena ligera humanizada 13c5.1 región variable
 <400> 77
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Val Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

8370-US-P1_ST25.txt

<210> 78
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena pesada humanizada 13c5.2 región variable

<400> 78
Glu Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
1 5 10 15
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30
Asp Met Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45
Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
65 70 75 80
Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Thr Val Ser Ser Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 79
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena ligera humanizada 13c5.2 región variable

<400> 79
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Val Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Phe Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

8370-US-P1_ST25.txt

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

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

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

<210> 80
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena pesada humanizada 13c5.5 región variable

<400> 80

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

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

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

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

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

Val Leu Lys Leu Thr Ser Val Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Thr Val Ser Ser Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 81
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena ligera humanizada 13c5.5 región variable

<400> 81

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

1 5 8370-US-P1_ST25.txt 10 15

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Leu
85 90 95

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

<210> 82
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena pesada humanizada 9c11.1 región variable

<400> 82

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

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

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ser Thr Ala Thr Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

8370-US-PI_ST25.txt

<210> 83
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena ligera humanizada 9c11.1 región variable

<400> 83

Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Thr Gln Thr Leu Leu Asn Ser
20 25 30
Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Asn
85 90 95
Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 84
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena pesada humanizada 9c11.2 región variable

<400> 84

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser
20 25 30
Trp Ile His Trp Val Asn Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe

50 55 8370-US-P1_ST25.txt 60

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

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

Ala Ser Thr Ala Thr Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 85
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena ligera humanizada 9c11.2 región variable

<400> 85

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Thr Gln Thr Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Asn
85 90 95

Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 86
<211> 123
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 86

8370-US-P1_ST25.txt

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45
Ala Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Lys Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Glu Ala Ser Ala Ser Thr Ala Thr
65 70 75 80
Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Ala Gly Arg Thr Glu Gly Thr His Tyr Tyr Ala Met Asp Ala
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 87
<211> 111
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 87
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Val Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15
Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ile Ser Ser
20 25 30
Ser Asp Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly His Gln Pro Lys
35 40 45
Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Ala Arg
50 55 60
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro
65 70 75 80
Val Gln Ala Asp Asp Ile Ala Ala Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Arg Glu
85 90 95
Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105 110

8370-US-PI_ST25.txt

<210> 88
<211> 119
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 88

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Thr Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Ser Ile Ser Asn Asp Gly Ile Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Lys Ala Lys Ser Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Thr Trp Asn Trp Glu Phe Gly Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Val Met Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 89
<211> 111
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 89

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15
Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ile Ser Arg
20 25 30
Tyr Asn Arg Met His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Gln Pro Lys
35 40 45
Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Tyr Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
50 55 60
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Tyr Pro
65 70 75 80

8370-US-P1_ST25.txt

Val Gln Ala Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Arg Glu
 85 90 95

Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Asn Arg
 100 105 110

<210> 90
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cadena pesada humanizada 5G1.5 región variable

<400> 90

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

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

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

Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Asn Tyr Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ser Arg Trp Arg Thr Ser Tyr Phe Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 91
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cadena ligera humanizada 5G1.5

<400> 91

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

8370-US-P1_ST25.txt

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 92
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena ligera humanizada 13c5.5L2E región variable

<400> 92

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 Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
20 25 30

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

Phe Tyr Thr Ser Met Lys Pro Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Leu
85 90 95

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

<210> 93
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena ligera humanizada 13c5.5L3F

8370-US-P1_ST25.txt

<400> 93

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 Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Leu Thr Pro Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 94

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera humanizada 13c5.SL2EL3F región variable

<400> 94

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 Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30

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

Phe Tyr Thr Ser Met Lys Pro Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Leu Thr Pro Pro Leu
 85 90 95

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

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION [x] MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [x] 1
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [x] 1
- ◆ Descripción de la invención [x] 17
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [x] 2

COMPLETA [x] INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA [] INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA [] INCOMPLETA []

Sando Zedraun
Firma Responsable

Fecha Feb-26-9

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
ABBOT LABORATORIES

REFERENCIA	Radicación No.	09 19665
	Solicitud internacional	PCT/US2007/019660
	Fecha inicio fase nacional	08/04/2009
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	No 4426

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

1. La solicitud no contiene la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT.
2. El solicitante debe aclarar la numeración del capítulo reivindicatorio (folio 187 s.s).
3. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

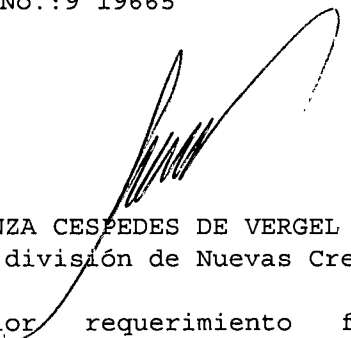
En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud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

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

Continúa en la página siguiente...

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.:9 19665



ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 17 ABR. 2009
jfernand

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

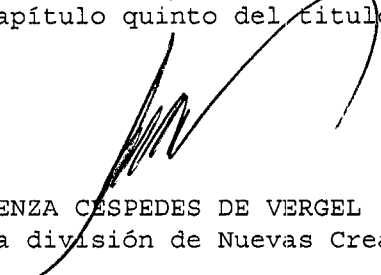
Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
ABBOT LABORATORIES

REFERENCIA	Radicación No.	9 19665
	Solicitud internacional	PCT/US2007/019660
	Fecha inicio fase nacional	08/04/2009
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	Nº 4427

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de quince reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 17 ABR. 2009
jfernand