

Título:

ANTICUERPOS ANTI-IL-25 Y USOS DE LOS MISMOS

Resumen: La presente invención proporciona anticuerpos que se unen a interleuquina-25 (IL-25) humana y métodos de uso de los mismos. De acuerdo a ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención se unen a IL-25 humana con alta afinidad. En ciertas realizaciones, la invención incluye los anticuerpos que se unen a IL-25 humana y bloquea señalización celular mediada por IL-25. Los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos humanos de ocurrencia no natural. Los anticuerpos de la invención son útiles para el tratamiento de varios trastornos asociados con actividad o expresión de IL-25, incluyendo asma, alergia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad inflamatoria intestinal (EII), incluyendo colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, dermatitis atópica (DA), y Granulomatosis eosinofílica con poliangitis (EGPA), también conocido como síndrome de Churg-Strauss

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a anticuerpos, y fragmentos de unión a antígeno, que se unen específicamente a Interleuquina-25 (IL-25), composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos y métodos de uso de los mismos.

ANTECEDENTES

Interleuquina-25 (IL-25) es una citoquina que está estructuralmente relacionada con la Interleuquina-17 (IL-17) y en ocasiones se denomina IL-17E. Se trata de una glucoproteína homodimérica, secretada que interactúa con y señala a través del receptor IL-17RB/IL-17RA heterodimérico (Iwakura, y cols., (2010), Inmunidad, 34:149). IL-25 es producida por células Th2, células epiteliales, células endoteliales, los macrófagos alveolares, mastocitos, eosinófilos y basófilos (Rouvier, E. y cols., (1993), J. Immunol.150:5445-5456; Pan, G. y cols., (2001), J. Immunol. 167:6559 ; Kim, M. y cols., (2002), Blood 100:2330). La señalización a través de IL-25 es asociada con el reclutamiento de eosinófilos, iniciación de respuestas de Th2 y Th9 y supresión de las respuestas de las células TH1 y TH17. IL-25 induce la producción de otras citoquinas, incluyendo IL-4, IL-5 e IL-13, en múltiples tejidos (Fort, MM y cols., (2001), Inmunidad 15:985).

IL-25 ha sido implicado en inflamación crónica asociada con el tracto gastrointestinal y el gen IL-25 ha sido identificado en una región cromosómica asociada con enfermedades autoinmunes del intestino, como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (Büning, C. y cols., (2003), Eur. J. Immunogenet. OCT; 30 (5): 329-333). IL-25 también se ha demostrado que está sobrerregulado en muestras de pacientes con asma (Sherkat, R. y cols., (2014), Asia-Pacífico. Allergy Oct; 4 (4) :212-221). En consecuencia, el bloqueo de la señalización de IL-25 puede ser útil para el tratamiento de diversos trastornos asociados con actividad o expresión de IL-25.

Los anticuerpos anti-IL-25 son mencionados, por ejemplo, en patentes en EE.UU. Nos. 8.785.605; 8.658.169 y 8.206.717; y publicaciones PCT WO 2011/123507; WO2010/038155 y WO2008/129263. No obstante, existe una necesidad en el arte antagonistas IL-25 novedosos, como anticuepro el anti-

IL-25 de la presente invención, para el tratamiento de enfermedades o trastornos asociados con la expresión y/o la señalización de IL-25, u otras condiciones asociadas con la expresión y/o la señalización de IL-25.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona anticuerpos aislados y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a interleuquina-25 (IL-25) humana.

En un primer aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de los mismos que se une específicamente a interleuquina-25 (IL-25) humana, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno exhibe dos o más de las siguientes características:

- (a) es un anticuerpo monoclonal completamente humano;
- (b) se une a IL-25 humana con un KD de menos de alrededor de 120 pM, medido a través de resonancia de plasmones de superficie a 25°C;
- (c) se une a IL-25 humana con una vida media disociativa ($T_{1/2}$) superior a alrededor de 105 minutos medido a través de resonancia de plasmones de superficie a 25°C;
- (d) bloquea la señalización de IL-25 humana en células modificadas para expresar un receptor IL-25 (IL-17 RA/IL-17RB) con un IC50 de menos de alrededor de 2,0 nM;
- (e) bloquea la señalización de IL-25 humana en células mononucleares de sangre periférica humana (pbmcs) con un IC50 de menos de alrededor de 16 nM;
- (f) reduce la circulación y/o niveles de IgE en el pulmón en un mamífero que sobre expresa IL-25;
- (g) reduce metaplasia de células caliciformes en un mamífero que sobre expresa IL-25;
- (h) comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada contenidas dentro de una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la Tabla 1; o
- (i) comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena liviana contenidas dentro de una región variable de la cadena liviana que comprenden una secuencia de aminoácidos como se establece en la Tabla 1.

Los anticuerpos aislados y fragmentos de unión a antígeno de la invención son útiles, entre otras cosas, inter alia, para el tratamiento de enfermedades y los trastornos asociados a la actividad o expresión de interleuquina-25 (IL-25)

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-IL-25 o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-25 humana con un KD de menos de alrededor de 100 pM medido a través de resonancia de plasmones de superficie a 25°C o 37°C.

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-IL-25 o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-25 humana con un KD de menos de alrededor de 60 pM medido a través de resonancia de plasmones de superficie a 25°C o 37°C.

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-IL-25 o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-25 humana con un KD de menos de alrededor de 40 pM medido a través de resonancia de plasmones de superficie a 25°C o 37°C.

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-IL-25 o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-25 humana con un KD de menos de alrededor de 20 pM medido a través de resonancia de plasmones de superficie a 25°C o 37°C.

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-IL-25 o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-25 humana con un $t_{1/2}$ mayor a alrededor de 150 minutos medido a través de resonancia de plasmones de superficie a 25°C.

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-IL-25 o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-25 humana con un $t_{1/2}$ mayor a alrededor de 200 minutos medido a través de resonancia de plasmones de superficie a 25°C.

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-IL-25 o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-25 humana con un $t_{1/2}$ mayor a alrededor de 250 minutos medido a través de resonancia de plasmones de superficie a 25°C.

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-IL-25 o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-25 humana con un $t_{1/2}$ mayor a alrededor de 400 minutos medido a través de resonancia de plasmones de superficie a 25°C.

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-IL-25 o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-25 humana y que bloquea la señalización de IL-25 humana en células modificadas para expresar un receptor de IL-25 (IL-17RA/IL-17RB) con un IC50 de menos de alrededor de 720 pM.

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-IL-25 o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-25 humana y que bloquea la señalización de IL-25 humana en células modificadas para expresar un receptor de IL-25 (IL-17RA/IL-17RB) con un IC50 de menos de alrededor de 500 pM.

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-IL-25 o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-25 humana y que bloquea la señalización de IL-25 humana en células modificadas para expresar un receptor de IL-25 (IL-17RA/IL-17RB) con un IC50 de menos de alrededor de 100 pM.

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-IL-25 o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-25 humana y que bloquea la señalización de IL-25 humana en PBMCs humano con un IC50 de menos de alrededor de 2,0 nM.

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-IL-25 o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-25 humana y que bloquea la señalización de IL-25 humana en PBMCs humano con un IC50 de menos de alrededor de 700 pM.

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-IL-25 o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-25 humana y que bloquea la señalización de IL-25 humana en PBMCs humano con un IC50 en el rango desde alrededor de 30 pM hasta alrededor de 150 pM.

Los anticuerpos de la invención pueden ser de longitud completa (por ejemplo, un anticuerpo IgG1 o IgG4) o puede comprender sólo una porción de antígenos que se unen (por ejemplo, un Fab, F(ab')₂ o fragmento scFv), y estar modificadas para afectar a la funcionalidad, p. ej., para eliminar las funciones efectoras residuales (Reddy y cols., 2000, J. Immunol. 164:1925).

Anticuerpos anti-IL-25 ejemplares de la presente invención se enlistan en las Tablas 1 y 2 en este documento. Tabla 1 establece la secuencia de aminoácidos identificadores de las regiones variables de cadena pesada (HCVRs), regiones variables de cadena liviana (LCVRs), regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3), regiones determinantes de complementariedad de cadena liviana (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) de los anticuerpos anti-IL-25 ejemplar.

Tabla 2 establece la secuencia de ácido nucleico identificadores de los HCVRs, LCVRs, HCDR1, HCDR2; HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de los anticuerpos anti-IL-25 ejemplar.

La presente invención proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a IL-25, que comprende un HCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionado en cualquiera de los hcvr las secuencias de aminoácidos que se enumeran en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar a éstas que tengan al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos el 98% o 99% como mínimo valor patrimonial identidad secuencia.

La presente invención también proporciona los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a IL-25, que comprenden un LCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionado desde cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCVR enlistadas en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar de las mismas que tengan al menos un 90%, al menos un 95%, al menos el 98% o 99% de identidad de secuencia con respecto a ellas.

La presente invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que se unen específicamente a IL-25, que comprenden un HCVR y un par de secuencia de aminoácidos LCVR (HCVR/LCVR) que comprenden cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR que se enlistan en Tabla 1 que se empareja con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCVR que se enlistan en la Tabla 1. De acuerdo a ciertas realizaciones, la presente invención proporciona

anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprende un par de secuencia de aminoácidos HCVR/LCVR contenida dentro de cualquiera de los anticuerpos anti-IL-25 ejemplares indicados en la Tabla 1.

Un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígenos del mismo que se une específicamente a interleuquina-25 (IL-25) humana, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos de los mismos comprende: (a) Las regiones determinantes de complementariedad (TDC) de una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende una secuencia de aminoácidos como las establecidas en la Tabla 1; y (b) La CDRs de una región variable de la cadena ligera (LCVR) que comprende una secuencia de aminoácidos como las establecidas en la Tabla 1.

En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-25 comprende: (a) Los CDRs de una HCVR que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionado desde el grupo que consiste de SEC ID N°s: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242 y 258; y b) Los CDRs de una LCVR que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionado desde el grupo que consiste de SEC ID N°s: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250 y 266.

En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-25 comprende: (a) Los CDRs de una HCVR que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionado desde el grupo que consiste de SEC ID N°s: 98, 114, 130 y 178; y b) Los CDRs de una LCVR que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionado desde el grupo que consiste de SEC ID N°s: 106, 122, 138 y 186.

En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-25 comprende una secuencia de aminoácidos de HCVR seleccionado desde el grupo que consiste de SEC ID N°s: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242 y 258.

En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-25 comprende una secuencia de aminoácidos de LCVR seleccionado desde el grupo que consiste de SEC ID N°s: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250 y 266.

En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-25 comprende una secuencia de aminoácidos de HCVR seleccionado desde el grupo que consiste de SEC ID N°s: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242 y 258; y una secuencia de aminoácidos de LCVR seleccionado desde el grupo que consiste de SEC ID N°s: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250 y 266.

En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-25 comprende: los CDRs de un par de secuencia de aminoácidos HCVR/LCVR seleccionado desde el grupo que consiste de las SEC ID N°s: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90,

98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250 y 258/266.

En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-25 comprende: los CDRs de un par de secuencia de aminoácidos HCVR/LCVR seleccionado desde el grupo que consiste de las SEC ID N°s: 98/106; 114/122; 130/138; y 178/186. En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-25 comprende un par de secuencia de aminoácidos HCVR/LCVR seleccionado desde el grupo que consiste de las SEC ID N°s: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250 y 258/266.

En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-25 comprende un par de secuencia de aminoácidos HCVR/LCVR seleccionado desde el grupo que consiste de las SEC ID N°s: 98/106; 114/122; 130/138; y 178/186.

La presente invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a IL-25, que comprenden una cadena pesada CDR1 (HCDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionado desde cualquiera de las las secuencias de aminoácidos HCDR1 enlistadas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar de los mismos que tengan al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos 99% de identidad de secuencia de ellas.

La presente invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a IL-25, que comprende una cadena pesada CDR2 (HCDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionado desde cualquiera de las las secuencias de aminoácidos HCDR2 enlistadas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar de las mismas que tengan al menos un 90%, al menos un 95%, al menos el 98% o al menos 99% de identidad de secuencia de ellas.

La presente invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a IL-25, que comprende una cadena pesada CDR3 (HCDR3) que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada desde cualquiera de las las secuencias de aminoácidos HCDR3 enlistadas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar a las mismas que tengan al menos un 90%, al menos un 95%, al menos el 98% o 99% de identidad de secuencia de ellas.

La presente invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a IL-25, que comprende una cadena liviana CDR1 (LCDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionado desde cualquiera de las las secuencias de aminoácidos LCDR1 enlistadas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar de las mismas que tengan al menos un 90 %, al menos un 95%, al menos el 98% o 99% de identidad de secuencia de ellas.

La presente invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a IL-25, que comprende de una cadena liviana CDR2 (LCDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionado desde cualquiera de las las secuencias de aminoácidos LCDR2 enlistadas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar de las mismas que tengan al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos el 98% o 99% de identidad de secuencia de ellas.

La presente invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismas que se unen específicamente a IL-25, que comprenden una cadena liviana CDR3 (LCDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionado desde cualquiera de las las secuencias de aminoácidos LCDR3 enlistadas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar de las mismas que tengan al menos un 90%, al menos un 95%, al menos el 98% o 99% de identidad de secuencia de ellas.

La presente invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que se unen específicamente a IL-25, que comprende un par de secuencia de aminoácidos HCDR3 y uno de LCDR3 (HCDR3/LCDR3) que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCDR3 enlistadas en la Tabla 1 emparejadas con cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCDR3 enlistadas en la Tabla 1. De acuerdo a ciertas realizaciones, la presente invención proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden un par de secuencia de aminoácidos HCDR3/LCDR3 contenida dentro de cualquiera de los anticuerpos anti-IL-25 ejemplares enlistados en la Tabla 1. En ciertas realizaciones, el par de secuencia de aminoácidos HCDR3/LCDR3 está seleccionado desde el grupo que consiste de: 104/112; 120/128; 136/144; y 184/192.

La presente invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que se unen específicamente a IL-25, que comprende de un conjunto de seis CDRs (es decir, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3) contenida dentro de cualquiera de los anticuerpos anti-IL-25 ejemplares enlistados en la Tabla 1. En ciertas realizaciones, el conjunto de secuencia de aminoácidos HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3 se selecciona desde el grupo que consiste de: (a) SEC ID N°s: 100, 102, 104, 108, 110, 112; (b) SEC ID N°s: 116, 118, 120, 124, 126, 128; (c) SEC ID N°s: 132, 134, 136, 140, 142, 144; y (d) SEC ID N°s: 180, 182, 184, 188, 190, 192.

En una realización relacionada, la presente invención proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a IL-25, que comprende un conjunto de seis CDR (es decir, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3) contenidos dentro de un par de secuencia de aminoácidos HCVR/LCVR tal y como se define en cualquiera de los anticuerpos anti-IL-25 ejemplares enlistados en la Tabla 1. Por ejemplo, la presente invención Incluye anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a IL-25, que comprenden el conjunto de secuencias de aminoácidos HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3 contenidos dentro de un par de secuencia de aminoácidos HCVR/LCVR seleccionado desde el grupo que consiste en: 98/106; 114/122; 130/138; y 178/186. Los métodos y técnicas para identificar los CDRs dentro de las secuencias de aminoácidos HCVR y LCVR son bien conocidos en el

arte y que pueden ser usadas para identificar CDRs dentro de las secuencias de aminoácidos HCVR y/o LCVR especificadas divulgadas aquí. Convenciones ejemplares que pueden ser usadas para identificar los límites de CDRs incluyen, por ejemplo, la definición de Kabat, la definición de Chothia, y la definición AbM. En términos generales, la definición de Kabat se basa en la variabilidad de secuencia, la definición de Chothia se basa en la ubicación de regiones de bucle estructurales, y la definición AbM es un compromiso entre los enfoques de Kabat y Chothia. Véase, por ejemplo, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani y cols., J. mol. Biol. 273:927 (1997); y Martin y cols.; Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86:9268 (1989). Las bases de datos públicas también están disponibles para identificar las secuencias CDR dentro de un anticuerpo.

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-25 que comprende:

- (a) Un dominio HCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionado desde el grupo consistente de las SEC ID N°s: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244 y 260;
- (b) Un dominio HCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionado desde el grupo consistente de las SEC ID N°s: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246 y 262;
- (c) Un dominio HCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionado desde el grupo consistente de las SEC ID N°s: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248 y 264;
- (d) Un dominio LCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionado desde el grupo consistente de las SEC ID N°s: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252 y 268;
- (e) Un dominio LCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionado desde el grupo consistente de las SEC ID N°s: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254 y 270; y
- (f) Un dominio LCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionado desde el grupo consistente de las SEC ID N°s: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256 y 272.

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-25 que comprende:

- (a) Un dominio HCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionado desde el grupo consistente de las SEC ID N°s: 100, 116, 132 y 180;

- (b) Un dominio HCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionado desde el grupo consistente de las SEC ID N°s: 102, 118, 134 y 182;
- (c) Un dominio HCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionado desde el grupo consistente de las SEC ID N°s: 104, 120, 136 y 184;
- (d) Un dominio LCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionado desde el grupo consistente de las SEC ID N°s: 108, 124, 140 y 188;
- (e) Un dominio LCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionado desde el grupo consistente de las SEC ID N°s: 110, 126, 142 y 190; y
- (f) Un dominio LCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionado desde el grupo consistente de las SEC ID N°s: 112, 128, 144, y 192.

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un conjunto de seis CDRs seleccionado desde el grupo consistente de: (a) SEC ID N°s: 100, 102, 104, 108, 110, 112; (b) SEC ID N°s: 116, 118, 120, 124, 126, 128; (c) SEC ID N°s: 132, 134, 136, 140, 142, 144; y (d) SEC ID N°s: 180, 182, 184, 188, 190, 192.

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a interleuquina-25 (IL-25) humana, donde el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo compete por unirse a IL-25 humana con un anticuerpo de referencia que comprende un par de secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada / región variable de la cadena liviana (HCVR/LCVR) de acuerdo a lo establecido en Tabla 1. El anticuerpo de referencia puede comprender un par de secuencia de aminoácidos seleccionado desde el grupo consistente de las SEC ID N°s: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250 y 258/266.

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a interleuquina-25 (IL-25) humana, donde el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo se une al mismo epítipo en IL-25 humana como un anticuerpo de referencia que comprende un par de secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada / región variable de la cadena liviana (HCVR/LCVR) de acuerdo a lo establecido en Tabla 1. El anticuerpo de referencia puede comprender un par de secuencia de aminoácidos HCVR/LCVR seleccionado desde el grupo constituido por SEC ID N°s: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250 y 258/266.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona moléculas de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos anti-IL-25 o porciones de los mismos. Por ejemplo, la presente invención proporciona moléculas de ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCVR enlistadas en la Tabla 1; en ciertas realizaciones la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada desde cualquiera de las secuencias de ácido nucleico HCVR enlistadas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de las mismas que

tengan al menos un 90%, al menos un 95%, al menos el 98% o 99% de identidad de secuencia de ellas.

La presente invención también proporciona moléculas de ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCVR que se enlistan en la Tabla 1; en ciertas realizaciones la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada desde cualquiera de las secuencias de ácido nucleico LCVR que se enlistan en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de las mismas que tengan al menos un 90%, al menos un 95%, al menos el 98% o 99% de identidad de secuencia de ellas.

La presente invención también proporciona moléculas de ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCDR1 que se enlistan en la Tabla 1; en ciertas realizaciones la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada desde cualquiera de las secuencias de ácido nucleico HCDR1 que se enlistan en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de las mismas que tengan al menos un 90%, al menos un 95%, al menos el 98% o 99% de identidad de secuencia de ellas.

La presente invención también proporciona moléculas de ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCDR2 que se enlistan en la Tabla 1; en ciertas realizaciones la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada desde cualquiera de las secuencias de ácido nucleico HCDR2 que se enlistan en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de las mismas que tengan al menos un 90%, al menos un 95%, al menos el 98% o 99% de identidad de secuencia de ellas.

La presente invención también proporciona moléculas de ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCDR3 que se enlistan en la Tabla 1; en ciertas realizaciones la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada desde cualquiera de las secuencias de ácido nucleico HCDR3 que se enlistan en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de las mismas que tengan al menos un 90%, al menos un 95%, al menos el 98% o 99% de identidad de secuencia de ellas.

La presente invención también proporciona moléculas de ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCDR1 que se enlistan en la Tabla 1; en ciertas realizaciones la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada desde cualquiera de las secuencias de ácido nucleico LCDR1 que se enlistan en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de las mismas que tengan al menos un 90%, al menos un 95%, al menos el 98% o 99% de identidad de secuencia de ellas.

La presente invención también proporciona moléculas de ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCDR2 que se enlistan en la Tabla 1; en ciertas realizaciones la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada desde cualquiera de las secuencias de ácido nucleico LCDR2 que se enlistan en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de las mismas que tengan al menos un 90%, al menos un 95%, al menos el 98% o 99% de identidad de secuencia de ellas.

La presente invención también proporciona moléculas de ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCDR3 que se enlistan en la Tabla 1; en ciertas realizaciones la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada desde cualquiera de las secuencias de ácido nucleico LCDR3 que se enlistan en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de las mismas que tengan al menos un 90%, al menos un 95%, al menos el 98% o 99% de identidad de secuencia de ellas.

La presente invención también proporciona moléculas de ácidos nucleicos que codifican una HCVR, donde la HCVR comprende un conjunto de tres CDRs (es decir, HCDR1, HCDR2, HCDR3), donde el conjunto de secuencia de aminoácidos de HCDR1, HCDR2, HCDR3 es tal como se define por cualquiera de los anticuerpos anti-IL-25 ejemplares enlistados en la Tabla 1.

La presente invención también proporciona moléculas de ácidos nucleicos que codifican una LCVR, donde la LCVR comprende un conjunto de tres CDRs (es decir, LCDR1, LCDR2, LCDR3), donde el conjunto de secuencia de aminoácidos de LCDR1, LCDR2, LCDR3 es tal como se define por cualquiera de los anticuerpos anti-IL-25 ejemplares enlistados en la Tabla 1.

La presente invención también proporciona moléculas de ácidos nucleicos que codifican tanto una HCVR como una LCVR, donde la HCVR comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCVR enlistadas en la Tabla 1, y donde la LCVR comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCVR que se enlistan en la Tabla 1. En ciertas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada desde cualquiera de las las secuencias de ácido nucleico HCVR que se enlistan en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de las mismas que tengan al menos un 90%, al menos un 95%, al menos el 98% o al menos 99% de identidad de secuencia de ellas, y una secuencia polinucleotídica seleccionada desde cualquiera de las secuencias de ácido nucleico LCVR que se enlistan en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de las mismas que tengan al menos un 90%, al menos un 95%, al menos el 98% o 99% de identidad de secuencia de ellas. En ciertas realizaciones de acuerdo a este aspecto de la invención, la molécula de ácido nucleico codifica una HCVR y LCVR, donde la HCVR y LCVR son ambas derivadas desde el mismo anticuerpo anti-IL-25 que se enlista en la Tabla 1.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona vectores de expresión recombinante capaces de expresar un polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada/liviana de un anticuerpo anti- IL-25. Por ejemplo, la presente invención incluye vectores de expresión recombinante que comprende cualquiera de las moléculas de ácidos nucleicos mencionadas anteriormente, es decir, las moléculas de ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las secuencias HCVR, LCVR, y/o CDR como se establece en la Tabla 1. También incluido dentro del alcance de la presente invención están las células huésped en el que dichos vectores han sido introducidos, así como también métodos para producir los anticuerpos o porciones de los mismos cultivando las células huésped bajo condiciones que permiten la producción de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, y recuperar los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos así producidos.

La presente invención incluye anticuerpos anti-IL-25 que tienen un patrón glicosilación modificado. En algunas realizaciones, modificaciones para eliminar los sitios de glicosilación no deseable pueden ser de utilidad, o un anticuerpo que carece de un grupo funcional fucosa presente en la cadena oligosacárida, por ejemplo, para aumentar la función de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) (ver Shield y cols. (2002) jbc 277:26733). En otras aplicaciones, se puede realizar la modificación de galactosilación con el fin de modificar la citotoxicidad dependiente complementaria (CDC).

En un cuarto aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo de la invención, o un fragmento de unión antígeno del mismo, que se une específicamente a IL-25 y un portador farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto relacionado, la invención caracteriza una composición, que es una combinación de un anticuerpo anti-IL-25 y un segundo agente terapéutico. En una realización, el segundo agente terapéutico es cualquier agente que sea ventajosamente combinado con un anticuerpo anti-IL-25.

El segundo agente terapéutico puede ser útil para aliviar la enfermedad o trastorno inflamatorio, o al menos un síntoma de la enfermedad o trastorno inflamatorio.

En ciertas realizaciones, el segundo agente terapéutico puede ser seleccionado desde el grupo constituido por antiinflamatorio no esteroideo (NSAID), un esteroide, un corticoesteroide (inhulado o tópico), un inmunosupresor (p. ej. ciclofosfamida), un agente anticolinérgico (p. ej. tiotropio), un agente muscarínico (p. ej. glicopirronio), un inhibidor de fosfodiesterasa (p. ej., teofilina, roflumilast, cilomilast), un bloqueador beta, ciclosporina, tacrolimus pimecrolimus, azatioprina, metotrexato, cromolín sódico, un inhibidor de proteinasa, un dilatador bronquial, un beta-2-agonista, un antihistamínico, epinefrina, un descongestionante, un inhibidor de leucotrienos, un inhibidor de mastocitos, un linfopoyetina estromal tímica (TSLP), un antagonista, antagonistas de TNF, un antagonista de IgE, un antagonista de IL-1, un antagonista de IL-4 o IL-4R, un antagonista de IL-13 o IL-13R, un antagonista doble de IL-4/IL-13, un antagonista de IL-5, un antagonista de IL-6 o IL-6R, un antagonista de IL-8, un antagonista de IL-9, un antagonista de IL-12/23, un antagonista de IL-22, un antagonista IL-17, un antagonista IL-31, un antagonista IL-33, un antagonista de Proteína Linfopoyetina Estromal Tímica (antagonista TSLP), un inhibidor PDE4 oral y un anticuerpo diferente a IL-25.

En un quinto aspecto, la invención proporciona métodos terapéuticos para tratar una enfermedad o trastorno asociado con actividad o expresión de IL-25, o al menos un síntoma asociado a la enfermedad o trastorno, usando un anticuerpo anti-IL-25 o una porción que se une a antígeno de un anticuerpo de la invención. Los métodos terapéuticos de acuerdo con este aspecto de la invención comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos de un anticuerpo de la invención a un sujeto con necesidad del mismo. El trastorno tratado es cualquier enfermedad o condición que es mejorada, inhibida o prevenida dirigiéndose a IL-25 y/o mediante la inhibición de señalización celular mediada por IL-25. En ciertas realizaciones, la enfermedad o trastorno a ser tratada con un anticuerpo anti-IL-25 de la invención, o una porción que se une a

antígeno del mismo, puede seleccionarse desde el grupo constituido por asma, alergia, rinitis alérgica, inflamación alérgica de las vías respiratorias, enfermedades autoinmunes, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), neumonía eosinofílica, esofagitis eosinofílica, síndrome hipereosinofílico, enfermedad de injerto contra huésped, dermatitis atópica (AD), urticaria, incluyendo urticaria idiopática crónica, psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), artritis, uveítis, enfermedad cardiovascular, dolor, esclerosis múltiple, lupus, vasculitis, y granulomatosis eosinofílica con poliangitis (EGPA), también conocido como síndrome de Churg-Strauss).

En una realización, el asma que puede ser tratado por un anticuerpo de la invención, o un fragmento de unión a antígenos del mismo puede seleccionarse desde el grupo constituido por asma alérgica, asma no alérgica, asma refractaria severa, exacerbaciones de asma, asma inducido por virus, o exacerbaciones de asma inducidas por virus, asma resistente a esteroides, asma sensible a esteroides, asma eosinofílica o asma no eosinofílica y otros trastornos relacionados caracterizados por inflamación de las vías respiratorias o hiperreactividad de las vías aéreas (AHR).

En una realización, la COPD que puede ser tratada por un anticuerpo de la invención, o un fragmento de unión a antígenos del mismo, se asocia en parte con, o causada por, el humo de cigarrillos, la contaminación del aire, productos químicos ocupacionales, alergia o hiperreactividad de las vías aéreas.

En una realización, la AD que puede ser tratada por un anticuerpo de la invención, o un fragmento de unión a antígenos del mismo se asocia en parte con, o causado por, una disfunción de la barrera epidérmica, alergia o exposición a la radiación.

Una alergia que puede ser tratada por un anticuerpo de la invención, o un fragmento de unión a antígenos del mismo puede deberse a ciertos alimentos, polen, moho, ácaros del polvo, animales, caspa animal.

En una realización, la IBD que puede ser tratada por un anticuerpo de la invención, o un fragmento de unión a antígenos del mismo puede seleccionarse desde el grupo constituido por colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis isquémica, colitis por desviación, síndrome de Behcet, colitis infecciosa, colitis indeterminada, y otros trastornos caracterizados por la inflamación de la capa mucosa del intestino grueso o colon.

En una realización, la artritis que puede ser tratada por un anticuerpo de la invención, o un fragmento de unión a antígenos del mismo puede seleccionarse desde el grupo constituido por la osteoartritis (OA), artritis reumatoide y la artritis psoriásica.

Otras realizaciones se harán aparentes desde una revisión de la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Competencia cruzada entre anticuerpos anti-IL-25 para IL-25 humana.

Descripción detallada

Antes de que la presente invención sea descrita, es preciso comprender que esta invención no se limita a métodos particulares y condiciones experimentales descritas, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar. También es preciso comprender que la terminología utilizada en este documento es con el propósito de solamente describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitante, ya que el alcance de la presente invención se limitará solamente por las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado como se entienden comúnmente por un experto en el arte al cual este invento pertenece. Tal como se usó aquí, el término "alrededor de", cuando es usado en referencia a un valor numérico descrito, significa que el valor puede variar desde el valor descrito hasta no más del 1%. Por ejemplo, tal y como se utiliza en este documento, la expresión "alrededor de 100" incluye 99 y 101 y todos los valores entremedio (p. ej., 99,1 , 99,2 , 99,3 , 99,4 , etc.).

Aunque cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en este documento pueden utilizarse en la práctica o las pruebas de la presente invención, los métodos preferidos y materiales son ahora descritos. Todas las patentes, aplicaciones y publicaciones no relacionadas a patentes mencionadas en esta memoria descriptiva se incorporan este documento como referencia en su totalidad.

Definiciones

La expresión "la interleuquina-25 ", "IL-25," y similares, también conocida como "IL-17E", se refiere a las citoquinas humana (a menos que sea designado como perteneciente a otra especie) que comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en los residuos de aminoácidos 33 a 177 del número de acceso NP 073626,1 . IL-25 humana que contiene una etiqueta myc-myc-hexahistidina se muestra como SEC ID N°: 273 (con los residuos de aminoácidos 1-145 siendo IL-25 humana sin la secuencia de señal y los residuos de aminoácidos 146-173 la etiqueta myc-myc-hexahistidina). Proteínas IL-25 adicionales se describen en este documento, incluyendo IL-25 de mono (aminoácidos 33-176 de Núm. de acceso XP 001107906,2) que contiene una etiqueta myc-myc-hexahistidina, que se muestra como SEC ID N°: 274 (con los residuos de aminoácidos 1-144 siendo IL-25 M. fascicularis sin la secuencia de señal y los residuos de aminoácidos 146-173 la etiqueta myc-myc-hexahistidina); IL-25 de ratón (aminoácidos 17-169 de número de acceso NP 542767,1), que se muestra como SEC ID N°: 275 (con los residuos de aminoácidos 1-153 siendo IL-25 de ratón y residuos de aminoácidos 154-181 la etiqueta myc-myc-hexahistidina); IL-25 de rata (residuos de aminoácidos 17-169 de número de acceso NP 001178936,1) que contiene una etiqueta myc-myc-hexahistidina, que se muestra como SEC ID N°: 276 (con los residuos de aminoácidos 1-153 siendo IL-25 de rata y residuos de aminoácidos 154-181 la etiqueta myc-myc-hexahistidina).

Todas las referencias a las proteínas, polipéptidos y los fragmentos de proteínas en este documento pretenden referirse a la versión humana de las respectivas proteínas, polipéptido o fragmento de proteína a menos que sea explícitamente especificado como una especie no humana. Así, la expresión "IL-25" significa IL-25 humana a no ser que se especifique como de una especie no humana, p. ej., "IL-25 de mono", "IL-25 de ratón", "IL-25 de rata", etc.

Tal y como se utiliza en este documento, la expresión "anticuerpo anti-IL-25" incluye tanto los anticuerpos monovalentes con una única especificidad, así como también a los anticuerpos biespecíficos que comprenden un primer brazo que se une a IL-25 y un segundo brazo que se une a una segundo (objetivo) antígeno, donde el brazo anti-IL-25 comprende cualquiera de las secuencias HCVR/LCVR o CDR según lo establecido en la Tabla 1 en este documento. La expresión "anticuerpo anti-IL-25" también incluye un anticuerpo conjugado con un fármaco (ADCs) que comprende un anticuerpo anti-IL-25 o una porción que se une a antígeno del mismo conjugado con una droga o una toxina (es decir, agente citotóxico). La expresión "anti-IL-25 anticuerpo" también incluye un anticuerpo conjugado con un radionúclido (ARCs) que comprende un anticuerpo anti-IL-25 o porción que se une a antígeno del mismo conjugado con un radionúclido.

El término "anticuerpo anti-IL-25", tal y como se utiliza en este documento, significa que cualquier molécula que se una a antígeno o complejo molecular que comprende al menos una región determinante de complementariedad (CDR) que se une específicamente a o interactúa con IL-25 o una porción de IL-25. El término "anticuerpo" incluye las moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L) interconectados mediante enlaces de disulfuro, así como multímeros de las mismas (p. ej., IgM).

Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviado en este documento como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada consta de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena liviana comprende una región variable de cadena ligera (abreviado en este documento como LCVR o VL) y una región constante de cadena liviana. La región constante de cadena liviana consta de un dominio (CL1). Las regiones VH y VL pueden ser además subdivididas en regiones de hiper variabilidad, las que denominan regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que son más conservadas, lo que se denomina regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDRs y cuatro FRs, dispuestos desde amino-terminal a carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En diferentes realizaciones de la invención, las FRs del anticuerpo anti-IL-25 (o porción que se une a antígeno del mismo) pueden ser idénticas a las secuencias de la línea germinal humana, o pueden ser modificadas naturalmente o artificialmente.

Una secuencia de consenso de aminoácidos puede ser definida en base a análisis de lado a lado de dos o más CDRs. El término "anticuerpo", tal y como se utiliza en este documento, también incluye fragmentos de unión a antígeno de moléculas de anticuerpo de longitud completa. Los términos "porción que se une a antígeno" de un anticuerpo, "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo, y similares, tal y como se utiliza en este documento, incluyen cualquier polipéptido o glicoproteína enzimáticamente obtenibles, sintético, o genéticamente modificado, que se une específicamente un antígeno para formar un complejo. Fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo pueden ser derivados, p.ej., desde moléculas de anticuerpo completas usando cualesquiera de las técnicas estándar adecuadas, como digestión proteolítica o técnicas de ingeniería genética recombinantes involucrando la manipulación y la expresión de DNA que codifican dominios variables y opcionalmente constantes del anticuerpo. Dicho DNA, es conocido y/o fácilmente disponible desde, p. ej., fuentes comerciales, bibliotecas de DNA (incluyendo, p. ej.,

bibliotecas de anticuerpos fago), o puede ser sintetizada. El DNA puede ser secuenciado y manipulado químicamente o mediante técnicas de biología molecular, por ejemplo, para organizar una o más variables y/o dominios constantes en una configuración adecuada, o para introducir codones, crear residuos de cisteína, modificar, agregar o eliminar aminoácidos, etc.

Ejemplos no limitantes de fragmentos que se unen a antígeno incluyen: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos F(ab')₂; (iii) fragmentos Fd; (IV) fragmentos Fv; (V) moléculas Fv de cadena única (scFv); (VI) fragmentos dAb ; y (VII) unidades de reconocimiento mínimo que consta de los residuos de aminoácidos que imitan la región hiper variable de un anticuerpo (p. ej., una región determinante de complementariedad aislada (CDR) tal como un péptido CDR3), o un péptido FR3-CDR3-FR4 limitado.

Otras moléculas modificadas, tal como anticuerpos de dominio específico, anticuerpos de un único dominio, anticuerpos de dominio eliminado, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de CDR injertada, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, nanocuerpos (p. ej. nanocuerpos monovalentes, nanocuerpos bivalentes, etc.), productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIPs), y dominios IgNAR variable de tiburón, son también abarcados dentro de la expresión "fragmento de unión a antígeno", tal y como se utiliza en este documento.

Un fragmento de unión a antígenos de un anticuerpo comprenderá típicamente al menos un dominio variable. El dominio variable puede ser de cualquier tamaño o composición aminoácida y por lo general comprenderá al menos un CDR que está adyacente a o en el marco con una o más secuencias de marco. En fragmentos de unión a antígeno que tienen un dominio VH asociado con un dominio VL, los dominios VH y VL pueden situarse en relación con otro en cualquier disposición adecuada. Por ejemplo, la región variable puede ser dimérica y contener dímeros VH-VH, VH-VL o VL-VL .

Alternativamente, el fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener un dominio VH o VL monomérico.

En ciertas realizaciones, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener al menos un dominio variable unidas covalentemente a al menos un dominio constante. Configuraciones ejemplares, no limitantes de dominios variables y constantes se pueden encontrar dentro de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención incluye: (i) VH-CH1; (ii) VH-CH2; (iii) VH-CH3; (iv) VH-CH1-CH2 (v) VH-CH1-CH2-CH3; (vi) VH-CH2-CH3; (vii) VH-CL1; (viii) VL-CH1; (ix) VL-CH2; (x) VL-CH3; (xi) VL-CH1-CH2; (xii) VL-CH1-CH2-CH3; (xiii) VL-CH2-CH3; y (xiv) VL-CL.

En cualquier configuración de los dominios variable y constante, incluyendo cualquiera de las configuraciones ejemplares indicadas anteriormente, los dominios variable y constante pueden estar ya sea vinculado directamente la una con la otra o pueden estar vinculados por una región conectora o bisagra completa o parcial. Una región bisagra puede constar de al menos 2 (por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 40, 60 o más) aminoácidos que pueden resultar en un enlace flexible o semi flexible entre los dominios variable y/o constante adyacente in una única molécula de polipéptido. Más aún, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención puede

comprender un homo-dímero o hetero-dímero (u otro multímero) de cualquiera de los dominios variables y constantes enlistados anteriormente en asociación no covalente uno con el otro y/o con uno o más dominios VH o VL monoméricos (p. ej., por enlace(s) disulfuro).

Como con moléculas de anticuerpo completas, fragmentos de unión a antígeno pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos (p. ej., bi específico). Un fragmento de unión a antígeno multiespecífico de un anticuerpo comprenderá típicamente al menos dos dominios variables diferentes, donde cada dominio variable es capaz de unirse específicamente a un antígeno separado o a un epítipo en el mismo antígeno. Cualquier formato anticuerpo multiespecífico, incluyendo formatos de anticuerpo bi específico ejemplar divulgados en este documento, se puede adaptar para su uso en el contexto de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención mediante técnicas de rutina disponibles en el arte.

Los anticuerpos de la presente invención puede funcionar mediante el bloqueo o de lo contrario interferir con la interacción entre IL-25 y uno o más de su(s) componente(s) receptor(es).

Alternativamente, los anticuerpos de la invención pueden inhibir la señalización mediada por IL-25 a través de un mecanismo que no implica bloquear la interacción de IL-25 con su receptor. En aún otras realizaciones, los anticuerpos de la presente invención pueden funcionar mediante citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC). "Citotoxicidad dependiente del complemento" (CDC) se refiere a la lisis de las células que expresan el antígeno por un anticuerpo de la invención en presencia del complemento. "Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" (ADCC) hace referencia a una reacción mediada por células en la cual células citotóxicas no específicas que expresan los receptores Fc (FcRs) (p. ej., células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen un anticuerpo unido en una celda objetivo y, por tanto, dar lugar a la lisis de la célula objetivo. CDC y ADCC pueden medirse mediante ensayos que son bien conocidos y están disponibles en el arte. (véase, p. ej., Patente de EE.UU. N°s 5.500.362 y 5.821.337, y Clynes y cols. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.) 95:652-656). La región constante de un anticuerpo es importante en la capacidad de un anticuerpo para fijar complemento y mediar citotoxicidad dependiente de células. Así, el isótopo de un anticuerpo puede ser seleccionado en función de si es deseable para el anticuerpo mediar citotoxicidad. El término "anticuerpo humano", tal y como se utiliza en este documento, pretende incluir anticuerpos humanos de ocurrencia no natural. El término incluye anticuerpos que son producidos recombinantemente en un mamífero no humano, o en células de un mamífero no humano. El término no pretende incluir los anticuerpos aislados de o generados en un sujeto humano.

Los anticuerpos de la invención pueden, en algunas realizaciones, ser recombinante y/o anticuerpos humanos de ocurrencia no natural. El término "anticuerpo humano recombinante", tal y como se utiliza en este documento, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que son preparados, expresados, creados o aislados mediante medios recombinantes, tal como los anticuerpos expresados por medio de un vector de expresión recombinante transfectado dentro de una célula huésped (descrito más adelante), anticuerpos aislados desde una biblioteca de anticuerpo humano

combinatorial, recombinante (descrito más adelante), anticuerpos aislados desde un animal (p. ej., un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véase p. ej., Taylor y cols. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implica empalme de las secuencias de genes de inmunoglobulina humana a otras secuencias de DNA. En ciertas realizaciones, dichos anticuerpos humanos recombinantes, están sujetos a mutagénesis in vitro (o, cuando un animal transgénico para secuencias Ig humanas es usado, mutagénesis somática in vivo) y así, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, mientras estén relacionadas con secuencias VH y VL germinal humanas, no pueden existir naturalmente dentro del repertorio de anticuerpo de línea germinal in vivo.

Anticuerpos humanos pueden existir en dos formas que están asociadas con heterogeneidad de bisagra. En una forma, una molécula de inmunoglobulina comprende una estructura estable de cuatro cadenas de aproximadamente 150-160 kDa en la que los dímeros se mantienen unidos por una intercadena de enlace de disulfuro de cadena pesada. En una segunda forma, los dímeros no están enlazados mediante enlaces de disulfuro de la inter-cadena y se forma una molécula de alrededor de 75-80 kDa compuesta de una cadena pesada y liviana acoplada covalentemente (medio-anticuerpo). Estas formas han sido extremadamente difíciles de separar, incluso tras la purificación por afinidad.

La frecuencia de aparición de la segunda forma en diversos isotipos IgG intactos es debido a, pero no limitado a, diferencias estructurales asociadas con el isotipo de región bisagra del anticuerpo. Una única sustitución de aminoácido en la región de bisagra de la bisagra IgG4 humana puede reducir significativamente la aparición de la segunda forma (Angal y cols. (1993) Molecular Immunology 30:105) a niveles observados típicamente usando una bisagra IgG1 humana. La presente invención abarca anticuerpos que tienen una o más mutaciones en la bisagra, región CH2 o CH3, el cual puede ser deseable, por ejemplo, en la producción, para mejorar el rendimiento de la forma del anticuerpo deseada.

El término "se une específicamente", o "se une de forma específica a", o similares, significa que un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos del mismo forma un complejo con un antígeno que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. Unión específica puede ser caracterizada por un constante de disociación de equilibrio de al menos alrededor de 1×10^{-6} M o menos (por ej., un KD más pequeño denota una unión más ajustada).

binding). Métodos para determinar si dos moléculas que se unen específicamente son bien conocidos en el arte e incluyen, por ejemplo, diálisis de equilibrio, resonancia de plasmones de superficie, y similares. Tal y como se describe en este documento, los anticuerpos han sido identificados mediante resonancia de plasmones de superficie, p. ej., BIACORE TM, el cual se une específicamente a IL-25. Más aún, anticuerpos multi específicos que se unen a la proteína IL-25 y uno o más antígenos adicionales o bi-específicos que se unen a dos regiones diferentes de IL-25 son, sin embargo, anticuerpos considerados que "se unen específicamente", tal y como se describe en este documento. Los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos aislados. Un "anticuerpo

aislado”, como es usado en este documento, significa un anticuerpo que ha sido identificado y separado y/o recuperado desde al menos un componente de su ambiente natural. Por ejemplo, un anticuerpo que ha sido separado o retirado desde al menos un componente de un organismo, o bien a partir de un tejido o célula en la que el anticuerpo existe naturalmente o que se produce naturalmente, es una "anticuerpo aislado" para los propósitos de la presente invención. Un anticuerpo aislado incluye también un anticuerpo in situ dentro de una célula recombinante. Anticuerpos aislados son anticuerpos que han sido sujetos a al menos una etapa de purificación o aislamiento. De acuerdo a ciertas realizaciones, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otros materiales y/o químicos celulares.

Los anticuerpos anti-IL-25 divulgados en este documento pueden comprender una o más sustituciones, inserciones y/o supresiones de aminoácidos en el marco y/o regiones CDR de los dominios variables de cadena pesada y liviana. Dichas mutaciones pueden ser fácilmente determinadas comparando las secuencias de aminoácidos divulgadas en este documento para secuencias disponibles desde, por ejemplo, base de datos de secuencias de anticuerpo públicas. Una vez obtenidos, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que contienen una o más mutaciones pueden ser fácilmente probadas para una o más propiedades deseadas tal como, especificidad de unión mejorada, afinidad de unión aumentada, propiedades biológicas agonísticas o antagonísticas mejoradas (según sea el caso), inmunogenicidad reducida, etc. Anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno obtenidos de esta manera general son abarcados dentro de la presente invención.

La presente invención incluye también anticuerpos anti-IL-25 que comprenden variantes de cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCVR, LCVR y/o CDR divulgadas en este documento que tienen una o más sustituciones conservadoras. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos anti-IL-25 que tienen secuencias de aminoácidos HCVR, LCVR y/o CDR con, por ej., 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o menos, etc. sustituciones de aminoácidos conservadoras relativas a cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCVR, LCVR y/o CDR, establecidas en la Tabla 1 de este documento.

El término “epítope” se refiere a un determinante antigénico que interactúa con un sitio de unión a antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocida como un paratope. Un único antígeno puede tener más de un epítope. Así, diferentes anticuerpos se pueden unir a diferentes áreas en un antígeno y pueden tener diferentes efectos biológicos. Epítopes pueden ser tanto conformacional o lineal. Un epítope conformacional es producido por aminoácidos yuxtapuestos espacialmente desde diferentes segmentos de la cadena polipeptídica lineal. Un epítope lineal es uno producido por residuos de aminoácidos adyacentes en una cadena polipeptídica. En cierta circunstancia, un epítope puede incluir restos de sacáridos, grupos fosforilo o grupos sulfonilo sobre el antígeno. El término “identidad sustancial” o “sustancialmente idéntica” cuando se refiere a un ácido nucleico o fragmento del mismo, indica que, cuando está óptimamente alineado con inserciones o supresiones nucleotídicas apropiadas con otro ácido nucleico (o su hebra complementaria), existe una identidad de secuencia nucleotídica de al menos alrededor de 96%, 97%, 98% o 99% de bases nucleotídicas, como se mide por cualquier algoritmo bien conocido de identidad de secuencia, tal como FASTA, BLAST o Gap, como se discute más adelante. Una molécula

de ácido nucleico que tiene identidad sustancial a una molécula de ácido nucleico de referencia puede, in ciertas instancias, codificar un polipéptido que tenga la misma o sustancialmente similar secuencia de aminoácidos como el polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de referencia.

Como se aplica a los polipéptidos, el término “semejanza sustancial” o “sustancialmente similar” significa que dos secuencias peptídicas, cuando están óptimamente alineadas, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando pesos de gap por defecto, comparten al menos un 95% de identidad de secuencia, incluso más preferentemente al menos 98% o 99% de identidad de secuencia. Preferentemente, posiciones de residuos que no son idénticas difieren por sustituciones de aminoácidos conservadoras. Una “sustitución de aminoácido conservadora” es una en que un residuo de aminoácido es sustituido por otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ej., carga o hidrofobicidad) En general, una sustitución de aminoácido conservadora no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En casos donde dos o más secuencias difieren de una a la otra mediante sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad de secuencia o grado de similitud puede ser ajustado hacia arriba para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Medios para hacer este ajuste son bien conocidos para aquellos expertos en el arte. Ver, por ejemplo, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, incorporado en este documento por referencia. Ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen las cadenas laterales con similares propiedades químicas incluyen (1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; (2) cadenas laterales alifático-hidroxilo: serina y treonina; (3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; (4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptofano; (5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina, histidina y; (6) cadenas laterales ácidas: aspartato y glutamato, y (7) cadenas laterales que contienen azufre son cisteína y metionina. Grupos de sustitución de aminoácidos conservadores preferentes son: valina-leucina- isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato, y asparagina-glutamina. Alternativamente, un reemplazo conservador es cualquier cambio que tiene un valor positivo en la matriz log-verosimilitud PAM250 divulgada en Gonnet y cols. (1992) *Science* 256: 1443-1445, en este documento incorporado por referencia. Un reemplazo “moderadamente conservador” es cualquier cambio que tiene un valor no negativo en la matriz log-verosimilitud PAM250.

Semejanza de secuencia para polipéptidos, que también es referido como identidad de secuencia, es típicamente medido usando un programa informático de análisis de secuencias. El programa informático de análisis de proteína hace coincidir secuencias similares usando medidas de semejanza asignadas a varias sustituciones, supresiones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones de aminoácido conservadoras. Por ejemplo, el programa informático GCG contiene programas tal como Gap y Bestfit, los cuales pueden ser usados con parámetros predeterminados para determinar homología de secuencia o identidad de secuencia entre polipéptidos relacionados cercanamente, tal como polipéptidos homólogos de diferentes especies u organismos o entre una proteína de tipo salvaje y una muteína de la misma. Ver, por ej., GCG Versión 6.1. Las secuencias polipeptídicas también pueden ser comparadas usando FASTA usando parámetros

predeterminados o recomendados, un programa en GCG Versión 6.1 . FASTA (p. ej., FASTA2 y FASTA3) proporciona alineamientos y porcentaje de identidad de secuencia de las regiones de la mejor superposición entre la consulta y búsqueda de secuencias (Pearson (2000) supra). Otro algoritmo preferente cuando se compara una secuencia de la invención a una base de datos que contiene una gran cantidad de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, especialmente BLASTP o TBLASTN, utilizando los parámetros predeterminados. Ver, por ej., Altschul y cols. (1990) J. mol. Biol. 215:403-410 y Altschul y cols. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389 - 402, cada uno en este documento incorporado por referencia.

Unión dependiente de pH

La presente invención incluye anticuerpos anti-IL-25 con características de unión dependientes de pH. Por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-25 de la presente invención puede exhibir una unión a IL-25 reducida en pH ácido en comparación con pH neutro. Alternativamente, los anticuerpos anti-IL-25 de la invención pueden exhibir una unión a IL-25 mejorada en pH ácido en comparación con pH neutro. La expresión "pH ácido" incluye los valores de pH inferior a alrededor de 6,2 , p. ej., aproximadamente 6,0, 5,95, 5,9, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0, o menos. En este documento, la expresión "pH neutro" significa un pH de alrededor de 7,0 hasta alrededor de 7,4. La expresión "pH neutro" incluye los valores de pH de alrededor de 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 y 7,4.

En ciertas instancias, "unión a IL-25 reducida en pH ácido en comparación con pH neutro" se expresa en términos de una proporción del valor de KD del anticuerpo que se une a IL-25 en pH ácido al valor de KD del anticuerpo que se une a IL-25 en pH neutro (o viceversa). Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo pueden considerarse que exhiben " unión a IL-25 reducida en pH ácido en comparación con pH neutro" para los propósitos de la presente invención si el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo muestra una relación de ID ácido/neutro de alrededor de 3,0 o superior. En ciertas realizaciones ejemplares, la relación de ID ácido/neutro para un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención puede ser de 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 100,0 o superior.

Anticuerpos con características de unión dependiente de pH se pueden obtener, p. ej., por la evaluación de una población de anticuerpos para una unión reducida (o mejorada) a un antígeno particular en pH ácido en comparación con pH neutro. Además, las modificaciones del dominio que se une a antígeno en el nivel de aminoácidos puede producir anticuerpos con características dependiente de pH. Por ejemplo, sustituyendo uno o más aminoácidos de un dominio que se une a antígeno (por ej., dentro de un CDR) con un residuo histidina, un anticuerpo con reducida unión a antígeno en pH ácido relativo a pH neutro puede ser obtenido.

Anticuerpos anti-IL-25 que comprenden variantes Fc

De acuerdo a ciertas realizaciones de la presente invención, se proporcionan anticuerpos anti-IL-25 los cuales comprenden un dominio Fc que comprende una o más mutaciones que mejora o

disminuye la unión del anticuerpo al receptor FcRn, por ej., en pH ácido en comparación con pH neutro. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos anti-IL-25 que comprende una mutación en la región CH2 o CH3 del dominio Fc, donde la(s) mutación(es) aumenta la afinidad del dominio Fc a FcRn en un ambiente ácido (por ej., en un endosoma donde rangos de pH desde alrededor de 5,5 hasta alrededor de 6,0). Dichas mutaciones pueden resultar en un aumento en la vida media en suero del anticuerpo cuando es administrado a un animal. Ejemplos no limitantes de dichas modificaciones de Fc incluyen, por ejemplo, una modificación en la posición 250 (p. ej., E o Q); 250 y 428 (p. ej., L o F); 252 (p. ej., L/Y/F/W o T), 254 (p. ej., S o T), y 256 (p. ej., S/R/Q/E/D o T); o una modificación en la posición 428 y/o 433 (p. ej., H/L/R/S/P/Q o K) y/o 434 (p. ej., H/F o Y); o una modificación en la posición 250 y/o 428; o una modificación en la posición 307 o 308 (p. ej., 308F, V308F), y 434. En una realización, la modificación comprende un 428L (p. ej., M428L) y modificación de 434S (por ej., N434S) ; un 428L, 259I (p. ej., V259I), y modificación de 308F (p. ej., V308F); una modificación de 433K (p. ej., H433K) y una modificación de 434 (p. ej., 434Y); una modificación de 252, 254, y 256 (p. ej., 252Y, 254T y 256E); una modificación de 250Q y 428L (p. ej., T250Q y M428L); y una modificación de 307 y/o 308 (p. ej., 308F o 308P).

Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos anti-IL-25 que comprenden de un dominio Fc que comprende uno o más pares o grupos de mutaciones seleccionados desde el grupo que consta de: 250Q y 248L (por ej., T250Q y M248L); 252Y, 254T y 256E (por ej., M252Y, S254T y T256E); 428L y 434S (por ej., M428L y N434S); y 433K y 434F (por ej., H433K y N434F). Todas las combinaciones posibles de las mutaciones del dominio Fc precedente, y otras mutaciones dentro de los dominios variables del anticuerpo divulgados en este documento, se contemplan dentro del alcance de la presente invención.

Características biológicas de los anticuerpos

La presente invención incluye anticuerpos anti-IL-25 que se unen a IL-25 humana con un KD de menos de alrededor de 120 pM según lo medido por resonancia de plasmones de superficie a 25°C. De acuerdo a ciertas realizaciones, la invención incluye anticuerpos anti-IL-25 que se unen a IL-25 humana con un ID de menos de alrededor de 100 pM, menos de alrededor de 90 pM, menos de alrededor de 80 pM, menos de alrededor de 70 pM, menos de alrededor de 60 pM, menos de alrededor de 50 pM, menos de alrededor de 40 pM, menos de alrededor de 30 pM, menos de alrededor de 20 pM, menos de alrededor de 18 pM, menos de alrededor de 16 pM, menos de alrededor de 14 pM, o menos de alrededor de 12 pM.

La presente invención incluye anticuerpos anti-IL-25 que se unen a IL-25 humana con una vida media disociativa ($t_{1/2}$) de superior a unos 105 minutos, que se miden por resonancia de plasmones de superficie a 25°C. De acuerdo a ciertas realizaciones, la invención incluye anticuerpos anti-IL-25 que se unen a IL-25 humana con un $t_{1/2}$ superior a alrededor de 105 minutos, superior a alrededor de 150 minutos, superior a alrededor de 175 minutos, superior a alrededor de 200 minutos, superior a alrededor de 250 minutos, superior a alrededor de 300 minutos, superior a alrededor de 350 minutos, superior a alrededor de 400 minutos, superior a alrededor de 450 minutos, superior a alrededor de 500 minutos, superior a alrededor de 550 minutos, superior a alrededor de 600

minutos, superior a alrededor de 700 minutos, superior a alrededor de 800 minutos, superior a alrededor de 900 minutos, superior a alrededor de 1.000 minutos, superior a alrededor de 1.100 minutos, o superior a alrededor de 1.200 minutos. La presente invención incluye anticuerpos anti-IL-25 que pueden o no unirse a IL-25 de mono, o IL-25 de ratón o rata. En este documento, un anticuerpo "no se une" a un antígeno en particular (p. ej., a IL-25 de mono, ratón o rata) si el anticuerpo, cuando es probado en un ensayo de unión a antígeno, tal como resonancia de plasmones de superficie exhibe un KD superior a alrededor de 1.000 nM, o no muestra ninguna unión a antígeno, en tal ensayo. Otro formato de ensayo que se puede utilizar para determinar si un anticuerpo se une o no se une a un antígeno en particular, de acuerdo con este aspecto de la invención, es ELISA.

La presente invención incluye anticuerpos anti-IL-25 que bloquan IL-25 humana señalizando en células modificadas para expresar un receptor de IL-25 (IL-17RA/IL-17RB) con un IC50 de menos de alrededor de 2,0 nM. Por ejemplo, tal como se muestra en el ejemplo 6 en este documento, las células HEK293 fueron modificadas para expresar de manera estable IL-17RA humana (aminoácidos 1 a 866 de número de acceso NP 055154,3) e IL-17RB (aminoácidos 1 a 502 de número de acceso NP 061195,2). La línea celular puede incluir también un elemento reportero que permite la detección de la señalización mediada por IL-25 hasta el receptor de IL-17RA/IL-17RB (por ej., un reportero luciferasa u otro reportero detectable que es inducido por IL-25 uniéndose a su receptor). Usando un formato de ensayo descrito en el ejemplo 6, o un formato de ensayo sustancialmente similar, un valor de IC50 puede ser calculado como la concentración de anticuerpo necesaria para reducir la señalización mediada por IL-25 en un 50% de la señal máxima observada en ausencia de anticuerpos. Así, de acuerdo a ciertas realizaciones, la invención incluye anticuerpos anti- IL-25 humana que bloquean la señalización de IL-25 en las células modificadas para expresar un receptor IL-25 (IL-17RA/IL-17RB) con un IC50 de menos de alrededor de 720 pM, menos de alrededor de 500 pM, menos de alrededor de 400 pM, menos de alrededor de 300 pM, menos de alrededor de 200 pM, menos de alrededor de 100 pM, menos de alrededor de 90 pM, menos de alrededor de 80 pM, menos de alrededor de 70 pM, menos de alrededor de 60 pM, menos de alrededor de 50 pM, menos de alrededor de 40 pM, menos de alrededor de 30 pM, menos de alrededor de 20 pM, menos de alrededor de 10 pM, o menos de alrededor de 5 pM, tal y como se mide mediante el formato de ensayo descrito en el ejemplo 6 de este documento o un ensayo sustancialmente similar.

La presente invención incluye anticuerpos anti-IL-25 que bloquean IL-25 humana señalizando en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs) con un IC50 de menos de alrededor de 16 nM. Por ejemplo, como se muestra en el Ejemplo 7 de este documento, PBMCs aisladas fueron incubadas con IL-25 y varias cantidades de anticuerpos anti-IL-25 y el nivel de IL-25 producido por las células fue detectado para indicar la extensión de la señalización mediada por IL-25. Usando el formato de ensayo descrito en el Ejemplo 7, o un formato de ensayo sustancialmente similar, un valor de IC50 puede ser calculado como la concentración de anticuerpo requerida para reducir la señalización mediada por IL-25 en un 50% de la señal máxima observada en ausencia de anticuerpos. Así, de acuerdo a ciertas realizaciones, la invención incluye anticuerpos anti-IL-25 que bloquean la señalización de IL-25 humana en PBMCs con un IC50 de menos de alrededor de 5 nM, menos de

alrededor de 4 nM, menos de alrededor de 3 nM, menos de alrededor de 1 nM, menos de alrededor de 900 pM, menos de alrededor de 800 pM, menos de alrededor de 700 pM, menos de alrededor de 600 pM, menos de alrededor de 500 pM, menos de alrededor de 400 pM, menos de alrededor de 300 pM, menos de alrededor de 200 pM, menos de alrededor de 100 pM, menos de alrededor de 90 pM, menos de alrededor de 80 pM, menos de alrededor de 70 pM, menos de alrededor de 60 pM, menos de alrededor de 50 pM, menos de alrededor de 40 pM, menos de alrededor de 30 pM, o menos de alrededor de 20 pM, tal y como se mide mediante el formato de ensayo sdescrito en el Ejemplo 7 de este documento o un ensayo sustancialmente similar. En una realización, los anticuerpos anti-IL-25 de la invención bloquan la señalización de IL-25 humana en PBMCs humanas con un IC50 que va desde alrededor de 30 pM hasta alrededor de 150 pM.

Una característica de unión de un anticuerpo de la invención (por ej., cualquiera de las características de unión mencionados en este documento anteriormente), cuando es divulgado en términos de ser “medida por resonancia de plasmones de superficie” significa que las características de unión relevantes pertenecientes a la interacción entre el anticuerpo y el antígeno se miden utilizando un instrumento de resonancia de plasmones de superficie (por ej., un instrumento Biacore®, GE Healthcare) usando condiciones de ensayo Biocore estándar tal como se ilustra en el Ejemplo 2 de este documento, o formato de ensayo sustancialmente similar.

En ciertas realizaciones, los parámetros de enlace son medidos a 25°C, mientras que en otras realizaciones, los parámetros de enlace se miden a 37°C.

La presente invención incluye anticuerpos anti-IL-25 que reducen los niveles de IgE circulantes y/o niveles de IgE encontrados en los pulmones de un mamífero que sobreexpresa IL-25, como se muestra en el modelo descrito en el Ejemplo 8. Además se describen en este documento en el Ejemplo 8 los anticuerpos anti-IL-25 que reducen la metaplasia de las células caliciformes en un mamífero que sobreexpresa IL-25.

La presente invención incluye anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a IL-25, comprenden una HCVR y/o LCVR que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionado desde cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCVR y/o LCVR enlistadas en la Tabla 1. Los anticuerpos de la presente invención pueden poseer una o más de las características biológicas mencionadas previamente, o una combinación de las mismas. La lista anterior de características biológicas de los anticuerpos de la invención no pretende ser exhaustiva.

Otras características biológicas de los anticuerpos de la presente invención serán evidentes para una persona experta en el arte desde una revisión de la presente divulgación incluyendo los Ejemplos de este documento.

Mapeo de epítipo y tecnologías relacionadas

El epítipo al que los anticuerpos de la presente invención se unen puede consistir de una secuencia contigua única de 3 o más (por ej., 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más) aminoácidos de una proteína IL-25. Como alternativa, el epítipo puede consistir de una pluralidad

de aminoácidos no contiguos (o secuencias de aminoácidos) de IL-25. En algunas realizaciones, el epítotope está ubicado en o cerca de una superficie de IL-25 que interactúa con un receptor de IL-25. En otras realizaciones, el epítotope está ubicado en o cerca de una superficie de IL-25 que no interactúa con un receptor de IL-25, por ej., en una ubicación en la superficie de IL-25 en la cual un anticuerpo, cuando se une a tal epítotope no interfiere con la interacción entre IL-25 y su receptor.

Diversas técnicas conocidas para personas expertas en el arte pueden ser utilizadas para determinar si un anticuerpo “interactúa con uno o más aminoácidos” dentro de un polipéptido o proteína. Técnicas ejemplares incluyen, por ej., ensayo de bloqueo cruzado de rutina tal como los Anticuerpos descritos, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), análisis de mutaciones de barrido de alanina, análisis de transferencia de péptidos (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248:443-463), y análisis de escisión de péptidos. Además, métodos tal como escisión de epítotope, extracción de epítotope y modificación química antígenos pueden ser empleados (Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487-496). Otro método que puede ser usado para identificar los aminoácidos

dentro de un polipéptido con el cual un anticuerpo interactúa es el intercambio de hidrógeno/deuterio detectado mediante espectrometría de masa. En términos generales, el método de intercambio de hidrógeno/deuterio involucra marcar con deuterio la proteína de interés, seguido de la unión del anticuerpo a la proteína marcada con deuterio. A continuación, el complejo proteína/anticuerpo se transfiere al agua para permitir el intercambio de hidrógeno-deuterio que ocurre en todos los residuos excepto para los residuos protegidos por el anticuerpo (que se quedan marcadas con deuterio) Después de la disociación del anticuerpo, la proteína objetivo es sujeta a escisión de proteasa y análisis de espectrometría de masa, revelando de este modo los residuos marcados con deuterio los cuales corresponden a los aminoácidos específicos con los cuales el anticuerpo interactúa. Ver, por ej., Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

La presente invención incluye anticuerpos anti-IL-25 que se unen al mismo epítotope como cualquiera de los anticuerpos ejemplares específicos descritos en este documento (por ej., anticuerpos que comprenden cualquiera de las secuencias de aminoácidos como se establecen en la Tabla 1 de este documento). De igual forma, la presente invención también incluye anticuerpos anti-IL-25 que compiten por unirse a IL-25 con cualquier de los anticuerpos específicos ejemplares descritos en este documento (por ej., anticuerpos que comprenden cualquiera de las secuencias de aminoácidos como se establecen en la Tabla 1 de este documento).

Uno puede determinar fácilmente si un anticuerpo se une al mismo epítotope, o compite por unirse a, un anticuerpo anti-IL-25 de referencia usando métodos rutinarios conocidos en el arte y ejemplificados en este documento. Por ejemplo, para determinar si un anticuerpo del ensayo se une al mismo epítotope como un anticuerpo anti-IL-25 de referencia de la invención, el anticuerpo de referencia le es permitido unirse a una proteína IL-25. A continuación, se evalúa la capacidad de un anticuerpo del ensayo para unirse a la molécula IL-25. Si el anticuerpo del ensayo es capaz de unirse a IL-25 seguido de la saturación de la unión con el anticuerpo anti-IL-25 de referencia, se puede concluir que el anticuerpo del ensayo se une a diferentes epítotos que el anticuerpo anti-IL-25 de

referencia. Por otro lado, si el anticuerpo del ensayo no es capaz de unirse a la molécula IL-25 seguido de la saturación de unión con el anticuerpo anti-IL-25 de referencia, luego el anticuerpo del ensayo se puede unir al mismo epítotope ya que el epítotope se unió mediante el anticuerpo anti-IL-25 de referencia de la invención. Experimentación de rutina adicional (p. Ej., mutación de péptido y análisis de la unión) pueden llevarse a cabo para confirmar si la falta de unión observada del anticuerpo del ensayo es de hecho debido a la unión al mismo epítotope como el anticuerpo de referencia o si el bloqueo de estérica (u otro fenómeno) es responsable de la falta de unión observada. Experimentos de este tipo se puede realizar mediante ELISA, RIA, Biacore, citometría de flujo o cualquier otro ensayo de unión de anticuerpo cualitativo o cuantitativo disponibles en el arte. De acuerdo a ciertas realizaciones de la presente invención, dos anticuerpos que se unen al mismo (o superposición) epítotope si, por ej., un exceso de 1-, 5-, 10-, 20- o 100 veces de un anticuerpo inhibe la unión de los demás por al menos un 50% pero preferiblemente un 75%, 90% o incluso 99% medido en un ensayo de unión competitiva (ver, por ej., Junghans y cols., Cancer Res. 1990:50:1495-1502).

Como alternativa, dos anticuerpos se considera que se unen al mismo epítotope si prácticamente todos las mutaciones de aminoácidos en el antígeno que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro. Dos anticuerpos se consideran que tienen “epítotope superpuestos” si solamente un subconjunto de las mutaciones de aminoácidos que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reduce o elimina la unión del otro.

Para determinar si un anticuerpo compite por unirse (o compite cruzado para unirse) con un anticuerpo anti-IL-25 de referencia, la metodología de unión descrita anteriormente es realizada en dos orientaciones: En una primera orientación, el anticuerpo de referencia le es permitido unirse a una proteína IL-25 bajo condiciones de saturación seguido de una evaluación de unión del anticuerpo del ensayo a la molécula IL-25. En una segunda orientación, el anticuerpo del ensayo le es permitido unirse a una molécula IL-25 bajo condiciones de saturación seguido de una evaluación de unión del anticuerpo del ensayo a la molécula IL-25. Si, en ambas orientaciones, solamente el primer (saturar) anticuerpo es capaz de unirse a la molécula IL-25, se concluye entonces que el anticuerpo del ensayo y el anticuerpo de referencia compiten por unirse a IL-25 (ver, por ej., el formato de ensayo descrito en el Ejemplo 4 de este documento, en el cual la proteína IL-25 es capturada en las puntas del sensor y las puntas del sensor cubiertas con IL-25 son tratadas con un anticuerpo de referencia [mAb-1] y un anticuerpo anti-IL-25 del ensayo [mAb-2] secuencialmente y en ambos órdenes de unión). Como será apreciado por una persona experta en el arte, un anticuerpo que compite por unirse con un anticuerpo de referencia puede no necesariamente ser al mismo epítotope ya que el anticuerpo de referencia, pero puede bloquear estéricamente la unión del anticuerpo de referencia mediante la unión de un epítotope superpuesto o adyacente.

Preparación de anticuerpos humanos

Los anticuerpos anti-IL-25 de la presente invención pueden ser completamente humano, pero anticuerpos de ocurrencia no natural. Métodos para generar anticuerpos monoclonales, incluyendo anticuerpos monoclonales completamente humanos son conocidos en el arte. Cualesquiera de

dichos métodos conocidos pueden ser usados en el contexto de la presente invención para hacer anticuerpos humanos que se unen específicamente a IL-25 humana.

Usando la tecnología VELOCIMMUNE® (ver, por ejemplo, US 6.596.541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) o cualquier otro método conocido para generar anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos de son aislados inicialmente teniendo una región variable humana y una región constante de ratón. La tecnología VELOCIMMUNE® involucra la generación de un ratón transgénico que tiene un genoma que comprende regiones variables de cadena pesada y liviana operativamente unido a la región constante del loci endógena de ratón de tal manera que el ratón produce un anticuerpo que comprende una región variable humana y una región constante de ratón en respuesta la estimulación antigénica. El DNA codifica las regiones variables de las cadenas pesada y liviana del anticuerpo son aisladas y operativamente unida a DNA que codifica las regiones constantes de cadena pesada y liviana humanas. El DNA es entonces expresado en una célula capaz de expresar el anticuerpo completamente humano.

Generalmente, un ratón VELOCIMMUNE® es enfrentado con el antígeno de interés, y células linfáticas (como las células B) recuperados desde los ratones que expresan anticuerpos. Las células linfáticas pueden ser fusionadas con una línea celular de mieloma para preparar líneas celulares de hibridomas inmortales; y dichas líneas celulares de hibridomas son evaluadas y seleccionadas para identificar líneas celulares de hibridomas que producen anticuerpos específicos al antígeno de interés. DNA que codifica las regiones variables de la cadena pesada y cadena liviana puede ser aislado y enlazado a regiones constantes isotópicas deseables de la cadena pesada y cadena liviana. Tal proteína de anticuerpo puede ser producida en un célula, tal como una célula CHO. Alternativamente, DNA que codifica los anticuerpos quiméricos antígeno-específico o los dominios variables de las cadenas pesada y liviana pueden ser aisladas directamente desde linfocitos antígeno-específico.

Como se describe en la sección experimental a más adelante, los anticuerpos quiméricos de alta afinidad, los cuales son aislados teniendo una región variable humana y una región constante de ratón, son caracterizados y seleccionados para características deseadas, incluyendo afinidad, selectividad, epítipo, etc. Las regiones constantes de ratón son entonces reemplazadas con una región constante humana para generar el anticuerpo completamente humano de la invención, por ejemplo IgG1 o IgG4 modificado o de tipo salvaje. Mientras que la región constante seleccionada puede variar de acuerdo a un uso específico, unión a antígeno de alta afinidad y características de especificidad del objetivo residen en la región variable.

En general, los anticuerpos de la presente invención poseen afinidades muy altas, teniendo típicamente KD desde alrededor de 10^{-12} hasta alrededor de 10^{-9} M, cuando se mide mediante la unión a antígeno ya sea inmobilizado en fase sólida o en fase solución.

Bioequivalentes

Los anticuerpos anti-IL-25 y fragmentos de anticuerpos de la presente invención abarcan proteína que tienen secuencias de aminoácidos que varían de aquellas de los anticuerpos descritos pero que

conservan la capacidad de unirse a IL-25 humana. Dichos anticuerpos variantes y fragmentos de anticuerpo comprenden una o más adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos cuando se compara con la secuencia parental, pero que exhiben actividad biológica que es esencialmente equivalente a aquellas de los anticuerpos descritos. Similarmente, las secuencias de DNA que codifica el anticuerpo anti-IL-25 de la presente invención abarcan secuencias que comprenden una o más adiciones, eliminaciones o sustituciones de nucleótidos cuando se compara con la secuencia divulgada, pero que codifica un anticuerpo anti-IL-25 o fragmento de anticuerpo que es esencialmente bioequivalente a un anticuerpo anti-IL-25 o fragmento de anticuerpo de la invención. Ejemplos de dichos aminoácidos variantes y secuencias de DNA son discutidas anteriormente.

Dos proteínas de unión a antígeno, o anticuerpos, son considerados bioequivalentes si, por ejemplo, son equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas cuya tasa y extensión de absorción no muestran una diferencia significativa cuando es administrado en la misma dosis molar bajo condiciones experimentales similares, ya sea dosis única o dosis múltiple.

Algunos anticuerpos serán considerados equivalentes o alternativas farmacéuticas si es que ellos son equivalentes en la extensión de su absorción pero no en sus tasas de absorción y aún pueden ser considerados bioequivalentes debido a dichas diferencias en la tasa de absorción son intencionales y son reflejados en el mercado, no son esenciales para logro de concentraciones del fármaco eficaz para el cuerpo en, por ejemplo, uso crónico, y son considerados medicamente insignificantes para el producto de fármaco particular estudiado.

En una realización, dos proteínas de unión a antígeno son bioequivalentes si es que no hay diferencias significativas clínicamente en su seguridad, pureza y potencia.

En una realización, dos proteínas de unión a antígeno son bioequivalentes si es que un paciente se puede cambiar una o más veces entre el producto de referencia y el producto biológico sin un aumento esperado en el riesgo de efectos adversos, incluyendo un cambio significativo clínicamente en inmunogenicidad, o efectividad disminuida, en comparación a terapia continuada sin tal cambio.

En una realización, dos proteínas de unión a antígeno son bioequivalentes si es que ambas actúan mediante un mecanismo en común o mecanismos de acción para la condición o condiciones de uso para la extensión que dichos mecanismos son conocidos.

Bioequivalencia puede ser demostrada mediante métodos in vivo e in vitro. Las mediciones de bioequivalencia incluyen, por ej., (a) una prueba in vivo en humanos u otros mamíferos, en la cual la concentración del anticuerpo o sus metabolitos es medido en sangre, plasma, suero, u otro fluido biológico como una función de tiempo; (b) una prueba in vitro que ha sido correlacionada con y es razonablemente predictiva de datos de biodisponibilidad in vivo humanos; (c) una prueba in vivo en humanos u otros mamíferos en los cuales el efecto farmacológico agudo apropiado del anticuerpo (o su objetivo) es medido como una función de tiempo; y (d) en un ensayo clínico bien controlado que establece seguridad, eficacia, o biodisponibilidad o bioequivalencia de un anticuerpo.

Variantes de bioequivalencia de anticuerpos anti-IL-25 de la invención pueden estar construídas para, por ejemplo, hacer distintas sustituciones de residuos o secuencias o eliminar residuos terminales o internos o secuencias no necesarias para actividad biológica. Por ejemplo, residuos de cisteína no esenciales para actividad biológica pueden ser eliminados o reemplazados con otros aminoácidos para prevenir la formación de puentes de disulfuro intramolecular incorrecta o innecesaria al renaturalizar. En otros contextos, anticuerpos bioequivalentes pueden incluir variantes de anticuerpos anti-IL-25 que comprenden cambios de aminoácidos los cuales modifican las características de glicosilación de los anticuerpos, por ej., mutaciones que eliminan o remueven glicosilación.

Selectividad de especies y reactividad-cruzada de especies

La presente invención, de acuerdo con ciertas realizaciones, proporciona anticuerpos anti-IL-25 que se unen a IL-25 humana pero no a IL-25 de otras especies. La presente invención también incluye anticuerpos anti-IL-25 que se unen a IL-25 humana y a IL-25 de una o más especies no humanas.

Por ejemplo, los anticuerpos anti-IL-25 de la invención pueden unirse a IL-25 humana y pueden unirse o no unirse, según sea el caso, a uno o más IL-25 de ratón, rata, hamster, gerbilino, cerdo, gato, perro, conejo, cabra, oveja, vaca, caballo, camello, macaco cangrejero, tití, macaco rhesus o chimpancé. De acuerdo a ciertas realizaciones ejemplares de la presente invención, se proporcionan anticuerpos anti-IL-25 los cuales se unen específicamente a IL-25 humana y a IL-25 de macaco cangrejero (por ej., *Macaca fascicularis*) Otros anticuerpos anti-IL-25 de la invención se unen a IL-25 humana pero no se une, o se une sola débilmente a IL-25 de macaco cangrejero.

Anticuerpos multiespecíficos

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos (por ej., bi específicos). Anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítopes de un polipéptido objetivo o puede contener dominios de unión a antígeno específico para mas de un polipéptido objetivo. Ver, por ej., Tutt y cols., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer y cols., 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244. Los anticuerpos anti-IL-25 de la presente invención pueden ser enlazados a o co-expresados con otra molécula funcional, por ej., otro péptido o proteína. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo puede ser enlazado funcionalmente (por ej., mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente u otros) a una o más otras entidades moleculares, tal como otro anticuerpo o fragmento de anticuerpo para producir un anticuerpo bi específico o multi específico con una segunda especificidad de unión.

La presente invención incluye anticuerpos bi específicos donde un brazo de una inmunoglobulina se une IL-25 humana, y el otro brazo de la inmunoglobulina es específica para un segundo antígeno. El brazo de unión a IL-25 puede comprender cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCVR/LCVR o CDR como se establece en la Tabla 1 en este documento.

Un formato de anticuerpo bi específico ejemplar que puede ser usado en el contexto de la presente invención involucra el uso de un primer dominio CH3 de inmunoglobulina (Ig) y un segundo dominio

CH3 de Ig, donde el primer y segundo dominio CH3 de Ig, difieren el uno con el otro en al menos un aminoácido, y donde al menos una diferencia de aminoácidos reduce la unión del anticuerpo bi específico a la Proteína A en comparación a un anticuerpo bi específico que carece de la diferencia de aminoácido. En una realización, el primer dominio CH3 de Ig se une a la Proteína A y el segundo dominio CH3 de Ig contiene una mutación que reduce o anula la Proteína A uniéndose como una modificación H95R (Mediante numeración de exones IMGT; H435R mediante numeración EU). El segundo CH3 puede además comprender una modificación Y96F (mediante IMGT; Y436F mediante EU). Modificaciones adicionales que se pueden encontrar dentro del segundo CH3 incluye: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, y V82I (mediante IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, y V422I mediante EU) en el caso de anticuerpos IgG1; N44S, K52N, y V82I (IMGT; N384S, K392N, y V422I mediante EU) en el caso de anticuerpos IgG2; y Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, and V82I (by IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, y V422I mediante EU) en el caso de anticuerpos IgG4. Variaciones en el formato de anticuerpo bi específico descritas anteriormente se contemplan dentro el alcance de la presente invención. Otros formatos ejemplares que pueden ser usados en el contexto de la presente invención incluye, sin limitación, por ej., formatos bi específicos diacuerpo o basado en scFc, fusiones de IgG-scFc, dominio variable dual (DVD)-Ig, Quadroma, perillas en los agujeros, cadena liviana común (por ej., cadena liviana común con perillas en los agujeros, etc.), CrossMab, CrossFab, (SEED)cuerpo, cierre de leucina, Duocuerpo, IgG1/IgG2, y formatos bi específicos Mab2 (ver, por ej., Klein y cols. 2012, mAbs 4:6, 1-11, y referencias citadas en estos para una revisión de los formatos precedentes). Anticuerpos bi específicos pueden también estar contruidos usando una conjugación de péptido/ácido nucleico, por ej., donde aminoácidos no naturales con reactividad química ortogonal son usados para generar conjugados de anticuerpo-oligonucleótido de sitio específico los que luego son auto ensamblados en los complejos multiméricos con composición, (Ver, por ej., Kazane y cols., J. Am. Chem. Soc. [Epub: Dec. 4, 2012]).

Formulación terapéutica y administración

La invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos anti-IL-25 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención. Las composiciones farmacéuticas de la invención están formuladas con portadores adecuados, excipientes, y otros agentes que proporcionan transferencia mejorada, entrega, tolerancia y similares. Una multitud de formulaciones apropiadas pueden ser encontradas en el formulario conocido para todos los químicos farmacéuticos: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, ungüentos, jaleas, ceras, aceites, lípidos, lípidos que contienen vesículas (catiónicos o aniónicos) (tal como LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA), conjugados de DNA, pastas de absorción de anhidras, emulsiones de aceite en agua y de agua en aceite, emulsiones carbowax (glicoles de polietileno de varios pesos moleculares), geles semi sólidos, y mezclas semi sólidas que contienen carbowax. Ver también Powell y cols. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

La dosis de anticuerpo administradas a un paciente puede variar dependiendo de la edad y el tamaño del paciente, enfermedad objetiva, condiciones, ruta de administración, y similares. La dosis

preferente es típicamente calculada de acuerdo al peso del cuerpo o área de superficie del cuerpo. En un paciente adulto, podría ser ventajoso para administrar intravenosamente el anticuerpo de la presente invención normalmente en una única dosis de alrededor de 0,01 hasta alrededor de 20 mg/kg de peso corporal, preferiblemente alrededor de 0,02 hasta alrededor de 7, alrededor de 0,03 hasta alrededor de 5, o alrededor de 0,05 hasta alrededor de 3 mg/kg de peso corporal. Dependiendo de la severidad de la condición, la frecuencia y duración del tratamiento pueden ser ajustados. Dosificaciones efectivas y horarios para la administración de anticuerpos anti-IL-25 pueden ser determinados empíricamente; por ejemplo, el progreso del paciente puede ser monitoreado mediante evaluaciones periódicas, y la dosis ajustada consecuentemente. Más aún, escalamiento de dosificación inter especies puede ser realizado usando métodos bien conocidos en el arte (por ej., Mordenti y cols., 1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351).

Varios sistemas de entrega son conocidos y pueden ser usados para administrar la composición farmacéutica de la invención, por ej., encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar los virus mutantes, endocitosis mediada por receptor (ver, por ej., Wu y cols., 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432). Métodos de introducción incluyen, pero no se limitan a, Intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural, y rutas orales. La composición puede ser administrada mediante cualquier ruta conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección de bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (Por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y que puede ser administrada junto con otros agentes activos biológicamente. La administración puede ser sistémica o local.

Una composición farmacéutica de la presente invención puede ser entregada subcutáneamente o intravenosamente con aguja y jeringa estándar. Además, con respecto a la entrega subcutánea, un dispositivo de entrega de bolígrafo fácilmente tiene aplicaciones en la entrega de una composición farmacéutica de la presente invención. Dicho dispositivo de entrega de bolígrafo puede ser reutilizable o desechable. Un dispositivo de entrega de bolígrafo generalmente utiliza un cartucho reemplazable que contiene una composición farmacéutica. Una vez que toda la composición farmacéutica dentro del cartucho ha sido administrada y el cartucho está vacío, el cartucho vacío puede ser fácilmente descartado y reemplazado con un nuevo cartucho que contiene la composición farmacéutica. El dispositivo de entrega de bolígrafo puede entonces ser reutilizado. En un dispositivo de entrega de bolígrafo desechable, no hay ningún cartucho reemplazable. En su lugar, el dispositivo de entrega de bolígrafo desechable viene precargado con la composición farmacéutica contenida en un depósito dentro del dispositivo. Una vez que el depósito es vaciado de la composición farmacéutica, el dispositivo entero es descartado. Numerosos bolígrafos reutilizables y dispositivos de entrega autoinyectores tienen aplicaciones en la entrega subcutánea de una composición farmacéutica de la presente invención. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, AUTOPENTM (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), Bolígrafo DISETRONICTM (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland), bolígrafo HUMALOG MIX 75/25TM, bolígrafo HUMALOGTM, bolígrafo HUMALIN 70/30TM (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPENTM) II y III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIORTM (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), bolígrafo

BDTM (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPENTM, OPTIPEN PROTm, OPTI PEN STARLETTM y OPTICLIKTM (sanofi-aventis, Frankfurt, Germany), por nombrar sólo algunos. Ejemplos de dispositivos de entrega de bolígrafo desechables que tienen aplicaciones en entrega subcutánea de una composición farmacéutica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, bolígrafo SOLOSTARTM (sanofi-aventis), FLEXPENTM (Novo Nordisk), y KWIKPENTM (Eli Lilly), Autoinyector SURECLICKTM (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLETTM (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.), y HUMIRATM (Abbott Labs, Abbott Park IL), por nombrar algunos.

En ciertas situaciones, la composición farmacéutica puede ser entregada en un sistema de liberación controlada. En una realización, se puede usar una bomba (ver Langer, *supra*; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). En otra realización, pueden ser usados material poliméricos; ver, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. En aún otra realización, un sistema de liberación controlada se puede colocar en proximidad de los objetivos de la composición, requiriendo así sólo una fracción de la dosis sistémica (ver, por ej., Goodson, 1984, in *Medical Applications of Controlled Release*, *supra*, vol. 2, pp. 115-138). Otros sistemas de liberación controlada se discuten en la revisión de Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533.

Las preparaciones inyectables pueden incluir formas de dosificaciones intravenosas, subcutáneas, inyecciones intracutáneas e intramusculares, infusiones por goteo, etc. Estas preparaciones inyectables pueden ser preparadas mediante métodos conocidos públicamente. Por ejemplo, las preparaciones inyectables pueden ser preparadas, por ej., disolviendo, suspendiendo o emulsificando el anticuerpo o su sal descrita anteriormente en un medio acuoso estéril o en un medio aceitoso usado convencionalmente para inyecciones. Como medio acuoso para inyectables, hay, por ejemplo, salina fisiológica, una solución isotónica que contiene glucosa y otros agentes auxiliares, etc., los cuales pueden ser usados en combinación con un agente solubilizante apropiado tal como un alcohol (por ej., etanol), un polialcohol (por ej., propilenglicol, polietilenglicol) un surfactante no iónico [Por ejemplo, polisorbato 80, HCO-50 (aducto de polioxietileno (50 moles) de aceite de ricino hidrogenado)], etc. Como medio aceitoso, se emplean, por ej., aceite de sésamo, aceite de soya, etc., los cuales pueden ser usados en combinación con un agente solubilizante tal como benzoato de bencilo, alcohol bencílico, etc. La inyección es así preparada es preferentemente llenado en una ampolla apropiada.

Ventajosamente, las composiciones farmacéuticas para uso parenteral u oral descrito anteriormente están preparadas en formas de dosificación en una dosis unitaria adecuada para ajustar una dosis de los ingredientes activos. Tales formas de dosificación en una dosis unitaria incluyen, por ejemplo, tabletas, pastillas, cápsulas, inyecciones (ampollas), supositorios, etc. La cantidad de dicho anticuerpo contenido es generalmente alrededor de 5 hasta alrededor de 500 mg por forma de dosificación en una dosis unitaria; especialmente en la forma de inyección, es preferente que el anticuerpo anteriormente mencionado está contenido en alrededor de 5 hasta alrededor de 100 mg y en alrededor de 10 hasta alrededor de 250 mg para las otras formas de dosificación.

Usos terapéuticos de los anticuerpos

La presente invención incluye métodos que comprenden administrar a un sujeto en necesidad de los mismos una composición terapéutica que comprende un anticuerpo anti-IL-25. La composición terapéutica puede comprender cualquiera de los anticuerpos anti-IL-25 o fragmentos de unión a antígeno del mismo divulgados en este documento, y un portador o diluyente aceptable farmacéuticamente.

Los anticuerpos de la invención son útiles, inter alia, para el tratamiento, prevención y/o mejora de cualquier enfermedad o trastorno asociado con o mediado por la expresión o actividad de IL-25, o tratable mediante el bloqueo de la interacción entre IL-25 y un receptor de IL-25, o de otra manera inhibir la actividad y/o señalización de IL-25.

La presente invención incluye métodos de tratamiento o prevención de asma mediante la administración a un paciente en necesidad de dicho tratamiento de un anticuerpo anti-IL-25 o fragmento de unión a antígeno del mismo como se ha divulgado en este documento. Como se utiliza en este documento, el término “asma” incluye, pero no está limitado a, asma alérgico, asma no alérgico, asma refractario severo, exacerbaciones de asma, asma inducido por virus, o exacerbaciones de asma inducidas por virus, asma resistente a esteroides, asma esteroide sensible, asma eosinofílica o asma no eosinofílica, etc., y otros trastornos relacionados caracterizados por inflamación de las vías respiratorias o hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR). El término también pretende incluir la exacerbación de asma inducida por virus.

La presente invención incluye métodos de tratamiento o prevención de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) mediante la administración a un paciente en necesidad de dicho tratamiento con un anticuerpo anti-IL-25 o fragmento de unión a antígeno del mismo divulgado en este documento. Como se ha usado en este documento, el término “COPD” incluye, pero no se limita a, enfermedades y trastornos caracterizados por una reducción en el flujo espiratorio y vaciado forzado lento de los pulmones que no cambia marcadamente durante varios meses. Los métodos de acuerdo a este aspecto de la presente invención puede ser usado para trata, por ej., COPD asociado con o causado por el humo del cigarrillo (por ej., fumar cigarrillos a largo plazo), contaminación del aire (por ej., dióxido de azufre, humo de segunda mano, etc.) químicos ocupacionales (por ej., cadmium), alergia o AHR.

La presente invención además incluye métodos de tratamiento o prevención de la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) mediante la administración a un paciente en necesidad de dicho tratamiento con un anticuerpo anti-IL-25 o fragmento de unión a antígeno del mismo como se divulgan en este documento. Como se usa en este documento, el término “IBD” incluye, pero no se limita a, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, colitis colágena, colitis linfocítica, colitis isquémica, colitis de desviación, síndrome de Behcet, colitis infecciosa, colitis indeterminada, y otros trastornos relacionados caracterizados por la inflamación de la capa mucosa del intestino grueso o colon.

La presente invención también incluye métodos de tratamiento o prevención de dermatitis atópica (AD) mediante la administración a un paciente en necesidad de dicho tratamiento con un anticuerpo

anti-IL-25 o fragmento de unión a antígeno del mismo como se divulgan en este documento. Como se usa en este documento, el término "AD" incluye, pero no se limita a, enfermedades inflamatorias de la piel caracterizadas por prurito intenso (por ej., picazón severa) y mediante lesiones de dermatitis escamosas y secas. El término "AD" incluye AD causada por o asociada a disfunción de la barrera epidérmica, alergia (por ej., alergia a ciertos alimentos, polen, moho, ácaro del polvo, animales, etc.), exposición a radiación, y/o asma. Los métodos de acuerdo a este aspecto de la presente invención puede ser usado para tratar, por ej., formas de AD leves, moderadas, moderadas a severas y severas.

La presente invención también incluye métodos de tratamiento o prevención de enfermedades y trastornos tal como Granulomatosis eosinofílica con poliangetitis o EGPA (conocido también como Síndrome de Churg-Strauss), alergia, rinitis alérgica, inflamación alérgica de las vías respiratorias, hipersensibilidad alimenticia, urticaria (incluyendo urticaria idiopática crónica), neumonía eosinofílica, esofagitis eosinofílica, síndrome hipereosinofílico, fibrosis pulmonar idiopática, neumonitis por hipersensibilidad, artritis reumatoide, vasculitis, uveítis, cáncer y enfermedad de injerto contra huésped, mediante la administración a un paciente en necesidad de dicho tratamiento con un anticuerpo anti-IL-25 o fragmento de unión a antígeno del mismo como se divulgan en este documento.

La presente invención también proporciona métodos para tratar otros trastornos inflamatorios, enfermedad cardiovascular, enfermedad del sistema nervioso central, dolor, artritis (por ej., artritis reumatoide, osteoartritis, artritis psoriásica, etc.), artritis de células gigantes, vasculitis, trastornos vasculares generales, púrpura de Henoch-Schonlein, esclerosis múltiple, lupus, y síndrome de Sjogren.

En el contexto de los métodos de tratamiento descritos en este documento, el anticuerpo anti-IL-25 puede ser administrado como una monoterapia (es decir, como el único agente terapéutico) o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales (ejemplos que se encuentran descritos en este documento).

Combinación de terapias y formulaciones

La presente invención incluye composiciones y formulaciones terapéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-IL-25 descritos en este documento en combinación con uno o más componentes terapéuticamente activos adicionales, y métodos de tratamiento que comprenden administrar dichas combinaciones a sujetos en necesidad de los mismos.

Los anticuerpos anti-IL-25 de la presente invención pueden ser co-formulados con y/o administrados en combinación con uno o más componentes terapéuticamente activos adicionales seleccionados desde el grupo constituido por, p. ej., un antagonista IL-4 o IL-4R, por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-4 o anti-IL-4R, un antagonista IL-13, como, por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-13 o anti-IL-13R, un antagonista IL-6 o IL-6R, como, por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-6 o anti-IL-6R (Ver por ejemplo US 7.582.298), un antagonista anti-IL-1, por ejemplo rilonacept, un antagonista

TNF, por ej., etanercept (ENBRELTM), un antagonista IgE, y un antagonista IL-5, IL-8, IL-9, IL-17, IL-17Ra, IL-22, TSLP y IL-33.

En el contexto de tratamiento de asma y condiciones relacionadas, el componente terapéuticamente activo adicional puede ser seleccionado desde el grupo que consiste de: agonistas beta2 de acción prolongada (LABA, por ejemplo, salmeterol o formoterol), corticosteroides inhalados (ICS, por ejemplo, fluticasona o budesonida), una combinación que comprende un LABA + un ICS (por ejemplo, fluticasona + salmeterol [por ejemplo, ADVAIR (GlaxoSmithKline)]; o budesonida + formoterol [por ej., SYMBICORTO (AstraZeneca)]), un corticosteroide sistémico (por ejemplo, oral o intravenoso), metilxantina, nedocromil sódico, cromolín sódico, un antagonista (por ejemplo, un anticuerpo) hasta cualquiera de la una o más de las siguientes citoquinas y/o sus receptores: IL-4, IL-5, IL-8, IL-9, IL-13, IL-17, IL-33, TSLP y combinaciones de las mismas.

En el contexto de tratar dermatitis atópica y condiciones relacionadas, el componente terapéuticamente activo adicional puede ser seleccionado desde el grupo que consiste de: corticosteroides tópicos (TCS, por ejemplo, hidrocortisona, valerato de betametasona, dipropionato de betametasona, valerato de diflucortolona, 17-butilato de hidrocortisona, furoato de mometasona, aceponato de metilprednisolona, propionato de clobetasol, halcinonida, butirato de clobetasol y acetato de triamcinolona), tacrolimus, pimecrolimus, ciclosporina, azatioprina, metotrexato, cromolina sódica, inhibidores de proteinasas, un antagonista (por ejemplo, un anticuerpo) hasta cualquiera de la una o más de las siguientes citoquinas y/o sus receptores: IL-4, IL-5, IL-13, IL-17, IL-33, TSLP y combinaciones de los mismos. De acuerdo a ciertas realizaciones de este aspecto de la invención, el anticuerpo anti-IL-25 es administrado a un sujeto en conjunción con una terapia no farmacéutica tal como terapia con luz ultravioleta (UV).

En el contexto de tratar la enfermedad pulmonar obstructiva (COPD), el componente terapéuticamente activo adicional puede ser seleccionado desde un agonista beta2, un agente anticolinérgico, un anticuerpo IL-5 (por ej., mepolizumab), o un anticuerpo IL-13 (por ej., lebrukizumab). Por ejemplo, agentes que se pueden usar en combinación con los anticuerpos de la invención para tratar la COPD pueden incluir cualquiera de uno o más de los siguientes: indacaterol (un agonista beta2), glicopirronio (un agente muscarínico), tiotropio (un anticolinérgico), aclidinio (un agente antimuscarínico), bromuro de umeclidinio (anticolinérgico) o vilanterol (un agonista beta2 de acción prolongada). Otros agentes que pueden utilizarse en combinación con un anticuerpo de la invención para tratar la COPD se incluyen un inhibidor de fosfodiesterasa (por ejemplo, teofilina, roflumilast, cilomilast), un opioide endógeno o un antagonista beta-adrenérgico (betabloqueantes).

En el contexto de tratar vasculitis, en particular, Síndrome de Churg-Strauss (CSS), el componente terapéuticamente activo adicional puede ser seleccionado desde un esteroide, corticosteroide y un inmunosupresor (por ejemplo, ciclofosfamida).

En el contexto de tratamiento de alergias, los anticuerpos anti-IL-25 de la invención pueden ser usados en conjunción con cualquier terapia paliativa usada para tratar una respuesta alérgica, o puede ser usada con la inmunoterapia estándar (SIT) para tratar la condición alérgica, o puede ser

usada para aliviar al menos un síntoma asociada con la respuesta alérgica. Por ejemplo, el componente terapéuticamente activo adicional puede ser seleccionado desde un antihistamínico, un esteroide, un corticosteroide, un descongestionante, un inhibidor de leucotrieno, y un inhibidor de mastocitos. Otros agentes que pueden ser usados en conjunción con un anticuerpo anti-IL-25 de la invención para tratar una alergia puede ser un antagonista para cualquiera de uno o más de las siguientes citoquinas y/o sus receptores: Antagonista IL-1, IL-4, IL-5, IL-8, IL-9, IL-13, IL-17, TSLP, IL-33, o TNF.

Los anticuerpos anti-IL-25 de la invención pueden también ser administrados y/o co-formulados en combinación con antivirales, antibióticos, analgésicos, oxígeno, antioxidantes, inhibidores COX, cardioprotectores, quelantes metálicos, IFN-gamma y/o NSAIDs.

El (los) componente(s) terapéuticamente activo adicional, por ej., cualquiera de los agentes enlistados anteriormente o derivados de los mismos, pueden ser administrados justo antes de, concurrente con, o brevemente después de la administración de un anticuerpo anti-IL-25 de la presente invención; (para propósitos de la presente divulgación, tal como administración de regímenes son consideradas la administración de un anticuerpo anti-IL-25 “en combinación con” un componente terapéuticamente activo adicional). La presente invención incluye composiciones farmacéuticas en las cuales un anticuerpo anti-IL-25 de la presente invención es co-formulada con uno o más del (los) componente(s) terapéuticamente activo(s) adicional(es) descritos en este documento.

Regímenes de administración

De acuerdo a ciertas realizaciones de la presente invención, múltiples dosificaciones de un anticuerpo anti-IL-25 (o una composición farmacéutica que comprende una combinación de un anticuerpo anti-IL-25 y cualquiera de los agentes terapéuticamente activos mencionados aquí) pueden ser administradas a un sujeto sobre un tiempo definido. Los métodos de acuerdo a este aspecto de la invención comprenden administrar secuencialmente a un sujeto múltiples dosis de un anticuerpo anti-IL-25 de la invención. En este documento, “administrar secuencialmente” significa que cada dosis del anticuerpo anti-IL-25 es administrada al sujeto en un punto diferente en tiempo, por ejemplo, en diferentes días separados por un intervalo predeterminado (por ej., horas, días, semanas o meses). La presente invención incluye métodos, los cuales comprenden administrar secuencialmente al paciente una dosis inicial única de un anticuerpo anti-IL-25, seguido por una o más dosis secundarias del anticuerpo anti-IL-25, y seguido opcionalmente por uno o más dosis terciarias del anticuerpo anti-IL-25. Los términos “dosis inicial”, “dosis secundaria”, y “dosis terciaria”, se refieren a la secuencia temporal de administración del anticuerpo anti-IL-25 de la invención. Así, la “dosis inicial” es la dosis que es administrada en el principio del régimen de tratamiento (referido también como la “dosis de base”); la “dosis secundaria” son dosificaciones que son administradas después de la dosis inicial; y la “dosis terciaria” son las dosificaciones que son administradas después de la segunda dosis. Las dosificaciones inicial, secundaria y terciaria pueden todas contener la misma cantidad de anticuerpo anti-IL-25, pero generalmente pueden diferir la una de la otra en términos de frecuencia de administración. En ciertas realizaciones, sin

embargo, la cantidad de anticuerpo anti-IL-25 contenida en las dosificaciones inicial, secundaria y/o terciaria varían de una a la otra (por ej., ajustada hacia arriba o abajo como sea apropiado) durante el curso del tratamiento. En ciertas realizaciones, dos o más (por ej., 2, 3, 4 o 5) dosificaciones son administradas al principio del régimen de tratamiento como "carga de dosis" seguido por dosificaciones subsecuentes que son administradas en un régimen menos frecuente (por ej., dosis de mantenimiento").

En ciertas realizaciones ejemplares de la presente invención, cada dosis secundaria y/o terciaria es administrada desde 1 a 26 semanas (por ejemplo, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½, o más).

Los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención puede incluir la administración a un paciente cualquier número de dosis secundaria y/o terciaria de un anticuerpo anti-IL-25. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, una única dosis secundaria se administra al paciente. En otras realizaciones, dos o más (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más) dosis secundarias se administran al paciente. De manera similar, en determinadas realizaciones, sólo una única dosis terciaria se administra al paciente. En otras realizaciones, dos o más (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más) dosis terciarias se administran al paciente. El régimen de administración se puede llevar a cabo indefinidamente a lo largo de la vida de un paciente determinado, o hasta que el tratamiento ya no es necesario terapéuticamente o conveniente.

En realizaciones que afectan a varias dosis secundarias, cada dosis se puede administrar con la misma frecuencia que otras dosis secundarias. Por ejemplo, cada dosis secundaria puede ser administrada al paciente 1 a 2 semanas o de 1 a 2 meses después de la dosis inmediatamente anterior. De forma similar, en realizaciones que afectan a múltiples dosis terciarias, cada dosis se puede administrar con la misma frecuencia que las otras dosis terciarias. Por ejemplo, cada dosis terciaria se puede administrar al paciente 2 a 12 semanas después de la dosis inmediatamente anterior. En determinadas realizaciones de la invención, la frecuencia con la cual se administran dosis secundarias y/o terciarias un paciente puede variar en el transcurso del régimen de tratamiento. La frecuencia de administración también puede ajustarse durante el curso del tratamiento por parte de un médico en función de las necesidades de cada paciente siguiendo un examen clínico.

La presente invención incluye administración los tratamientos en los que 2 a 6 dosis de carga se administran al paciente a una primera frecuencia (p. ej., una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez al mes, una vez cada dos meses, etc.), seguida de la administración de dos o más dosis de mantenimiento al paciente de manera menos frecuentes. Por ejemplo, de acuerdo con este aspecto de la invención, si las dosis de carga se administran a una frecuencia de una vez al mes, luego, la dosis de mantenimiento puede ser administrada al paciente una vez cada seis semanas, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, etc.

Usos diagnósticos de los anticuerpos

Los anticuerpos anti-IL-25 de la presente invención también pueden utilizarse para detectar y/o medir IL-25, o células que expresan IL-25 en una muestra, por ejemplo, para fines de diagnóstico. Por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-25 o fragmentos del mismo, puede utilizarse para diagnosticar un trastorno o enfermedad caracterizada por expresión aberrante (p. ej., sobre-expresión, sub-expresión, la falta de expresión, etc.) de IL-25. Los ensayos de diagnóstico ejemplares de IL-25 pueden incluir, por ejemplo, contactar con una muestra, obtenida desde un paciente, con un anticuerpo anti-IL-25 de la invención, donde el anticuerpo anti-IL-25 está marcado con una etiqueta detectable o molécula reportera. Alternativamente, un anticuerpo anti-IL-25 sin marca, puede utilizarse en aplicaciones diagnósticas en combinación con un anticuerpo secundario, que es en sí mismo está marcado para su detección. La marca detectable o molécula reportera puede ser un radioisótopo, como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , o ^{125}I ; un grupo fluorescente o quimioluminiscente tal como isotiocianato de fluoresceína, o rodamina; o bien una enzima como la fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, peroxidasa de rábano picante, o luciferasa. Ensayos específicos ejemplares que pueden utilizarse para detectar o medir IL-25 en una muestra incluyen ensayo inmunoenzimático (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), y clasificación de células activada por fluorescencia (FACS).

Las muestras que se puede utilizar en los ensayos de diagnóstico de IL-25 según la presente invención, incluyen cualquier muestra de líquido o tejido que pueden conseguirse desde un paciente que contiene cantidades detectables de proteína IL-25, o fragmentos de ésta, bajo condiciones normales o patológicas. Por lo general, los niveles de IL-25 en una determinada muestra obtenida de un paciente sano (p. ej., el paciente no sufre una enfermedad o estado asociado con niveles anormales o actividad de IL-25) se medirá inicialmente para establecer una línea de base, o estándar, para el nivel de IL-25. Este nivel de referencia de IL-25 se pueden comparar contra los niveles de IL-25 medido en muestras obtenidas de individuos sospechosos de padecer una enfermedad o condición relacionada con IL-25.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes se presentan para proveer a aquellos expertos en el arte con una completa divulgación y descripción de cómo hacer y usar los métodos y las composiciones de la invención y no se pretende limitar el alcance de lo que el inventor considera como su invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (p. ej., cantidades, temperatura, etc.) pero se deben tener en cuenta algunos errores experimentales y desviaciones. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, peso molecular es peso molecular promedio, la temperatura en grados centígrados, y la presión es o está cerca de la presión atmosférica.

Ejemplo 1. Generación de anticuerpos anti-IL-25

Anticuerpos anti-IL-25 se obtuvieron inmunizando un ratón VELOCIMMUNE(R) (es decir, un ratón modificado genéricamente que comprende DNA que codifica regiones variables de cadena pesada y liviana kappa de inmunoglobulina humana) con IL-25 recombinante humana (R&D Systems catálogo No. 1258). La respuesta inmune del anticuerpo fue monitoreada con un inmunoensayo específico para IL-25. Cuando se alcanzó una respuesta inmune deseada, se colectaron esplenocitos

y se fusionaron con células de mieloma de ratón para mantener su viabilidad y formar líneas celulares de hibridomas. Las líneas celulares de hibridomas fueron evaluadas y seleccionadas para identificar líneas de células que producen anticuerpos IL-25 específicos. Mediante esta técnica se obtuvieron varios anticuerpos quiméricos anti-IL-25 (es decir, anticuerpos que tenían dominios variables humanos y dominios constantes de ratón). Además, varios anticuerpos anti-IL-25 completamente humano se aislaron directamente desde células B positivas para antígeno sin fusión a las células de mieloma, tal como se describe en los US2007/0280945A1.

Ciertas propiedades biológicas anticuerpos anti-IL-25 ejemplares generados de acuerdo con los métodos de este ejemplo se describen en detalle en los ejemplos que se establecen a continuación.

Ejemplo 2. Secuencias de aminoácidos y secuencias de ácido nucleico de regiones variables de cadena pesada y liviana

La tabla 1 establece la secuencia de aminoácidos identificadores de las regiones variables de las cadenas pesadas y livianas y CDRs de anticuerpos anti-IL-25 seleccionados de la invención. Las secuencias de ácido nucleico correspondiente están establecidas en la tabla 2.

Tabla 1: Identificadores de secuencia de aminoácidos

	SEQ ID NOs:							
Designación anticuerpo	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1M11009N	2	4	6	8	10	12	14	16
H2M10690N	18	20	22	24	26	28	30	32
H2M11008N	34	36	38	40	42	44	46	48
H4H10861P	50	52	54	56	58	60	62	64
H4H10862P	66	68	70	72	74	76	78	80
H4H10863P	82	84	86	88	90	92	94	96
H4H10864P	98	100	102	104	106	108	110	112
H4H10871P	114	116	118	120	122	124	126	128
H4H10876P	130	132	134	136	138	140	142	144
H4H10883P	146	148	150	152	154	156	158	160
H4H10897P	162	164	166	168	170	172	174	176
H4H10900P	178	180	182	184	186	188	190	192
H4H10901P	194	196	198	200	202	204	206	208
H4H10903P	210	212	214	216	218	220	222	224
H4H10905P	226	228	230	232	234	236	238	240

H4H10906P	242	244	246	248	250	252	254	256
H4H10907P	258	260	262	264	266	268	270	272

Tabla 2: Identificadores de secuencia de ácido nucleico

	SEQ ID NOS:							
Designación anticuerpo	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1M11009N	1	3	5	7	9	11	13	15
H2M10690N	17	19	21	23	25	27	29	31
H2M11008N	33	35	37	39	41	43	45	47
H4H10861P	49	51	53	55	57	59	61	63
H4H10862P	65	67	69	71	73	75	77	79
H4H10863P	81	83	85	87	89	91	93	95
H4H10864P	97	99	101	103	105	107	109	111
H4H10871P	113	115	117	119	121	123	125	127
H4H10876P	129	131	133	135	137	139	141	143
H4H10883P	145	147	149	151	153	155	157	159
H4H10897P	161	163	165	167	169	171	173	175
H4H10900P	177	179	181	183	185	187	189	191
H4H10901P	193	195	197	199	201	203	205	207
H4H10903P	209	211	213	215	217	219	221	223
H4H10905P	225	227	229	231	233	235	237	239
H4H10906P	241	243	245	247	249	251	253	255
H4H10907P	257	259	261	263	265	267	269	271

Los anticuerpos son, por lo general se mencionan aquí según la siguiente nomenclatura: Prefijo FC (p. ej. "h1 M," "h2M," "H4H", etc.), seguido de un identificador numérico (p. ej. "11009," "10690," "10861", etc.), seguido de un sufijo "P" o "N", tal como se muestra en las tablas 1 y 2. Así pues, según esta nomenclatura, un anticuerpo puede ser en lo sucesivo, p. ej., "H1 M11009N", "H2M10690N", "H4H10861 P", etc. Los prefijos H1M,H2M, y H4M en las designaciones del anticuerpo son utilizadas en este documento para indicar la región Fc del isotipo del anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo "H1 M" tiene un Fc IgG1 de ratón, un anticuerpo "H2M" tiene un Fc IgG2 de ratón y un anticuerpo

"H4H" tiene un Fc IgG4 humano, (todas las regiones variables son completamente humanas como se indica en la primera 'H' en la designación del anticuerpo). Como puede ser apreciado por una persona de la habilidad en el arte, un anticuerpo que tienen un determinado isotipo Fc se puede convertir en un anticuerpo con un isotipo Fc diferente (p. ej., un anticuerpo con un Fc IgG1 de ratón se puede convertir en un anticuerpo humano con un IgG4, etc.), pero en cualquier caso, los dominios variables (incluidos los CDRs) - que se indican mediante los identificadores numéricos que se muestran en las tablas 1 y 2 - seguirá siendo el mismo, y las propiedades de unión se espera que sean idénticas o muy similares con independencia de la naturaleza del dominio Fc.

Anticuerpo de comparación usado en los siguientes ejemplos

Un anticuerpo Comparador anti-IL25 se incluyó en los siguientes experimentos para fines comparativos. En particular, "Comparador I" es un anticuerpo anti-IL-25 con dominios de cadenas variables pesadas y livianas con las secuencias de aminoácidos de los correspondientes dominios de "RH2.5_R71V", como se muestra en US8,658,169.

Ejemplo 3. Afinidad de unión y constantes cinéticas de anticuerpos monoclonales humanos anti-IL-25, derivadas de Resonancia de Superficie de Plasmones

Las constantes de disociación (valores K_D) para unión de IL-25 a anticuerpos anti-IL25 fueron determinadas usando un ensayo biosensor de resonancia de superficie de plasmones en tiempo real en un instrumento Biacore 4000 instrumento (GE Healthcare). El sensor Biacore fue derivatizado por acoplamiento de amina con ya sea un anticuerpo policlonar de conejo anti-ratón (GE Healthcare #BR-1008-38) o con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-humano Fc (GE Healthcare #BR-1008-39) para capturar anticuerpos anti-IL25 expresados con distintas regiones constantes. Todos los estudios de unión Biacore fueron realizados en tampón de electroforesis HBST (0,01 M HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3mM EDTA, 0,05% v/v surfactante P20). Todos los reactivos IL-25 fueron expresados con una cola myc-myc-hexahistidina C-terminal (aquí referido como "IL-25-MMH"). Diferentes concentraciones de IL-25-MMH humano (SEQ ID NO:273), IL-25-MMH de mono (SEQ ID NO:274), IL-25-MMH de ratón (SEQ ID NO:275 y IL-25-MMH de rata (SEQ ID NO:276), preparadas en tampón de electroforesis HBST (desde 100 nM hasta 3,7 nM, diluciones de 3 veces), se inyectaron sobre el anticuerpo anti-IL-25 capturado sobre la superficie a una velocidad de flujo de 30 μ L/min. La asociación de todos los reactivos IL-25-MMH a cada uno de los anticuerpos monoclonales capturados fue monitoreado por 4 minutos y su disociación en tampón de electroforesis HBST fue monitoreado por 10 minutos. Todos los experimentos de cinética de unión fueron realizados ya sea a 25°C o 37°C como se indica en las tablas que figuran a continuación. Las constantes de velocidad de asociación (k_a) y de disociación (k_d) cinéticas fueron determinadas ajustando los sensogramas en tiempo real a un modelo de unión 1:1 usando el software ajuste de curva Scrubber 2.0c. Las constantes de equilibrio de disociación de unión (K_D) y vida media de disociación ($t_{1/2}$) fueron calculadas desde las constantes de velocidad cinéticas como: K_D (M) = k_d / k_a y $t_{1/2}$ (min) = $(\ln 2) / (60 * k_d)$. Los parámetros cinéticos de unión para IL-25-MMH humano, mono, ratón y rata uniéndose a anticuerpos anti-IL-25 a 25°C y 37°C se muestran en las tablas 3 a 10. ("NB"

indica que no observa unión bajo las condiciones experimentales probadas; "IC" indica no son concluyentes debido a unión no específica de fondo a superficie con anti-mFc).

Tabla 3: Parámetros cinéticos de unión de anticuerpos monoclonales anti-IL-25 a IL-25 humano a 25 °C

Anticuerpo	Cantidad de anticuerpo capturado (RU)	100nM IL-25-MMH humana unida (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H10900P	79 ± 0,44	43	1,74E+06	2,75E-05	1,58E-11	421
H4H10864P	136 ± 0,55	75	2,68E+06	4,51 E-05	1,68E-11	256
H4H10901P	109 ± 0,61	62	2,28E+06	5,79E-05	2,54E-11	199
H4H10861P	83 ± 0,33	47	2,01 E+06	2,34E-05	1,16E-11	493
H4H10862P	104 ± 0,61	56	1,88E+06	6,49E-05	3,44E-11	178
H4H10883P	99 ± 0,37	56	7,06E+05	1,00E-05	1,42E-11	1155
H4H10903P	96 ± 0,45	54	8,97E+05	1,73E-05	1,92E-11	670
H4H10907P	104 ± 0,26	40	7,36E+05	6,50E-05	8,83E-11	178
H4H10871P	94 ± 0,37	38	7,49E+05	6,38E-05	8,51 E-11	181
H4H10897P	100 ± 2,61	39	6,23E+05	7,87E-05	1,26E-10	147
H4H10876P	127±0,47	45	3,86E+05	4,78E-05	1,24E-10	242
H4H10905P	136 ± 0,48	49	4,78E+05	1,09E-04	2,28E-10	106
H4H10863P	96 ± 0,81	34	2,60E+05	7,25E-05	2,79E-10	159
H2aM11008N	111±0,75	48	4,82E+05	2,10E-04	4,35E-10	55
H4H10906P	106 ± 0,30	61	1,64E+06	4,32E-05	2,64E-11	268
H1 M11009N	96 ± 2,13	30	2,42E+05	3,04E-03	1,25E-08	4
H2aM10690N	159 ± 1,43	32	8,02E+04	2,90E-03	3,62E-08	4
Comparador 1	241 ± 0,62	79	9,27E+05	1,12E-04	1,20E-10	103

Tabla 4: Parámetros cinéticos de unión de anticuerpos monoclonales anti-IL-25 a IL-25 humano a 37°C

Anticuerpo	Cantidad de anticuerpo capturado	100nM IL-25-MMH	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
------------	----------------------------------	-----------------	--------------	-------------	-----------	-----------------

	(RU)	humana unida (RU)				
H4H10900P	92 ± 2,04	51	2,83E+06	9,91 E-05	3,50E-11	117
H4H10864P	166 ± 2,68	94	3,73E+06	1,96E-04	5,26E-11	59
H4H10901P	121 ± 2,5	65	3,19E+06	2,08E-04	6,51 E-11	56
H4H10861P	110 ± 2,49	63	2,91 E+06	7,80E-05	2,68E-11	148
H4H10862P	134 ± 2,03	72	2,39E+06	2,10E-04	8,79E-11	55
H4H10883P	131 ± 3,8	74	1,58E+06	4,80E-05	3,04E-11	241
H4H10903P	111±1,81	65	1,53E+06	7,75E-05	5,08E-11	149
H4H10907P	119 ± 1,72	47	1,19E+06	4,45E-05	3,75E-11	259
H4H10871P	126±2,41	49	1,15E+06	3,18E-05	2,76E-11	363
H4H10897P	132±2,4	48	1,04E+06	2,26E-04	2,18E-10	51
H4H10876P	170 ± 3,02	60	6,28E+05	5,93E-05	9,44E-11	195
H4H10905P	161 ± 2,46	55	8,09E+05	1,20E-04	1,49E-10	96
H4H10863P	130 ± 2,14	46	6,06E+05	7,78E-05	1,28E-10	149
H2aM11008N	130 ± 1,16	60	7,34E+05	7,93E-04	1,08E-09	15
H4H10906P	124 ± 2,05	72	2,90E+06	1,54E-04	5,29E-11	75
H1 M11009N	103 ± 0,84	30	3,93E+05	8,29E-03	2,11E-08	1,4
H2aM10690N	196 ± 1,28	39	1,37E+05	8,44E-03	6,14E-08	1,4
Comparador 1	301 ± 8,01	99	1,36E+06	1,82E-04	1,34E-10	64

Tabla 5: Parámetros cinéticos de unión de anticuerpos monoclonales anti-IL-25 a IL-25 de mono a 25°C

Anticuerpo	Cantidad de anticuerpo capturado (RU)	100nM IL- 25-MMH humana unida (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H10900P	78 ± 0,23	45	2,94E+06	1,18E-05	4,02E-12	980
H4H10864P	135 ± 0,85	78	3,68E+06	4,70E-05	1,28E-11	246
H4H10901P	108 ± 0,21	64	2,63E+06	3,06E-05	1,16E-11	377
H4H10861P	83 ± 0,18	48	3,26E+06	1,48E-05	4,54E-12	779
H4H10862P	104 ± 0,69	58	2,00E+06	5,10E-05	2,55E-11	226
H4H10883P	99 ± 0,30	58	1,04E+06	1,00E-05	9,65E-12	1155

H4H10903P	96 ± 0,27	57	1,15E+06	1,00E-05	8,71 E-12	1155
H4H10907P	104 ± 0,34	43	1,39E+06	6,74E-05	4,85E-11	171
H4H10871P	94 ± 0,28	42	6,28E+05	6,06E-05	9,65E-11	191
H4H10897P	101 ± 0,47	42	1,13E+06	8,43E-05	7,49E-11	137
H4H10876P	126 ± 0,38	51	3,29E+05	7,18E-05	2,18E-10	161
H4H10905P	136 ± 0,45	54	4,17E+05	7,77E-05	1,86E-10	149
H4H10863P	96 ± 0,36	39	3,43E+05	6,83E-05	1,99E-10	169
H2aM11008N	109 ± 1,04	64	IC*	IC*	IC*	IC*
H4H10906P	106 ± 0,42	61	2,09E+06	2,95E-05	1,41 E-11	391
H1 M11009N	93 ± 0,38	17	IC*	IC*	IC*	IC*
H2aM10690N	156 ± 0,64	46	IC*	IC*	IC*	IC*
Comparador 1	267 ± 0,76	100	8,60E+05	7,52E-05	8,80E-11	154

* IC= indica no son concluyentes debido a unión de fondo no específica a superficie con anti-mFc.

Tabla 6: Parámetros cinéticos de unión de anticuerpos monoclonales anti-IL-25 a IL-25 de mono a 37°C

Anticuerpo	Cantidad de anticuerpo capturado (RU)	100nM IL-25-MMH humana unida (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H10900P	86 ± 1,48	50	3,07E+06	7,49E-05	2,44E-11	154
H4H10864P	157 ± 2,66	94	4,35E+06	1,90E-04	4,36E-11	61
H4H10901P	114 ± 1,68	64	3,55E+06	1,65E-04	4,64E-11	70
H4H10861P	103 ± 1,86	61	3,03E+06	7,14E-05	2,36E-11	162
H4H10862P	127 ± 2,3	70	2,93E+06	1,72E-04	5,89E-11	67
H4H10883P	122±2,21	72	1,75E+06	4,18E-05	2,39E-11	276
H4H10903P	105 ± 1,52	66	1,76E+06	6,59E-05	3,74E-11	175
H4H10907P	112 ± 1,68	50	1,51 E+06	1,01 E-04	6,71E-11	114
H4H10871P	118 ± 2,28	54	1,35E+06	7,40E-05	5,46E-11	156
H4H10897P	124 ± 1,98	49	1,22E+06	2,31 E-04	1,89E-10	50
H4H10876P	162 ± 2,24	64	5,24E+05	5,45E-05	1,04E-10	212
H4H10905P	154 ± 1,5	59	6,68E+05	9,01 E-05	1,35E-10	128

H4H10863P	122 ± 2,26	51	1,18E+06	8,07E-05	6,85E-11	143
H2aM11008N	127 ± 1	80	IC*	IC*	IC*	IC*
H4H10906P	118±1,41	73	3,01 E+06	1,30E-04	4,31E-11	89
H1 M11009N	101 ± 0,94	23	IC*	IC*	IC*	IC*
H2aM10690N	193 ± 0,78	49	IC*	IC*	IC*	IC*
Comparador 1	335 ± 7,64	124	1,32E+06	6,24E-05	4,73E-11	185

* IC= indica no son concluyentes debido a unión no específica de fondo a superficie con anti-mFc

Tabla 7: Parámetros cinéticos de unión de anticuerpos monoclonales anti-IL-25 a IL-25 de ratón a 25°C

Anticuerpo	Cantidad de anticuerpo capturado (RU)	100nM IL-25-MMH humana unida (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H10900P	78 ± 0,48	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10864P	135 ± 0,14	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10901P	108 ± 0,33	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10861P	82 ± 0,08	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10862P	104 ± 0,08	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10883P	99 ± 0,17	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10903P	95 ± 0,16	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10907P	104 ± 0,15	10	1,96E+05	1,15E-02	5,87E-08	1,0
H4H10871P	94 ± 0,04	30	1,21 E+05	1,11 E-04	9,18E-10	104
H4H10897P	101 ± 0,06	20	1A8E+05	1,04E-03	7,05E-09	11
H4H10876P	125 ± 0,10	40	1,74E+05	9,89E-05	5,70E-10	117
H4H10905P	135 ± 0,23	43	1,24E+05	1A5E-04	1,17E-09	80
H4H10863P	95 ± 0,10	22	5,57E+04	1A9E-04	2,67E-09	78
H2aM11008N	108 ± 0,33	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10906P	106 ± 0,50	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H1 M11009N	92 ± 0,25	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H2aM10690N	156 ± 0,23	17	3,88E+04	3,19E-03	8,23E-08	4
Comparador 1	271 ± 0,69	88	5,71 E+05	1,17E-04	2,05E-10	99

* NB= indica que no se observa unión bajo las condiciones experimentales probadas

Tabla 8: Parámetros cinéticos de unión de anticuerpos monoclonales anti-IL-25 a IL-25 de ratón a 37°C

Anticuerpo	Cantidad de anticuerpo capturado (RU)	100nM IL-25-MMH humana unida (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H10900P	84 ± 0,49	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10864P	154 ± 0,42	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10901P	111 ± 0,4	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10861P	99 ± 0,69	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10862P	123 ± 0,13	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10883P	117±0,47	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10903P	102±0,47	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10907P	109 ± 0,02	8	2,75E+05	3,76E-02	1,37E-07	0,3
H4H10871P	114 ± 0,88	41	3,22E+05	8,29E-05	2,58E-10	139
H4H10897P	121 ± 0,47	17	1,77E+05	6,41 E-03	3,62E-08	1,8
H4H10876P	157 ± 0,58	51	3,69E+05	8,97E-05	2,43E-10	129
H4H10905P	151 ± 0,14	47	4,03E+05	1,78E-04	4,41 E-10	65
H4H10863P	118 ± 1,04	37	1,34E+05	1,53E-04	1,14E-09	76
H2aM11008N	126 ± 0,89	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10906P	114±1,18	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H1 M11009N	100 ± 0,2	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H2aM10690N	192 ± 0,85	27	9,53E+04	7,78E-03	8,17E-08	1,5
Comparador 1	332 ± 8,16	111	1,01 E+06	8,16E-05	8,08E-11	142

* NB= indica que no se observa unión bajo las condiciones experimentales probadas

Tabla 9: Parámetros cinéticos de unión de anticuerpos monoclonales anti-IL-25 a IL-25 de rata a 25°C

Anticuerpo	Cantidad de anticuerpo capturado (RU)	100nM IL-25-MMH humana unida (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H10900P	78 ± 0,06	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10864P	135 ± 0,50	-1	NB*	NB*	NB*	NB*

H4H10901P	108 ± 0,15	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10861P	82 ± 0,34	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10862P	103 ± 0,46	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10883P	99 ± 0,30	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10903P	95 ± 0,43	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10907P	103±0,4	10	2,20E+05	1A7E-02	6,69E-08	0,8
H4H10871P	94 ± 0,18	37	5A8E+05	7,23E-05	1,32E-10	160
H4H10897P	100 ± 0,24	23	3,33E+05	8,07E-04	2A2E-09	14
H4H10876P	125 ± 0,32	45	2,59E+05	8,81 E-05	3A1 E-10	131
H4H10905P	135 ± 0,24	45	1,67E+05	1,35E-04	8,10E-10	85
H4H10863P	95 ± 0,40	34	1,53E+05	1,64E-04	1,07E-09	70
H2aM11008N	107 ± 0,23	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10906P	106 ± 0,38	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H1 M11009N	92 ± 0,26	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H2aM10690N	155 ± 0,26	18	9,18E+04	9,50E-03	1,03E-07	1,2
Comparador 1	266 ± 0,53	91	9,27E+05	9,55E-05	1,03E-10	121

* NB= indica que no se observa unión bajo las condiciones experimentales probadas

Tabla 10: Parámetros cinéticos de unión de anticuerpos monoclonales anti-IL-25 a IL-25 de rata a 37°C

Anticuerpo	Cantidad de anticuerpo capturado (RU)	100nM IL-25-MMH humana unida (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H10900P	82 ± 0,55	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10864P	153 ± 0,52	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10901P	110 ± 0,53	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10861P	97 ± 0,71	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10862P	121±1,02	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10883P	116±0,77	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10903P	100 ± 0,77	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10907P	107 ± 0,78	8	2,38E+05	2,04E-02	8,54E-08	0,6
H4H10871P	112 ± 0,54	45	9,37E+05	5,64E-05	6,02E-11	205
H4H10897P	118±0,75	22	2,45E+05	6,01 E-03	2,46E-08	1,9

H4H10876P	156 ± 1,22	53	4,50E+05	1,07E-04	2,38E-10	108
H4H10905P	148 ± 1,25	49	4,81 E+05	1,81 E-04	3,77E-10	64
H4H10863P	116±0,75	41	4,74E+05	3,41 E-04	7,20E-10	34
H2aM11008N	125 ± 0,2	3	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10906P	113±0,73	3	NB*	NB*	NB*	NB*
H1 M11009N	99 ± 0,5	3	NB*	NB*	NB*	NB*
H2aM10690N	191 ± 0,58	20	1,68E+05	1,93E-02	1,15E-07	0,6
Comparador 1	325 ± 8,52	109	1,59E+06	1,02E-04	6,42E-11	113

* NB= indica que no se observa unión bajo las condiciones experimentales probadas

A 25°C, los anticuerpos anti-IL-25 de la invención se unen a IL-25 humana con valores KD en el rango de 11,6pM a 36,2 pM, mientras que el Comparador 1 se une a IL-25 humana con un valor KD de 120pM (Tabla 3). A 37°C los anticuerpos anti-IL-25 de la invención se unen a IL-25 humana con valores KD en el rango de 26,8 pM a 61,4pM, mientras que el Comparador 1 se une a IL-25 humana con un valor de KD de 134pM (Tabla 4). A 25°C, 14 de los 17 anticuerpos anti-IL-25 de la invención se unieron a IL-25 de mono con valores KD en el rango de 4,02 pM a 218 pM, mientras que el Comparador 1 se unió a IL-25 de mono con un KD de 88,0 pM (Tabla 5). A 37°C, 14 de los 17 anticuerpos anti-IL-25 de la invención se unieron a IL-25 de mono con valores de KD en el rango de 23,6 pM a 189 pM, mientras que el Comparador 1 se unió a IL-25 de mono con un valor de KD de 47,3 pM (Tabla 6). Tres anticuerpos de la invención no demostraron unión conclusiva a IL-25 de mono ya sea a 25°C o 37°C. A 25°C, 7 de los 17 anticuerpos anti-IL-25 de la invención se unieron a IL-25 de mono con valores de KD en el rango de 570 pM a 82,3 nM, mientras que el Comparador 1 se unió a IL-25-MMH de ratón con un valor de KD de 80,8 pM (Tabla 7). A 37°C, 7 de los 17 anticuerpos anti-IL-25 de la invención se unen a IL-25 de ratón con valores KD en el rango de 243 pM a 137 pM, mientras que el Comparador 1 se une a IL-25-MMH de ratón con un valor de KD de 80,8 pM (Tabla 8). Diez anticuerpos de la invención no demostraron unión a IL-25 de ratón ya sea a 25°C o 37°C. A 25°C, 7 de los 17 anticuerpos anti-IL-25 de la invención se unieron a IL-25 de rata con valores de KD en el rango de 132 pM a 103 nM, mientras que el Comparador 1 se unió a IL-25 de rata con un valor de KD de 103 pM (Tabla 9). A 37°C, 7 de los 17 anticuerpos anti-IL-25 de la invención se unieron a IL-25 de rata con valores de KD en el rango de 60,2 pM a 115 nM, mientras que el Comparador 1 se unió a IL-25 de rata con un valor de KD de 64,2 pM (Tabla 10).

Diez anticuerpos de la invención no mostraron unión a IL-25 de rata ya sea a 25°C o 37°C.

Ejemplo 4 Competencia cruzada de anticuerpo anti-IL-25

La competencia de unión entre anticuerpos monoclonales anti-IL-25 fue determinada usando un ensayo en tiempo real, libre de marca, de interferometría en bio-capa en un biosensor Octet QK384 (Pall ForteBio Corp.).

Todo el experimento se llevó a cabo a 25 °C en tampón HBST de cinética (0,01 M HEPES pH 7,4, 0,15M NaCl, 3mM EDTA, 0,05% v/v surfactante P20, 0,1 mg/ml BSA) con la placa agitándose a 1000 rpm. Para evaluar si 2 anticuerpos eran capaces de competir entre sí para unirse a sus respectivos epítopes en el IL-25 humano recombinante expresado con una cola myc-myc-hexahistidina C-terminal (hIL-25-MMH; SEQ ID NO:273), alrededor de ~0,5 a 0,7 nM de hIL-25-MMH fue primero capturado sobre biosensores Octet cubiertos con anticuerpo anti-Penta-His (ForteBio Inc, #18-5079) sumergiendo los sensores por 5 minutos en pocillos que contenían una solución a 4µg/mL de hIL-25-MMH. Los biosensores capturados con antígeno fueron luego saturados con el primer anticuerpo monoclonal anti-IL-25 (referido aquí como mAb-1) sumergiéndolo en pocillos que contenían una solución a 50 µg/mL de mAb-1 por 5 minutos. Los biosensores posteriormente se sumergen en los pocillos que contienen una solución de un segundo anticuerpo monoclonal anti-IL-25 a 50µg/mL (referido como mAb-2). Los biosensores se lavaron en tampón HBST de cinética entre cada paso del experimento. La respuesta en tiempo real de la unión fue monitoreada durante el transcurso del experimento y la respuesta de unión al final de cada paso fue registrada. La respuesta de unión de mAb-2 a hIL-25-MMH pre-acomplejado con mAb-1 fue comparada y la conducta competitiva/no competitiva de distintos anticuerpos monoclonales anti-IL-25 fue determinada. En varios casos, los anticuerpos anti-IL-25 no fueron capaces de saturar completamente la superficie capturada por hIL-25-MMH, causando que se observara una cierta cantidad de señal de unión durante la auto-competencia. Por lo tanto, la matriz de competencia cruzada fue generada sustrayendo la señal de auto-competencia desde la unión de mAb-2 específico y cualquier señal menor que 0nM fue registrada como 0 nM. Los resultados se resumen en la figura 1. La clave para los identificadores de mAb y los anticuerpos a los que corresponden y las respuestas de unión que fueron observadas para hIL-25-MMH uniéndose al sensor anti-Penta-His y para mAb-1 uniéndose a hIL-25-MMH capturado se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11: Identificadores de anticuerpos correspondientes a los anticuerpos evaluados en el ensayo de competencia cruzada descrito en la Figura 1.

Identificador de mAb en Fig. 1	Anticuerpo correspondiente	hIL-25-MMH Capturada (nM)	Unión de mAb-1 50ug/mL (nM)
1	H4H10883P	0,58 ± 0,02	0,7 ± 0,04
2	H4H10900P	0,55 ± 0,03	0,68 ± 0,04
3	H4H10901P	0,53 ± 0,03	0,67 ± 0,04
4	H4H10903P	0,8 ± 0,03	1,03 ± 0,03
5	H4H10861P	0,67 ± 0,02	0,88 ± 0,03
6	H4H10862P	0,66 ± 0,02	0,83 ± 0,03
7	H2aM11008N	0,71 ± 0,02	0,81 ± 0,03
8	H4H10864P	0,67 ± 0,02	0,84 ± 0,04
9	H4H10906P	0,71 ± 0,03	0,88 ± 0,03

10	H4H10897P	$0,57 \pm 0,02$	$1,12 \pm 0,06$
11	H4H10907P	$0,73 \pm 0,03$	$1,74 \pm 0,06$
12	H1M11009N	$0,69 \pm 0,02$	$1,42 \pm 0,05$
13	H2aM10690N	$0,79 \pm 0,02$	$1,38 \pm 0,04$
14	H4H10863P	$0,71 \pm 0,03$	$1,13 \pm 0,04$
15	H4H10871P	$0,65 \pm 0,02$	$1,12 \pm 0,04$
16	H4H10876P	$0,62 \pm 0,02$	$1,07 \pm 0,05$
17	H4H10905P	$0,77 \pm 0,03$	$1,59 \pm 0,05$
18	Comparador 1	$0,69 \pm 0,02$	$1,49 \pm 0,07$

En la figura 1, las cajas de gris claro con letras negras representan la auto-competencia. Los anticuerpos que compite en ambas direcciones, independientemente del orden de unión se representan con cajas negras y letras blancas. No existe una competencia entre anticuerpos que sugiere la presencia de unión distintos epítopes se representa como cuadros blancos con letras negras. Cajas en gris oscuro con letras blancas representan las respuestas unión de anticuerpos y control de Isotipo tampón por sí solos.

Este ejemplo muestra que varios de los anticuerpos de la invención presentan competencia cruzada con uno o más anticuerpos de la invención para unirse a IL-25; mientras que ciertos anticuerpos de la invención (p. Ej. H1M11009N[12]) muestran poca o nula competencia cruzada con otros anticuerpos evaluados).

Ejemplo 5. Anticuerpos anti-IL-25 bloquean la unión de IL-25 a IL-17RB

La habilidad de anticuerpos anti-IL-25 para bloquear IL-25 humano para unirse a uno de sus receptores naturales, IL-17RB humano, fue medido en un ELISA tipo sándwich en competencia.

El dominio extracelular de la proteína IL-17RB humana, expresada con una cola Fc humana C-terminal (hIL17RB-hFc; R&D Systems, #1207-BR), fue cubierto con $2\mu\text{g/mL}$ en una microplaca de 96 pocillos en tampón PBS durante la noche a 4°C . Los sitios de unión inespecífica fueron posteriormente bloqueados usando una solución de BSA en PBS al 0,5% (p/v). Una concentración constante de 2 nM de IL-25 humano expresado con una cola myc-myc-hexahistidina (hIL-25-MMH; SEQ ID NO:273) fue agregado a diluciones seriales de anticuerpos de manera que las concentraciones finales de anticuerpos estaban en el rango de 0 a 200 nM.

Las mezclas anticuerpo/hIL-25-MMH fueron incubadas por 1 hora a temperatura ambiente (RT) antes de que fueran transferidas a microplacas cubiertas con hIL-17RB-hFc. Después de incubar por 1 hora a RT, los pocillos se lavaron, y el hIL-25-MMH unido a la placa fue detectado con peroxidasa de rábano conjugada con anticuerpo policlona anti-myc (Novus Biologicals, #NB600-341). Las muestras fueron desarrolladas con una solución TMB para producir una reacción colorimétrica y luego apagarla con 1M de ácido sulfúrico antes de medir absorbancia a 450 nm en un lector de

placas Victor X5. El análisis de datos se llevó a cabo empleando un modelo dosis-respuesta sigmoideal con el software Prism (GraphPad). El valor calculado IC₅₀ , definido como la concentración de anticuerpos requerida para bloquear 50% de hIL-25-MMH uniéndose a hIL-17Rb-hFc, fue usado como un indicador de Potencia un bloqueo. La absorbancia medida para la concentración constante de hIL-25-MMH por sí solo se define como 0% de bloqueo y la absorbancia medida en caso de no agregar hIL-25-MMH se define como 100% de bloqueo. El porcentaje de bloqueo se calculó como la relación de la reducción en señal observada en presencia de anticuerpos con respecto a la diferencia entre la señal con hIL-25-MMH solo y el fondo (Señal de anticuerpo secundario conjugado con HRP) sustraída del 100% de bloqueo como fue definido anteriormente. Los valores de absorbancia de los pocillos que contienen la mayor concentración para cada anticuerpo se utilizaron para determinar el porcentaje máximo de bloqueo. Los valores IC₅₀ y porcentaje máximo de bloqueo para cada anticuerpo analizado se muestran en la tabla 12.

Tabla 12: Bloqueo de anticuerpos de IL-25 uniéndose a IL-17RB-

Anticuerpo	Bloqueo 2 nM hIL-25-MMH De unión a hIL-17RB-hFc, IC₅₀, (M)	% Máximo de bloqueo de 200 nM anticuerpo bloqueando 2 nM de hIL-25-MMH uniéndose a hIL- 17RB-hFc
H4H10900P	2.0E-10(*)	90
H4H10864P	2.6E-10(*)	88
H4H10901P	2.3E-10(*)	91
H4H10861P	2.0E-10(*)	92
H4H10862P	2.4E-10(*)	89
H4H10883P	2.0E-10(*)	93
H4H10903P	2.4E-10(*)	91
H4H10907P	5.5E-10(*)	87
H4H10871P	7.1 E-10(*)	92
H4H10897P	3.2E-10(*)	94
H4H10876P	6.5E-10(*)	89
H4H10905P	5.3E-10(*)	86
H4H10863P	9.2E-10(*)	87
H2aM11008N	4.3E-10(*)	98

(*) -Bajo el fondo teórico del ensayo fue calculado como 1,0 nM para este ensayo, donde hIL-25-MMH dimérico en solución se fijó a una concentración de 2 nM.

Los anticuerpos que no tenía efecto sobre la señal de hIL-25-MMH constante o mostraron una disminución en la señal de unión de 25% o menos fueron definidos como no-bloqueantes. El ensayo teórico de fondo es 0,5nM indicando que valores IC₅₀ menores calculados pueden no representar

unión al sitio proteína-anticuerpo cuantitativamente. Por esta razón, anticuerpos con valores IC50 calculados menores a 0,5nM son reportados como <5,0E-10 en la Tabla 12.

Como se muestra en la tabla 12, dieciséis de los 17 anticuerpos anti-IL-25 evaluados bloquearon 2nM de hIL-25-MMH de unirse a hIL-17RB-hFc con valores IC50 en el rango de menos de 0,5nM a 31 nM y un porcentaje de bloqueo máximo en el rango de 70% a 98%. El comparador 1 bloqueó 90% de la unión de 2nM hIL-25-MMH de unirse a hIL-17RB-hFc con un valor de IC50 de menos de 0,5nM. un anticuerpo, H1M11009N, fue identificado como no-bloqueador bajo estas condiciones de ensayo.

Ejemplo 6. Anticuerpos anti-IL-25 bloquean señalización mediada por IL-25 en líneas celulares modificadas para expresar IL-17RA e IL-17RB

Se desarrolló un bioensayo para detectar la señalización celular mediada por IL-25 y para medir el grado en el que el anticuerpo anti-IL-25 de la invención bloquea la señalización IL-25 in vitro.

Para este ensayo se generaron líneas celulares HEK293 para expresar de manera estable IL-17RA humana (aminoácidos 1 a 866 de número de acceso NP-055154.3), IL-17RB (aminoácidos 1 a 502 de número de acceso NP_061195.2), y Act1 (aminoácidos 1 a 564 de número de acceso NP_001157753.1), junto con un reportero luciferasa [elemento de respuesta NFkB (5x)-luciferasa-IRES-GFP]. La línea celular resultante estable, referida como HEK293/NFkB-luc-hIL17RA/hIL17RB/hAct1,

fue aislada y mantenida en el 10% DMEM con un 10% FBS, NEAA, penicilina/estreptomicina, 500 µg/mL G418, 100 µg/mL higromicina B, y 1 µg/mL puromicina.

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos con 10000 células/pocillo en OPTIMEM suplementado con 0,1% FBS y luego incubadas a 37°C en 5% CO2 durante la noche. Al día siguiente, para determinar la dosis respuesta de IL-25, ya sea IL-25 humana expresada con cola C-terminal myc-myc-hexahistidina (hIL-25-MMH; SEQ ID NO: 273), IL-25 de mono cynomolgus expresada con cola C-terminal myc-myc-hexahistidina (MfIL-25-MMH; SEQ ID NO:274) o IL-25 de ratón expresada con cola C-terminal myc-myc-hexahistidina (mIL-25-MMH; SEQ ID NO: 275) fueron diluidos en serie 1:3 (desde 3nM a 0,0001 nM) y agregado a las células. Un control que contiene tampón de dilución pero sin IL-25 fue también agregado a una muestra de las células. Para medir la inhibición, los anticuerpos fueron diluidos serialmente y agregados a las células seguido por la adición de concentraciones constantes de IL-25 (5 pM para ambos hIL-25-MMH, 12 pM para MfIL-25-MMH y 10 pM para mIL-25-MMH). Las diluciones en serie de los anticuerpos antes de agregarlos a las células fue de 1:3 partiendo en 100 nM y en un rango hasta 0,002 nM más una muestra de control solo con tampón sin anticuerpo. La actividad luciferasa fue medida después de 5,5 horas de incubación a 37°C en 5% CO2 seguido por la adición de reactivo ONE-GLO (R) (Promega #E6051) usando un lector de placas Victor X (Perkin Elmer). Los resultados se analizaron mediante regresión no lineal (logística de 4-parámetros) con software Prism 5 (GraphPad) para obtener los valores EC50 e IC50. Los resultados se muestran en la tabla 13.

Tabla 13: Inhibición de señalización mediada por IL-25.

Especie de IL25	Humano		Mono	Ratón
EC ₅₀ [M]	2.9E-12	1.6E-11	1.9E-11	8.4E-12
IL25 constante usado en ensayo	5pM		12pM	10pM
Anticuerpos	IC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [M]
H2aM10690N	Bloquea a alta concentración			
H4H10861P	6,3E-11		3,7E-11	
H4H10862P	8,4E-11		3,3E-11	
H4H10863P	6,9E-10		3,5E-10	4.3E-09
H4H10864P	3,6E-11		2,6E-11	
H4H10871P	3,2E-10		8,8E-11	6.7E-10
H4H10876P	4,6E-10		2,1E-10	8.8E-10
H4H10883P	1,4E-10		3,9E-11	
H4H10897P	4,6E-10		4,0E-10	1.5E-08
H4H10900P	3,1E-11		2,2E-11	
H4H10901P	5,6E-11		3,8E-11	
H4H10903P	1,4E-10		6,0E-11	
H4H10905P	5,1 E-10		2,1E-10	6.8E-10
H4H10906P		2,7E-11	4,7E-11	
H4H10907P	2,2E-10		1,4E-10	NB
H2aM11008N	1,8E-09			
H1M11009N	Bloquea a alta concentración			
Comparador 1	7,2E-10	2,2E-10	3,8E-10	6,1E-10
control isotipo 1	NB			
control isotipo 2	NB	NB	NB	NB

NB= no bloqueante.

Como se muestra en la tabla 13, hIL-25-MMH activado con valores EC₅₀ de 2,9 pM y 16 pM en dos días en ensayos separados; mIL-25-MMH activado con EC₅₀ de 19 pM; y mL-25-MMH activado con EC₅₀ de 8,4 pM.

Con respecto al bloqueo, 15 de los 17 anticuerpos de la invención bloquearon completamente la estimulación de las células HEK293/NFKB-Luc/hIL17RA/hIL17RB/hAct1 por 5pM hIL-25-MMH con

valores IC₅₀ en rango de 27 pM a 1,8 nM, mientras que el Comparador 1 bloqueó completamente con valores IC₅₀ de 720 pM y 220 pM en dos ensayos en días separados. Dos anticuerpos evaluados, H2aM10690N y H1M11009N, inhibieron parcialmente 5 pM hIL-25-MMH a altas concentraciones de anticuerpo. Todos los 14 anticuerpos de la invención evaluados bloquearon completamente la estimulación de células HEK293/NFκB-Luc/hIL17RA/hIL17RB/hAct1 por 12 pM mIL-25-MMH con valores IC₅₀ en rango desde 22pM a 400 pM, mientras que el Comparador 1 bloqueó completamente con un valor IC₅₀ de 380 pM. Cinco de los 6 anticuerpos de la invención evaluados bloquearon completamente la estimulación de células HEK293/NFκB-Luc/hIL17RA/hIL17RB/hAct1 por 10 pM de mIL-25-MMH con valores IC₅₀ en rango de 670 pM a 15 nM, mientras que el Comparador 1 bloqueó completamente con un valor IC₅₀ de 610 pM. Se evaluaron también anticuerpos control de isotipo y no mostraron inhibición en ninguno de los ensayos.

Ejemplo 7. Anticuerpos anti-IL-25 bloquean la señalización mediada por IL-25 en un ensayo basado en cultivo primario de células

La habilidad para bloquear anticuerpos anti-IL-25 de la invención fue evaluada usando un ensayo basado en cultivo primario de células usando células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) (véase Rickel y cols., *The Journal of Immunology*, 2008, vol. 181 (6) pp. 4299-4310).

PBMCs fueron purificados a partir de sangre total fresca obtenidas desde dos donates diferentes mediante centrifugación en gradiente de densidad. Brevemente, la sangre completa se diluyó dos veces en RPMI 1640, cuidadosamente se depositó sobre ficoll-paque (GE Healthcare, #17-1440-03) y se centrifugó durante 20 minutos. La capa de interfase que contiene las PBMCs fue aspirada, transferida a un nuevo tubo y lavada dos veces con PBS. Las PBMCs aisladas fueron plaqueadas en frascos de 75cm² a una concentración final de 2 X10⁶ células /ml en medio RPMI1640 suplementado con 10% FBS, 2mM L-glutamina, 100 U/mL penicilina y 100 ng/ml de estromalifoproteína tímica recombinante (TSLP; R&D Systems, #1398-TS/CF). Después de 24 horas, las células se recogieron, fueron lavadas en RPMI 1640, y sembradas en placas de 96 pocillos de fondo redondo a una concentración final de 3 X10⁵ células/ml en medio RPMI 1640 suplementado con 10% FBS, 2mM L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, y 100 µg/mL de estreptomycin. Las células fueron incubadas con 50 ng/ml de TSLP, 10 ng/ml de IL-2 humana (IL-2; R&D Systems, #202-ILICF), 1 nM de IL-25 humana expresada con una cola C-terminal myc-myc-hexahistidina(hIL-25-MMH; SEQ ID:273) y diluciones seriadas de anticuerpos de 200 nM a 48,8 pM en un volumen final de 200 µL por pocillo. Cada muestra se analizó por triplicado. Cuando los anticuerpos estaban presentes, se añadieron a las células después de 30 minutos de pre-incubación con IL- 25.

Las células se incubaron durante 72 horas a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO₂. Los niveles de IL-5 en el sobrenadante de cultivo fueron posteriormente medidos usando un ELISA disponibles en el mercado (R&D Systems, #DY205). Para ELISA, placas de fondo plano de 96 pocillos fueron recubiertas con el anticuerpo de captura, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de lavar y bloquear, 100µL sin diluir de sobrenadante de cultivo fue añadido a las placas y se incubaron durante 2 horas. Los posteriores lavados y detección se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se resumen en las tablas 14 y 15.

Tabla 14: Inducción de liberación de IL-5 desde PBMC humanas por hIL-25-MMH

[hIL-25-MMH]	IL-5 liberado de donante 727058-059 (ng/mL)		IL-5 liberado de donante 727060 (ng/mL)	
(M)	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
1E-09	0,071	0,021	0,599	0,088
0	0,014	0,007	0,083	0,022

Tabla 15: Bloqueo de liberación de IL-5 desde PBMC humanas inducida por hIL-25-MMH por anticuerpos anti-IL-25

Anticuerpo	Valores IC ₅₀ de anticuerpos para bloquear liberación de IL-5 del donante #727058-059 (M)	Valores IC ₅₀ de anticuerpos para bloquear liberación de IL-5 Del donante #727060 (M)
H4H10900P	3,921 E-11	5,781 e-01 0
H4H10864P	1,149E-09	6,771 e-01 0
H4H10871P	1,178E-10	6,363e-010
H4H10876P	1,720E-10	1,296e-010
Comparador 1	5,685E-09	1,590e-008

Como se muestra en la tabla 14, IL-25-MMH humano a 1 NM, en presencia de TSLP e IL-2, inducida por la liberación de 0,071 ng/ml de IL-5 desde PBMC total humana obtenidas de donante #727058-059 y 0,599ng/ml de IL-5 desde PBMC total humana obtenidas de donante #727060. Como se muestra en la tabla 15, los 4 anticuerpos anti-IL-25 de la invención evaluados bloquean la liberación de IL-5 humana desde PBMC inducida por 1 NM de hIL-25-MMH, con valores de IC₅₀ que van desde 39,2 pM a 1,149nM para donantes # 727058-059, y con los valores de IC₅₀ que van desde 129,6pM a 677,1 pM para donante #727060. Comparador 1 bloqueó la liberación de IL-5 con un valor de IC₅₀ de 5,685nM para donante #727058-059 y un valor IC₅₀ de 15,9 nM para donante #727060.

Este ejemplo confirma que anticuerpos anti-IL-25 de la invención son capaces de bloquear potentemente la señalización de IL-25 en células a un mayor grado que un anticuerpo Comparador anti-IL-25.

Ejemplo 8. Eosinofilia pulmonar inducida por entrega de DNA hidrodinámica de IL-25 (HDD), metaplasia de células caliciformes e IgE sérica elevada para Estudio in vivo de la eficacia de mAbs candidatos.

IL-25 humana aparecía sobreexpresada en ratones tipo silvestre (WT, por sus siglas en inglés) por entrega hidrodinámica del DNA (HOD). Para el experimento HOD, a los ratones WT se les inyecta con 25 µg de un plásmido que expresa IL-25 humana de longitud completa (consulte nm_022789.3; hIL-25 y también SEQ ID NO:277 (DNA) y SEQ ID NO:278 (proteína)) 277 (DNA) and SEQ 10 NO: O con 25µg del mismo plásmido sin la secuencia codificante (vector vacío). Un subconjunto de los ratones a los que se había inyectado con plásmido hIL-25 fueron inyectados por vía subcutánea con ya sea un anticuerpo IL-25 o una dosis equivalente de control de Isotipo de anticuerpo tres días antes de la inyección HOD, en el día de la inyección HOD y, a continuación, en el día 2 y 4 post-inyección HOD. Los ratones fueron sacrificados 7 días después de la inyección HOD, y la sangre y los pulmones se colectaron. Los niveles de IgE en suero se cuantificaron por ELISA; eosinofilia pulmonar se evaluó por aislamiento de células infiltradas en los pulmones tras tratamiento con collagenasa y citometría de flujo; y células caliciformes con metaplasia fueron evaluadas mediante cuantificación de ácido periódico Schiff (PAS) en secciones de pulmón teñidas.

Dosificación experimental y protocolo de tratamiento para grupos de ratones se muestran en las tablas 16A y 16B.

Tabla 16A: Estudio 1

Grupo	Ratones	n	Constructo	Anticuerpo	dosis mAb
1	WT	3	vector vacío	ninguno	
2	WT	5	hIL-25	Control isotipo	25 mg/kg
3	WT	5	hIL-25	Anti-IL-25 H4H10871P	25 mg/kg
4	WT	5	hIL-25	Anti-IL-25 H4H10900P	25 mg/kg

Tabla 16B: Estudio 2

Grupo	Ratones	n	Constructo	Anticuerpo	dosis mAb
1	WT	5	vector vacío	ninguno	
2	WT	4	hIL-25	ninguno	
3	WT	5	hIL-25	Anti-IL-25 H4H10871P	5 mg/kg

Medición de los niveles de IgE en circulación

Se obtuvieron muestras de sangre de cada ratón a través de punción cardiaca terminal utilizando una jeringa TB 27G1/2 de 1 ml (BD, # 309306) y la sangre recogida se colocó dentro de un tubo BO Microtainer® separador de suero (BD, # 365956). Después de la centrifugación, el suero se recogió y posteriormente fue trasladado a tubos nuevos.

Para determinar la concentración total de IgE en las muestras de suero, se usó un kit en sandwich ELISA Kit OPTEIA (BD, # 555248) se utiliza de acuerdo con las instrucciones del fabricante junto con LI opteia B Juego de reactivos (BD, # 550534). En resumen, las muestras de suero se diluyeron en diluyente de reactivo y se colocaron en placas de 96 pocillos recubiertos con un anticuerpo de captura anti-IgE. IgE de ratón purificado, suministrados por el fabricante, se utilizó como un patrón de referencia. Tras el lavado, IgE total ligado a la placa fue detectado mediante un anticuerpo biotinado anti-ratón IgE seguido por la adición de un conjugado estreptavidina-peroxidasa de rábano. El cromógeno 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina fue añadido posteriormente para producir una reacción colorimétrica y, a continuación, neutralizarse con ácido sulfúrico 1 M antes de medir la absorbancia a 450 nm en un lector de placas Spectramax M5 de Molecular Devices. El análisis de datos se realizó con software Prism" (Graph Pad). Las cantidades promedio de IgE en circulación para cada grupo experimental se expresan en ng/ml $\pm$ desviación estándar (SD), como se muestra en la tabla 18 y 19.

Colección de pulmón para análisis de infiltrado celular pulmonar.

Tras una exanguinación, el lóbulo caudal del pulmón derecho de cada ratón se retiró, se picó en cubos que fueron aproximadamente de 2 a 3 mm de tamaño, y se colocaron en un tubo que contenía una solución de 20 μ g/ml DNAsa (Roche, # 10104159001) y 0,7 U/ml liberasa TH (Roche, # 05401151001) diluido en solución salina equilibrada de Hank (HBSS) (Gibco, # 14025), que fue incubado en un baño de agua a 37°C durante 20 minutos y se agitó cada 5 minutos. La reacción fue detenida añadiendo ácido etilendiaminotetraacético (Gibco, # 15575) a una concentración final de 10 mM. Cada pulmón fue posteriormente disociado mediante un suave MACS dissociator" (Miltenyi Biotec, # 130-095 -937) y, a continuación, filtrado a través de un filtro 70 μ m y centrifugado. El sedimento pulmonar resultante fue resuspendido en 1 mL de tampón 1X de lisis eritrocitaria (Sigma, #R7757) para eliminar glóbulos rojos. Después de una incubación durante 3 minutos a temperatura

ambiente, 3 mL de 1X DMEM se añadió para desactivar el tampón de lisis de eritrocitos. Las suspensiones de células fueron luego centrifugadas, y la célula resultantes en el pellet fueron resuspendidas en 5 ml de tampón (tampón autoMACS, Miltenyi Biotec, # 130-091 -221). Las muestras resuspendidas se filtraron a través de un filtro 70 μ m y 1 X10⁶ células por pocillo fueron sembradas en una placa de 96 de fondo en V. Las células fueron centrifugadas y los pellets se lavaron en PBS 1X. Tras una segunda centrifugación, los pellets celulares fueron resuspendidos en 100 μ L de LIVE/DEAD(R) Fixable Aqua Dead Cell Stain (Life Technologies, #L34957) diluido a 1:1000 en 1X PBS para determinar la viabilidad de las células y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente mientras estuvo protegido de la luz. Después de un lavado en 1X PBS, las células se incubaron en una solución de tampón MACS que contiene 10 μ g/ml de bloque CD16/CD32 rata anti-ratón Fc, (clon: 2.4 G2; BD Biosciences, # 553142) durante 10 Minutos a 4 °C. Las células se lavaron una vez y, a continuación, se incubó en la mezcla apropiada de anticuerpo (como se describe en la tabla 17) diluido en tampón MACS durante 30 Minutos a 4 °C mientras está protegido de la luz. Tras la incubación con el anticuerpo, las células se lavaron dos veces en tampón MACS, fueron resuspendidas en BD Cytotfix (BD Biosciences, # 554655) y, a continuación, se incubó durante 15 Minutos a 4 °C mientras está protegido de la luz. Las células fueron posteriormente lavadas, resuspendidas en tampón MACS y, a continuación, se transfieren a BD FACS (BD Biosciences, # 352235) para el análisis de eosinófilos por citometría de flujo.

Los eosinófilos se definieron como Vivos, CD45+, GR1-, CD11clo, SiglecFhi. Los datos se expresan como la frecuencia de eosinófilos en la población de células inmunitarias (% de células CD45+ $\pm$ SD) como se muestra en la tabla 20 y 21.

Tabla 17: Anticuerpos empleados en análisis por citometría de flujo

Anticuerpo	Fluorocromo	Fabricante	Número catálogo	Dilución final
CD11c	APC	BD Biosciences	550261	1/100
CD45	PerCP Cy5.5	eBiosciences	45-0454-82	1/800
F4/80	Pacific Blue	eBiosciences	48-4801-82	1/200
Siglec-F	PE	BD Biosciences	552126	1/100
Ly6G (Gr-1)	APC-eFluor780	eBiosciences	47-5931-82	1/200

Cosecha de pulmón para análisis de metaplasia de células caliciformes

Tras una exanguinación, el pulmón izquierdo de cada ratón se retiró y se colocó en tubos que contienen 5 ml de una solución al 4% (p/v) paraformaldehído (Boston Bioproducts, #BM- 155) en 1 x Solución salina tamponada con fosfato y se almacenó a temperatura ambiente durante al menos 24 horas. Las muestras fueron pulmón seco fueron secadas y se transfirieron a tubos que contenían

etanol al 70 %. Las muestras se enviaron a Histoserv, Inc (Germantown, MD) para inclusión en parafina, corte y tinción con ácido periódico Schiff (PAS).

Las imágenes de las secciones teñidas con PAS de pulmón se realizaron utilizando un microscopio Zeiss Axio Imager A2 (objetivo 40X). La tinción positiva PAS para células se identificaron como las células caliciformes y se cuentan dentro de una sección de 1 a 2 mm de largo del epitelio de los bronquios principales. Los recuentos de células caliciformes se expresan en relación con el número total de células analizadas dentro de la sección del epitelio. Los datos se expresan como la frecuencia de células caliciformes $\pm$ SD y se muestran en la tabla 22.

Tabla 18: Los niveles de IgE de ratón total en circulación total del Estudio 1

Grupo	Ratones	n	Constructo	Anticuerpo	Niveles promedio de IgE circulante (ng/mL $\pm$ SD)
1	WT	vector vacío	ninguno		311 $\pm$ 200
2	WT	h1L-25	control isotipo	25 mg/kg	3417 $\pm$ 1627
3	WT	h1L-25	H4H10871P	25 mg/kg	333 $\pm$ 125
4	WT	h1L-25	H4H10900P	25 mg/kg	1240 $\pm$ 2233

Tabla 19: Los niveles de IgE de ratón total en circulación total del Estudio 2

Grupo	Ratones	n	Constructo	Anticuerpo	Niveles promedio de IgE circulante (ng/mL $\pm$ SD)
1	WT	vector vacío	ninguno		93 $\pm$ 71
2	WT	h1L-25	ninguno		1186 $\pm$ 1370 **
3	WT	h1L-25	H4H10871P	5 mg/kg	190 $\pm$ 99
4	WT	h1L-25	H4H10871P	25 mg/kg	118 $\pm$ 26

significación estadística es en comparación al grupo con vector vacío usando el test de Kruskal-Wallis con un post-test de comparación múltiple de Dunn se indica ($p < 0,001$).

Tabla 20: Frecuencia de eosinófilos en pulmón del Estudio 1

Grupo	Ratones	n	Constructo	Anticuerpo	Frecuencia promedio
-------	---------	---	------------	------------	---------------------

					de eosinófilos (% de células CD45+ $\pm$ SD)
1	WT	vector vacío	ninguno		1,47 $\pm$ 0,16
2	WT	h1L-25	control isotipo	25 mg/kg	17,20 $\pm$ 2,39
3	WT	h1L-25	H4H10871P	25 mg/kg	1,03 $\pm$ 0,16 **
4	WT	h1L-25	H4H10900P	25 mg/kg	1,36 $\pm$ 0,19

Significación estadística es en comparación al control Isotipo usando el test de Kruskal-Wallis con un post-test de comparación múltiple de Dunn se indica ($p < 0,001$).

Tabla 21: Frecuencia de eosinófilos en pulmón del Estudio 2

Grupo	Ratones	n	Constructo	Anticuerpo	Frecuencia promedio de eosinófilos (% de células CD45+ $\pm$ SD)
1	WT	vector vacío	ninguno		6,35 $\pm$ 1,46
2	WT	h1L-25	ninguno		32,29 $\pm$ 18,35
3	WT	h1L-25	H4H10871P	5 mg/kg	4,46 $\pm$ 1,66 *
4	WT	h1L-25	H4H10871P	25 mg/kg	5,23 $\pm$ 2,13

Significación estadística es en comparación a h1L-25 usando el test de Kruskal-Wallis con un post-test de comparación múltiple de Dunn se indica (** $p < 0,01$).

Tabla 22 : Metaplasia de células caliciformes Estudio 2

Grupo	Ratones	n	Constructo	Anticuerpo	Frecuencia promedio de células caliciformes (% células total en epitelio $\pm$ SD)
1	WT	Empty vector	None		1.15 $\pm$ 1.67
2	WT	h1L-25	None		59.63 $\pm$ 39. 74
3	WT	h1L-25	H4H10871P	5 mg/kg	1.71 $\pm$ 1.93
4	WT	h1L-25	H4H10871P	25 mg/kg	6.90 $\pm$ 11.55

Ratones silvestres sobreexpresando IL-25 humana por HOD demostraron niveles aumentados de IgE en circulación (3417 ± 1627 ng/ml para el estudio 1 y 1186 ± 1370 ng/ml para el estudio 2) en comparación con los ratones tipo silvestre con vector vacío por HOD (311 ± 200 ng/ml para el estudio 1 y 1186 ± 1370 ng/ml para el estudio 2). Los niveles de IgE en circulación se redujeron en cada uno de los estudios cuando los ratones que sobreexpresan IL-25 humana por HOD fueron tratados con anticuerpos IL-25, como se muestra en la tabla 18 y 19. Ratones silvestres que sobreexpresan IL-25 humana por HOD mostraron una tendencia hacia una mayor frecuencia de eosinófilos en pulmón ($17,20 \pm 2,39$ % para el estudio 1 y $32,29 \pm 18,35$ % para estudio 2) en comparación con los ratones silvestres con vector vacío por HOD ($1,47 \pm 0,16$ % para el estudio 1 y $6,35 \pm 1,46$ % para estudio 2). La frecuencia de eosinófilos en pulmón se redujo en cada uno de los estudios cuando los ratones que sobreexpresan IL-25 humana por HOD fueron tratados con anticuerpos IL-25, como se muestra en la tabla 20 y 21. Ratones silvestres que sobreexpresan IL-25 humano por HOD mostraron una tendencia hacia un aumento de metaplasia de células caliciformes ($59,63 \pm 39,74$ para el estudio 2) en comparación con los ratones silvestres con vector vacío por HOD ($1,15 \pm 1,67$ para el estudio 2). La frecuencia de metaplasia de células caliciformes se redujo en el estudio 2 cuando los ratones que sobreexpresan IL-25 humana por HOD fueron tratados con anticuerpos IL-25, como se muestra en la tabla 22.

Ejemplo 9: Inflamación pulmonar inducida por alérgeno de ácaros del polvo (HDM) en ratones silvestres y KO para IL-25.

Para determinar el papel de la IL-25 en un modelo in vivo relevante, se llevó a cabo un estudio de inflamación pulmonar inducida por alérgeno de ácaros del polvo (HDM) tanto en ratones tipo silvestre (WT, por sus siglas en inglés) y en ratones que eran homocigotos para la eliminación de IL-25 de ratón (ratones KO para IL-25).

A ratones KO para IL-25 y WT se les administró por vía intranasal $50\mu\text{g}$ de extracto de ácaros del polvo (HOM; Greer, #XPB7003A2.5) diluido en $20\mu\text{l}$ de 1X tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) o $20\mu\text{L}$ de 1 X PBS durante 5 días por semana durante 12 semanas. Todos los ratones fueron sacrificados el primer día de la décimotercera semana del estudio y sus pulmones se colectaron. Dosificación experimental y protocolo de tratamiento para grupos de ratones se muestran en la tabla 23.

Tabla 23: Dosificación experimental y protocolo de tratamiento para grupos de ratones

Grupo	Ratones	n	Desafío intranasal	Duración período desafío intranasal
1	WT	3	1X PBS (Salina)	12 semanas
2	WT	4	50IJg HOM en $20\mu\text{L}$ 1X PBS	12 semanas
3	IL-25 KO	4	1X PBS (Salina)	12 semanas

4	IL-25 KO	5	50IJg HOM en 20µL 1X PBS	12 semanas
---	----------	---	--------------------------	------------

Cosecha de pulmón para análisis infiltrado celular pulmonar

Tras una exanguinación, el lóbulo caudal del pulmón derecho de cada ratón se retiró, fue picado en los cubos que fueron de aproximadamente de 2 a 3 mm de tamaño, y se colocaron en un tubo que contiene una solución de 20 µg/ml DNase (Roche, # 10104159001) y 0,7 U/ml liberase TH (Roche, # 05401151001) diluido en solución salina equilibrada de Hank (HBSS) (Gibco, n° 14025), que se incuban en un baño de agua a 37°C durante 20 minutos y fueron invertidos cada 5 minutos. La reacción fue detenida añadiendo ácido etilendiaminotetraacético (Gibco, # 15575) a una concentración final de 10 mM. Cada pulmón fue posteriormente disociado utilizando un gentleMACS dissociator" (Miltenyi Biotec, # 130-095 -937) y, a continuación, fue filtrado a través de un filtro 70µm y se centrifugó. El pellet pulmonar resultante fue resuspendido en 1 mL de 1 X tampón de lisis eritrocitaria (Sigma, #R7757) para eliminar glóbulos rojos. Después de la incubación durante 3 minutos a temperatura ambiente, 3 ml de tampón (tampón autoMACS; Miltenyi Biotec, # 130-091 -221) fue añadido para desactivar el tampón de lisis de eritrocitos. Las suspensiones de células fueron centrifugadas, y el pellet de células resultante fue resuspendido en 5 ml de tampón MACS. Las muestras resuspendidas se filtraron a través de un filtro 70 µm y se colocaron 1 X1 06 células por pocillo en una placa con fondo en V de 96 pocillos. Las células fueron centrifugadas y los pellet se lavaron en 1X PBS. Tras una segunda centrifugación, los pellet celulares fueron resuspendidas en 100 µl LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain (Life Technologies, #L34957) diluido a 1:1000 en 1X PBS para determinar la viabilidad de las células y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente mientras está protegido de la luz. Después de un lavado en 1 X PBS, las células se incubaron en una solución de tampón MACS con 10 µg/ml de bloque Fc de rata CD16/CD32 purificado anti-ratón, (clon: 2.4 G2; BD Biosciences, # 553142) durante 10 Minutos a 4 °C. Las células se lavaron una vez y, a continuación, se incubó en una mezcla apropiada de anticuerpos (como se describe en la tabla 24) se diluyeron en tampón MACS durante 30 Minutos a 4 °C mientras está protegido de la luz.

Tras la incubación con el anticuerpo, las células se lavaron dos veces en tampón MACS, fueron resuspendidas en BD Cytotfix (BD Biosciences, # 554655) y, a continuación, se incubó durante 15 Minutos a 4 °C mientras está protegido de la luz. Las células fueron posteriormente lavadas, resuspendidas en tampón MACS y, a continuación, se transfirieron a tubos BD FACS (BD Biosciences, # 352235) para el análisis de los neutrófilos y linfocitos mediante citometría de flujo.

Los neutrófilos se definieron como vivos, CD45+, F4/80-, Ly6G+, Ly6CInt. Los datos de los neutrófilos se expresan como una frecuencia de células vivas analizadas (frecuencia de vivos, ± SD) como se muestra en la tabla 25. Las células CD4 y CO8 las células se definieron como vivos, SSClo, FSCLo, CD45+, CD19-, CD3+, CD8-, CD4+ y vivos, SSCLo, FSCLo, CD45+, CD19-, CD3+, CD8+, CD4-, respectivamente. Los datos de células T CD4 y CD8 se expresan como la frecuencia de linfocitos T

CD4 en relación con la frecuencia de células T CD8 (razón CD4/CD8, $\pm$ SD) como se muestra en la tabla 25. Células T CD4 activadas fueron definidas como vivas, , CD45+, SSCLo, FSCLo, CD3+, CD19-, CD4+, CD8-, y CD69+. Células T CD8 activadas fueron definidas como vivas, CD45+, SSCLo, FSCLo, CD3+, CD19-, CD4+, CD8-, y CD69+. Los datos de células activadas se expresa como la frecuencia de células activadas (CD69+) dentro de la población parental (frecuencia de células T CD4 o CD8 , $\pm$ SD) como se muestra en la tabla 25.

Tabla 24: Anticuerpos empleados en análisis por citometría de flujo

Anticuerpo	Fluorocromo	Fabricante	Número catálogo	Dilución final
CD11c	APC	BD Biosciences	550261	1/100
CD45	PerCP Cy5.5	eBiosciences	45-0454-B2	1/BOO
F41BO	Pacific Blue	eBiosciences	4B-4B01-B2	1/200
Siglec-F	PE	BD Biosciences	552126	1/100
Ly6G (Gr-1)	APC-eFluor7BO	eBiosciences	47-5931-B2	1/200
CD3	PE-Cy7	BD Biosciences	552774	1/200
CD19	eFluor 450	eBiosciences	4B-0193-B2	1/200
CD4	APC-H7	BD Biosciences	5601B1	1/200
COB	APC	eBiosciences	17-00B1-B2	1/200
CD69	PE	eBiosciences	12-0691-B2	1/200

Cosecha de pulmón para análisis de citoquinas:

Tras una exanguinación, los lóbulos craneal y medio del pulmón derecho de cada ratón fueron removidos y se colocaron en tubos que contienen una solución de reactivo de extracción de proteínas tisulares (1X reactivo T-PER Reactivo; Pierce, # 7 B510) complementado con 1X de cóctel inhibidor de proteasa HALT (Pierce, # 7 B430). Los pasos subsiguientes se llevaron a cabo en hielo. El volumen de reactivo T-PER (que contiene el cóctel inhibidor de proteasa) se ha ajustado para cada muestra para coincidir en un 1:7 p/v) razón de tejido a T-PER. Las muestras de pulmón fueron manualmente homogeneizadas en los tubos, usando morteros desechables (ARGOS Technologies, Cat P9950-901). El lisado resultante fue centrifugado para sedimentar los restos. Los sobrenadantes que contienen extractos de proteínas solubles fueron transferidos a tubos nuevos y almacenados a 4°C hasta su posterior análisis.

El contenido de proteína total en los extractos de proteína de pulmón se midió con un ensayo Bradford. Para el ensayo, 10 µl de muestras de extracto diluido fueron colocados en placas de 96 pocillos en duplicado y se mezclaron con 200 µl de 1X reactivo colorante (Biorad, #500-0006). Diluciones en serie de albúmina sérica bovina (Sigma, #A7979), partiendo en 700 µg/mL en 1X de reactivo T-PER fueron usados como estándar para determinar la concentración de extractos de proteína de los extractos. Tras un período de incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, se midió absorbancia a 595nm en un lector de placas SpectraMax M5 de Molecular Devices. El análisis de los datos para determinar contenido de proteína total se realizó utilizando el software GraphPad Prism™.

Las concentraciones de citoquinas en los extractos de proteínas del pulmón se midieron mediante un kit de inmunoensayo multiplex Proinflammatory Panel 1 (ratón) (MesoScale Discovery, #K15048D), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se agregaron 50 µL/pocillo de los calibradores y las muestras (diluido en el diluyente 41) a las placas con revestimiento previo con anticuerpos de captura y se incubó a temperatura ambiente agitando a 700 RPM durante 2 horas. A continuación, las placas se lavaron 3 veces con 1X PBS que contenía 0,05 % (p/v) Tween-20, seguido por la adición de 25 µl de solución de detección de anticuerpo diluido en Diluyente 45. Después de otra incubación por 2 horas a temperatura ambiente mientras se agita, la placa se lavó 3 veces, y se añadió 150 µl de 2X tampón de lectura a cada pocillo. La electroquimioluminiscencia fue inmediatamente leída en un instrumento MSD Spector(r). El análisis de datos se realizó utilizando el software GraphPad Prism™.

Cada concentración de citoquina en extractos de proteína total del pulmón medida fue normalizada con el contenido de proteína total de los extractos medido por ensayo de Bradford, y se expresa como pg de citoquina por mg de proteínas totales del pulmón (pg/mg proteína pulmonar, $\pm$ SD) como se muestra en la tabla 26.

Tabla 25: Frecuencia de infiltrado celular pulmonar según se ha determinado por citometría de flujo

Grupo Experimental	Frecuencia promedio de neutrófilos (% de células vivas, $\pm$ SD)	Promedio de razón <i>CD4/CD8</i> ($\pm$ SD)	Frecuencia promedio de células T <i>CD4+</i> activadas (% de células T <i>CD4</i> , $\pm$ SD)	Frecuencia promedio de células T <i>CD8+</i> activadas (% de células T <i>CD8</i> , $\pm$ SD)
WT Salina	6,57 $\pm$ 1,27 **	1,00 $\pm$ 0,07 **	10,74 $\pm$ 0,75 ***	3,01 $\pm$ 1,24 **
WTHDM	13,53 $\pm$ 2,63	3,89 $\pm$ 1,63	57,10 $\pm$ 4,03	26,18 $\pm$ 13,16
IL-25 KO Salina	5,98 $\pm$ 0,26 **	1,33 $\pm$ 0,21 **	10,16 $\pm$ 2,14 ***	5,51 $\pm$ 6,00 **
IL-25 KO HDM	6,89 $\pm$ 2,68 **	2,02 $\pm$ 0,48 *	38,65 $\pm$ 11,06 **	6,37 $\pm$ 3,10 **

La significación estadística comparado al grupo WT HDM determinado por ANOVA de 2 vías con post-test de comparación múltiple de Tukey se indica (**p<0,001; ***p<0,0001).

Tabla 26: Concentración de citoquinas en extractos de proteína en pulmón.

Grupo	Promedio de [IL-1 β] en extractos de proteína de pulmón (pg/mg proteína de pulmón) $\pm$ SD	Promedio de [TNF α] en extractos de proteína de pulmón (pg/mg proteína de pulmón) $\pm$ SD
Experimental		
WT Saline	0,24 $\pm$ 0,11 **	0,76 $\pm$ 0,22 ***
WTHOM	138,70 $\pm$ 70,17	11,42 $\pm$ 2,60
IL-25 KO Saline	0,49 $\pm$ 0,42 ***	0,78 $\pm$ 0,14 ***
IL-25 KO HOM	21,69 $\pm$ 17,90 **	5,01 $\pm$ 2,94 **

La significación estadística comparado al grupo WT HDM determinado por ANOVA de 2 vías con post-test de comparación múltiple de Tukey se indica (**p<0,001; ***p<0,0001).

Como se muestra en la tabla 25, la exposición a largo plazo o crónica a HDM en ratones WT indujo un aumento significativo en neutrofilia en el pulmón en comparación con los ratones expuestos a PBS solo. Desafío de HDM crónico en ratones WT también indujo un cambio en el balance de células T CD4 y CD8 en los pulmones, como también un aumento en la frecuencia de células T CD4 y CD8 activadas. El aumento de neutrofilia en el pulmón y estas otras características de inflamación celular de pulmón inducida por desafío crónico HDM, se vio significativamente reducida en ratones KO para IL-25 comparado con ratones WT. La exposición a largo plazo a HDM indujo un aumento significativo en los niveles de citoquinas proinflamatorias tal como IL-1 β y TNF α en los pulmones de ratones WT comparado ratones WT expuestos a PBS solo. En contraste, la exposición crónica de ratones KO para IL-25 a HDM no aumentó significativamente los niveles en el pulmón de estas dos citoquinas como se muestra en la tabla 26.

En resumen, la exposición crónica a HDM induce características de inflamación de pulmón en ratones WT que están ausentes en los pulmones de ratones KO para IL-25 que reciben el mismo desafío.

La presente invención no debe limitarse en su alcance en base a las realizaciones específicas aquí descritas. De hecho, varias modificaciones de la invención en adición a los que se describen aquí serán aparentes para aquellos expertos en el arte desde la descripción previa y las figuras acompañadas. Tales modificaciones se incluyen dentro del alcance de las reivindicaciones que se acompañan.