UNA NUEVA FORMA DE IL33, FORMAS MUTADAS DE IL33, ANTICUERPOS, ENSAYOS Y MÉTODOS PARA USAR LOS MISMOS

Inventores: Suzanne Cohen (GB/GB), David Lowe (GB/GB), Robin Butler (GB/GB), Ian Scott (GB/GB), Katherine Vousden (GB/GB), Martin Strain (GB/GB), Sara Carmen (GB/GB), Elizabeth England (GB/GB), Benjamin Kemp(GB/GB), Gareth Rees (GB/GB) Catherine Overed-Sayer (GB/GB), Tomas Mustelin (US/US) Matthew Sleeman (GB/GB) Kirsty Houslay (GB/GB)

La presente divulgación se refiere a nuevas formas de IL-33; a nuevos mutantes de IL-33; a proteínas de unión, tales como anticuerpos específicos para una cualquiera de dichas proteínas, en particular, proteínas de unión capaces de modular la cantidad de dicha forma presente; a composiciones que comprenden una proteína o una proteína de unión, tal como un anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación; y al uso de uno cualquiera de los mismos, en particular en un tratamiento, por ejemplo, en el tratamiento o la prevención de enfermedades inflamatorias. La divulgación del presente documento también se extiende a ensayos para identificar y/o cuantificar las diferentes formas de IL-33.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La interleucina-33 (IL-33), también denominada IL-1F11, es un miembro de la familia de citocinas de IL-1 que estimula la generación de células, citocinas e inmunoglobulinas características de una respuesta inmunitaria de tipo dos. La IL-33 es una proteína de 270 aminoácidos que consta de dos dominios: un homeodominio y un dominio similar a citocina (similar a IL-1). El homeodominio contiene una señal de localización nuclear

(NLS). La IL-33 media la transducción de señales a través de ST2, un receptor expresado en células Th2, mastocitos y una gran variedad de otros tipos celulares.

Schmitz *et al.* identificaron originariamente a la IL-33 como el ligando para el receptor huérfano ST2 (también denominado IL-1R4) (Schmitz *et al.*, *Immunity 23*(5)479-90 (2005)). El receptor de IL-33 está formado por moléculas heterodiméricas. ST2 y la proteína accesoria de IL-1R (IL-1RAcP) dimerizan para formar un receptor de IL-33 (ST2:IL-1RAcp). IL-1RAcP es un componente compartido de los receptores para IL-1α, IL-1β, IL-1F6, IL1F8 e IL1F9. IL-1RAcP no es necesario para la unión, pero es crucial para la señalización. El dominio TIR del receptor de IL-33 recluta a MyD88 y TRAF6 y la señal del receptor da como resultado la activación de las vías de NFκB y MAP cinasa (Oboki *et al., Allergology International 59:*143-160 (2010)). El receptor de IL-33 puede asociarse potencialmente con otros receptores y se ha comunicado que interactúa con c-kit en los mastocitos (Drube *et al.*, Blood 115:3899-3906 (2010))

Recientemente, se ha demostrado que IL-33 se une a un segundo complejo heterodimérico de receptor de IL-33: ST2 también forma un complejo con otra molécula de la familia de IL-1R, "molécula relacionada con IL-1R de Ig individual" (SIGIRR) (también denominada IL-1R8 de Toll (TIR8)) para formar ST2:SIGIRR. Se considera que SIGIRR/TIR8 actúa como regulador negativo de IL-1R y de las respuestas inmunitarias mediadas por el receptor de tipo Toll (TLR) (Garlanda *et al.*, *Trends Immunol. 30*:439-46 (2009)). A diferencia de ST2:IL-1RAcP, ST2:SIGIRR parece ser un regulador negativo de la IL-33 (Oboki *et al.* (2010)).

El único ligando conocido del receptor ST2 es IL-33 (véase, por ejemplo, Schmitz *et al.*, *Immunity 23*(5)479-90 (2005); Chackerian *et al.*, *J. Immunol. 179*(4):2551-5 (2007)). El receptor ST2 se expresa de manera basal por las células Th2 y los mastocitos, siendo conocidos ambos tipos celulares por ser mediadores importantes del asma alérgica. La forma extracelular de IL-33 estimula a las células diana mediante la unión a ST2 y posteriormente activa las vías de NFκB y MAP cinasa, dando lugar a una serie de respuestas funcionales que incluyen la producción de citocinas y quimiocinas. Se cree que ST2 soluble (sST2) es un receptor señuelo que previene la señalización de IL-33.

En seres humanos, se observó que IL-33 está expresada de manera constitutiva en el músculo liso y los epitelios bronquiales. Su expresión puede inducirse mediante IL-1β y TNF-α en los fibroblastos del pulmón y dérmicos (Schmitz *et al*. (2005)). Los niveles de proteína ST2 soluble y de ARNm/proteína IL-33 están aumentados en sueros y tejidos de pacientes con asma (Oboki *et al., Allergology International 59:*143-160 (2010)).

In vivo, IL-33 induce la expresión de IL-4, IL-5 e IL-13 y da lugar a cambios patológicos graves en los órganos mucosos. La administración de IL-33 a ratones tiene potentes efectos inflamatorios, incluyendo una eosinofilia masiva en sangre, niveles séricos de Il-5 e IgE aumentados e hiperplasia de células caliciformes en las superficies mucosas (Schmitz *et al*. (2005)). La administración intraperitoneal o intranasal de IL-33 a ratones dio lugar a la inducción de inflamación eosinofílica en la mucosa pulmonar e intestinal a través de las vías dependientes de IL-13 y STAT6 (Oboki *et al.* (2010)). Por consiguiente, la

IL-33 puede desempeñar un papel en enfermedades alérgicas, tales como asma y otras enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias.

Algunos artículos de la bibliografía sugieren que las células caliciformes secretan CXCL8/IL-8 y esto se ve aumentado por la IL-33 a través de la vía de ST2R-ERK, lo que sugiere un mecanismo para el aumento de la inflamación de las vías respiratorias en las vías respiratorias asmáticas con metaplasia de células caliciformes (Clin Exp Allergy. Abril de 2014;44(4):540-52)

Por lo tanto, la IL-33 ha atraído interés como diana terapéutica. Sin embargo, aún están por dilucidar completamente los beneficios terapéuticos del bloqueo de esta diana terapéutica. Los presentes inventores han determinado por primera vez que la IL-33 existe en una forma reducida (también citada en el presente documento como redIL-33) y una forma oxidada. Los inventores han caracterizado por primera vez la forma oxidada de IL-33, tal como se describe en el presente documento. Los estudios *in vitro* e *in vivo* por parte de los inventores han demostrado la desaparición de redIL-33 (la forma reducida) correlacionada con la aparición de IL-33 oxidada. En fluidos fisiológicos *in vitro*, redIL-33 se oxida rápidamente para dar lugar a una forma unida por disulfuro. La forma oxidada (también citada en el presente documento como IL-33-DSB) tiene al menos un (por ejemplo, dos) enlaces disulfuro, entre las cisteínas seleccionadas entre el grupo de Csy208, Cys 227, Cys 232 y Cys259 (numeradas en referencia a IL-33 humana de longitud completa, tal como se divulga en UniProt 097560, cuyos restos 112 a 270 se citan en la SEQ ID NO. 632**)**. Previamente no se había caído en la

cuenta de que los ensayos disponibles comercialmente parecen detectar predominantemente esta forma oxidada. Por lo tanto, los presentes inventores necesitaron diseñar ensayos para detectar de manera selectiva la redIL-33 que es responsable de la interacción con ST2 y que dirige la actividad biológica asociada con la liberación de IL-33.

La forma reducida parece ser la forma activa de la proteína, que genera la cascada de señales y de hecho, *in vivo* parece ser que la forma reducida se convierte en la forma oxidada a modo de mecanismo para terminar la señalización a través de ST2. Los presentes inventores han descubierto que redIL-33 se une a ST2 (Fig 24A). Por el contrario, IL-33-DSB no mostró unión a ST2 (Fig 24B). Esto ha permitido a los inventores barajar la hipótesis de que la oxidación *in vivo* podría ser un mecanismo para desactivar la actividad de IL-33-ST2. Además, los presentes inventores han determinado por primera vez que la forma oxidada de IL-33 (IL-33-DSB) se une al receptor para los productos finales de glucación avanzada (RAGE) y señaliza a través de esta vía alternativa (Fig. 56).

Los presentes inventores creen que este entendimiento puede utilizarse para generar agentes terapéuticos más eficaces. En una realización, los presentes inventores han identificado un anticuerpo que se une preferencialmente a la forma oxidada, pero que sorprendentemente atenúa la actividad de la forma reducida catalizando esencialmente la conversión de la forma reducida a la forma oxidada. Ventajosamente, este mecanismo simplemente aumenta el mecanismo *in vivo* para terminar la señalización a través de ST2.

En otra realización, los inventores han identificado un anticuerpo que se une preferencialmente a la forma reducida de IL-33 (redIL-33), con afinidad femtomolar, y atenúa y/o inhibe la señalización mediada por IL-33 a través de ST2. Este anticuerpo proporciona por primera vez un mecanismo para tratar o prevenir respuestas inflamatorias mediadas por IL-33/ST2.

En una realización más, los anticuerpos de la presente invención pueden atenuar o inhibir la vía de señalización no reconocida previamente para IL-33-DSB a través de RAGE y cualquier efecto mediado por IL-33/RAGE. Los anticuerpos de la presente invención pueden actuar uniéndose directamente a IL-33-DSB y atenuando o inhibiendo la interacción de ligando/receptor con RAGE o como alternativa, pueden unirse a redIL-33 y prevenir o reducir su conversión a IL-33-DSB, atenuando de este modo de manera indirecta la interacción de ligando/receptor con RAGE.

BREVE COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

Por lo tanto, en un primer aspecto se proporciona IL-33 aislada en una forma reducida (redIL-33) o un fragmento de unión de la misma.

En un aspecto, se proporciona una proteína IL-33 aislada estabilizada en una forma reducida mediante una modificación que impide la formación de puentes disulfuro entre las cisteínas nativas. Dichas modificaciones pueden comprender la eliminación de uno o más restos de cisteínas, mutaciones que reemplazan una o más cisteínas nativas por un aminoácido alternativo y/o conjugación a una entidad química.

En una realización, se proporciona una forma mutada de IL-33 como se describe en el presente documento, en

particular, tal como se muestra en las SEQ ID NO: 634 a 648.

En una realización, la entidad química es biotina, que reduce o elimina la capacidad de redIL-33 para convertirse en IL-33-DSB.

En un aspecto, se proporciona una IL-33 mutante en donde se reemplazan una o más cisteínas por un aminoácido no de cisteína, por ejemplo, en donde una, dos, tres, cuatro o más cisteínas seleccionadas entre Cys-208, Cys-227, Cys-232 y Cys-259 se reemplazan, por ejemplo, por un aminoácido tal como serina. En una realización, el resto de cisteína se selecciona independientemente entre Cys-208, Cys-227, Cys-232 y Cys-259. Por lo tanto, en una realización, un mutante de acuerdo con la presente divulgación es incapaz de formar uno o ambos enlaces disulfuro en la IL-33-DSB.

En una realización, la presente divulgación se refiere a una molécula de unión aislada que atenúa la actividad de redIL-33, incluyendo una forma estabilizada de la misma de acuerdo con la presente divulgación, por ejemplo, inhibe dicha actividad. En una realización, la atenuación es a través de la unión específica a redIL-33. En una realización, la atenuación es a través de la unión a IL-33-DSB, por ejemplo, catalizando o acelerando la conversión de redIL-33 a IL-33-DSB.

En una realización, la atenuación regula negativamente o desactiva la señalización dependiente de ST2.

En determinadas realizaciones, la molécula de unión o el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente divulgación inhibe la producción de citocinas dirigida por IL-33, por ejemplo, en mastocitos.

En una realización, la atenuación regula negativamente o previene la liberación de IL-5 a través de la vía de ST2.

En una realización, la atenuación regula negativamente o previene la activación de eosinófilos.

En una realización, la atenuación regula negativamente o previene la liberación de NFκB. En una realización, la atenuación regula negativamente o previene la liberación de IL-4. En una realización, la atenuación regula negativamente o previene la liberación de IL-6. En una realización, la atenuación regula negativamente o previene la liberación de IL-8. En una realización, la atenuación regula negativamente o previene la liberación de IL-13.

En determinadas realizaciones, la molécula de unión o el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente divulgación atenúa o inhibe la señalización mediada porIL-33/RAGE. La atenuación o la inhibición de la señalización mediada por RAGE puede potenciar la migración epitelial en relación con la observada en una respuesta inflamatoria impulsada por IL-33 no modulada (véase la Fig. 58). Dicha migración epitelial potenciada puede desempeñar un papel en la reparación tisular y la curación de heridas, particularmente en el tejido pulmonar, tal como el epitelio pulmonar.

En una realización, la presente divulgación se refiere a una molécula de unión aislada que se une específicamente a redIL-33 o a un fragmento de unión de redIL-33.

En una realización, la presente divulgación se refiere a una molécula de unión aislada que se une específicamente a redIL-33 e inhibe la unión de la misma a ST2.

En una realización, la presente divulgación se refiere a una molécula de unión aislada que se une específicamente

a redIL-33 e inhibe la señalización de redIL-33 bloqueando físicamente la interacción de IL-33 con su receptor.

En una realización, la presente divulgación se refiere a una molécula que se une a IL-33 y cataliza la conversión de redIL-33 a IL-33-DSB, por lo tanto regulando negativamente o desactivando la señalización de ST-2.

En una realización, la presente divulgación se refiere a una molécula de unión con un modo de acción competitivo.

En una realización, la presente divulgación se refiere a una molécula de unión con un modo de acción alostérico.

En algunas realizaciones, la molécula de unión de la invención comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

La siguiente fórmula emplea el código de una sola letra para los aminoácidos.

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo comprende una CDRH1 de fórmula (I):

SYAM**X** (I)

en donde X es un aminoácido, por ejemplo, S o N, tal como S.

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo comprende una CDRH2 de fórmula (II):

$\mathbf{X_1}$I$\mathbf{X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}}YAD\mathbf{X_{12}}$VKG (II)

en donde:

X_1 es A, G o S, en particular, A o G, tal como A;

X_2 es A, D, G, N, S, en particular A, D o S, tal como S;

X_3 es A, D o G, en particular A o G, tal como G

X_4 está ausente o es D, en particular, está ausente;

X_5 está ausente o es G, en particular, está ausente;

X_6 es D, I o S, en particular I o S, tal como S;

X_7 es D, F, G o S, en particular D o G, tal como G;

X_8 es D, G, Q, S, T, en particular G, Q o T, tal como G;

X_9 es R o S, en particular S;

X_{10} es P o T, en particular P;

X_{11} es H o Y, en particular Y; y

X_{12} es P o S, en particular S.

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo comprende una CDRH3 de fórmula (III):

$$\mathbf{X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}}\text{GGLRYP}\mathbf{X_{22}} \quad \text{(III)}$$

en donde:

X_{13} es A, D, H, L o Q, en particular D o Q, tal como D;

X_{14} es K o L, en particular K;

X_{15} es F o W, en particular F;

X_{16} es I o M, en particular M;

X_{17} es Q o E, en particular Q;

X_{18} es L o N, en particular L;

X_{19} es W o Y, en particular W;

X_{20} es A, G o V, en particular G; y

X_{21} es F o L, en particular F.

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo

comprende una CDRH1 de formula (I) y una CDRH2 de fórmula (II), como se han definido anteriormente.

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una CDRH1 de formula (I) y una CDRH3 de fórmula (III), como se han definido anteriormente.

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una CDRH2 de formula (II) y una CDRH3 de fórmula (III), como se han definido anteriormente.

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una CHRH1 de fórmula (I), una CDRH2 de formula (II) y una CDRH3 de fórmula (III), como se han definido anteriormente.

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo comprende una CDRL1 de fórmula (IV):

$$SGE\mathbf{X_{22}X_{23}}GDKYAA \quad (IV)$$

en donde:

X_{22} es un aminoácido, por ejemplo R o G, en particular R; y

X_{23} es un aminoácido, por ejemplo M o I, en particular M.

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo comprende una CDRL2 de fórmula (V):

$$X_{24}\mathbf{DTKRPS} \quad (V)$$

en donde:

X_{24} es un aminoácido, por ejemplo Q o R, en particular R.

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo comprende una CDRL3 de fórmula (VI):

$$\mathbf{X_{25}VX_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}X_{31}X_{32}X_{33}} \quad \text{(VI)}$$

en donde:

X_{25} es E, G o Q, en particular G o Q, tal como G;

X_{26} es I, K, L o W, en particular L o W, tal como W;

X_{27} es A, D, K, Q, R o V, en particular D o K, tal como K;

X_{28} es A, D, K, Q o S, en particular Q o S, tal como S;

X_{29} es D, N o S, en particular D o S, tal como D;

X_{30} es D, S o T, en particular D o S, tal como D;

X_{31} está ausente o es T, en particular está ausente;

X_{32} es G o P, en particular G; y

X_{33} es I o V, en particular V.

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo comprende una CDRL1 de fórmula (IV) y una CDRL2 de fórmula (V), como se han definido anteriormente.

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo comprende una CDRL1 de fórmula (IV) y una CDRL3 de fórmula (VI), como se han definido anteriormente.

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo comprende una

CDRL2 de fórmula (V) y una CDRL3 de fórmula (VI), como se han definido anteriormente.

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una CDRL1 de fórmula (IV), una CDRL2 de formula (V) y una CDRL3 de fórmula (VI), como se han definido anteriormente.

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo comprende la CDRH1 de fórmula (I) y la CDRL1 de fórmula (IV).

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo comprende la CDRH1 de fórmula (I) y la CDRL2 de fórmula (V).

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo comprende la CDRH1 de fórmula (I) y la CDRL3 de fórmula (VI).

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo comprende la CDRH2 de fórmula (II) y la CDRL1 de fórmula (IV).

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo comprende la CDRH2 de fórmula (II) y la CDRL2 de fórmula (V).

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo comprende la CDRH2 de fórmula (II) y la CDRL3 de fórmula (VI).

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo comprende la CDRH3 de fórmula (III) y la CDRL1 de fórmula (IV).

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo comprende la CDRH3 de fórmula (III) y la CDRL2 de fórmula (V).

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo comprende la CDRH3 de fórmula (III) y la CDRL3 de fórmula (VI).

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo comprende la CDRH1 de fórmula (I), la CDRH2 de fórmula (II) y la CDRL1 de fórmula (IV).

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo comprende la CDRH1 de fórmula (I), la CDRH2 de fórmula (II) y la CDRL2 de fórmula (V).

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo comprende la CDRH1 de fórmula (I), la CDRH2 de fórmula (II) y la CDRL3 de fórmula (VI).

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo comprende la CDRH1 de fórmula (I), la CDRH3 de fórmula (III) y la CDRL1 de fórmula (IV).

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo comprende la CDRH1 de fórmula (I), la CDRH3 de fórmula (III) y la CDRL2 de fórmula (V).

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo comprende la CDRH1 de fórmula (I), la CDRH3 de fórmula (III) y la CDRL3 de fórmula (VI).

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo comprende la CDRH2 de fórmula (II), la CDRH3 de fórmula (III) y la CDRL1 de fórmula (IV).

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo comprende la CDRH2 de fórmula (II), la CDRH3 de fórmula (III) y la CDRL2 de fórmula (V).

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo comprende la CDRH2 de fórmula (II), la CDRH3 de fórmula (III) y la CDRL3 de fórmula (VI).

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo comprende la CDRH1 de fórmula (I), la CDRH2 de fórmula (II), la CDRH3 de fórmula (III) y la CDRL1 de fórmula (IV).

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo comprende la CDRH1 de fórmula (I), la CDRH2 de fórmula (II), la CDRH3 de fórmula (III) y la CDRL2 de fórmula (V).

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo comprende la CDRH1 de fórmula (I), la CDRH2 de fórmula (II), la CDRH3 de fórmula (III) y la CDRL3 de fórmula (VI).

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo comprende la CDRH1 de fórmula (I), la CDRH2 de fórmula (II), la CDRH3 de fórmula (III), la CDRL1 de fórmula (IV) y la CDRL2 de fórmula (V).

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo comprende la CDRH1 de fórmula (I), la CDRH2 de fórmula (II), la CDRH3 de fórmula (III), la CDRL1 de fórmula (IV) y la CDRL3 de fórmula (VI).

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo comprende la CDRH1 de fórmula (I), la CDRH2 de fórmula (II), la CDRH3 de fórmula (III), la CDRL2 de fórmula (V) y la CDRL3 de fórmula (VI).

En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo comprende la CDRH1 de fórmula (I), la CDRH2 de fórmula (II), la CDRH3 de fórmula (III), la CDRL1 de fórmula (IV), la CDRL2 de fórmula (V) y la CDRL3 de fórmula (VI).

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende 3 CDR, por ejemplo, en una región variable de cadena pesada seleccionada independientemente de SEQ ID NO: 3, 4, 5, 13, 14, 15, 23, 24, 25, 33, 34, 35, 43, 44, 45, 53, 54, 55, 63, 64, 65, 73, 74, 75, 83, 84, 85, 93, 94, 95, 103, 104, 105, 113, 114, 115, 153, 154, 155, 163, 164, 165, 173, 174, 175, 183, 184, 185, 193, 194, 195, 203, 204, 205, 213, 214, 215, 223, 224, 225, 233, 234, 235, 243, 244, 245, 253, 254, 255, 263, 264, 265, 273, 274, 275, 283, 284, 285, 293, 294, 295, 303, 304, 305, 313, 314, 315, 353, 354, 355, 363, 364, 365, 373, 374, 375, 383, 384, 385, 393, 394, 395, 403, 404, 405, 413, 414, 415, 453, 454, 455, 463, 464, 465, 473, 474, 475, 483, 484, 485, 493, 494, 495, 503, 504, 505, 513, 514, 515, 553, 554, 555, 563, 564, 565, 573, 574, 575, 583, 584 y 585.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende 3 CDR, por ejemplo, en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente de SEQ ID NO: 8, 9, 10, 18, 19, 20, 28, 29, 30, 38, 39, 40, 48, 49, 50, 58, 59, 60, 68, 69, 70, 78, 79, 80, 88, 89, 90, 98, 99, 100, 108, 109, 118, 119, 120, 158, 159, 160, 168,

169, 170, 178, 179, 180, 188, 189, 190, 198, 199, 200, 208, 209, 210, 218, 219, 220, 228, 229, 230, 238, 239, 240, 248, 249, 250, 258, 259, 260, 268, 269, 270, 278, 279, 280, 288, 289, 290, 298, 299, 300 308, 309, 310, 318, 319, 320, 328, 329, 330, 338, 339, 340, 348, 349, 350, 358, 359, 360, 368, 369 370 378, 379, 380, 388, 389, 390, 398, 399, 400, 408, 409, 410, 418, 419, 420, 428, 429, 430, 438, 439, 440, 448, 449, 450, 458, 459, 460, 468, 469, 470, 478, 479, 480, 488, 489, 490, 498, 499, 500 508, 509, 510, 518, 519, 520, 528, 529, 530, 538, 539, 540, 548, 549, 550, 558, 559, 560, 568, 569, 570, 578, 579, 580, 588, 589, y 590.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende 3 CDR, por ejemplo, en una región variable de cadena pesada seleccionada independientemente de SEQ ID NO: 3, 4, 5, 13, 14, 15, 23, 24, 25, 33, 34, 35, 43, 44, 45, 53, 54, 55, 63, 64, 65, 73, 74, 75, 83, 84, 85, 93, 94, 95, 103, 104, 105, 113, 114, 115, 153, 154, 155, 163, 164, 165, 173, 174, 175, 183, 184, 185, 193, 194, 195, 203, 204, 205, 213, 214, 215, 223, 224, 225, 233, 234, 235, 243, 244, 245, 253, 254, 255, 263, 264, 265, 273, 274, 275, 283, 284, 285, 293, 294, 295, 303, 304, 305, 313, 314, 315, 353, 354, 355, 363, 364, 365, 373, 374, 375, 383, 384, 385, 393, 394, 395, 403, 404, 405, 413, 414, 415, 453, 454, 455, 463, 464, 465, 473, 474, 475, 483, 484, 485, 493, 494, 495, 503, 504, 505, 513, 514, 515, 553, 554, 555, 563, 564, 565, 573, 574, 575, 583, 584 y 585y 3 CDR, por ejemplo, en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente de SEQ ID NO: 8, 9, 10, 18, 19, 20, 28, 29, 30, 38, 39, 40, 48, 49, 50, 58, 59, 60, 68, 69, 70, 78, 79, 80, 88, 89, 90, 98, 99, 100, 108, 109, 118, 119, 120, 158, 159, 160, 168, 169, 170, 178, 179, 180, 188, 189, 190,

198, 199, 200, 208, 209, 210, 218, 219, 220, 228, 229, 230, 238, 239, 240, 248, 249, 250, 258, 259, 260, 268, 269, 270, 278, 279, 280, 288, 289, 290, 298, 299, 300 308, 309, 310, 318, 319, 320, 328, 329, 330, 338, 339, 340, 348, 349, 350, 358, 359, 360, 368, 369 370 378, 379, 380, 388, 389, 390, 398, 399, 400, 408, 409, 410, 418, 419, 420, 428, 429, 430, 438, 439, 440, 448, 449, 450, 458, 459, 460, 468, 469, 470, 478, 479, 480, 488, 489, 490, 498, 499, 500 508, 509, 510, 518, 519, 520, 528, 529, 530, 538, 539, 540, 548, 549, 550, 558, 559, 560, 568, 569, 570, 578, 579, 580, 588, 589, y 590.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 3, 4 y 5, por ejemplo, las SEQ ID NO: 3 y 4, las SEQ ID NO: 3 y 5 o las SEQ ID NO: 4 y 5, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 3 para CDRH1, la SEQ ID NO: 4 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 5 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 13, 14 y 15, por ejemplo, las SEQ ID NO: 13 y 14, las SEQ ID NO: 13 y 15 o las SEQ ID NO: 14 y 15, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 13 para CDRH1, la SEQ ID NO: 14 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 15 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 23, 24 y 25, por ejemplo, las SEQ ID NO: 23 y 24, las SEQ ID NO: 23 y 25 o las SEQ ID NO: 24 y 25, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la

SEQ ID NO: 23 para CDRH1, la SEQ ID NO: 24 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 25 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 33, 34 y 35, por ejemplo, las SEQ ID NO: 33 y 34, las SEQ ID NO: 33 y 35 o las SEQ ID NO: 34 y 35, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 33 para CDRH1, la SEQ ID NO: 34 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 35 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 43, 44 y 45, por ejemplo, las SEQ ID NO: 43 y 44, las SEQ ID NO: 43 y 45 o las SEQ ID NO: 44 y 45, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 43 para CDRH1, la SEQ ID NO: 44 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 45 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 53, 54 y 55, por ejemplo, las SEQ ID NO: 53 y 54, las SEQ ID NO: 53 y 55 o las SEQ ID NO: 54 y 55, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 53 para CDRH1, la SEQ ID NO: 54 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 55 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 63, 64 y 65, por ejemplo, las SEQ ID NO: 63 y 64, las SEQ ID NO: 63 y 65 o las SEQ ID NO: 64 y 65, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 63 para CDRH1, la SEQ ID NO: 64 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 65 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 73, 74 y 75, por ejemplo, las SEQ ID NO: 73 y 74, las SEQ ID NO: 73 y 75 o las SEQ ID NO: 74 y 75, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 73 para CDRH1, la SEQ ID NO: 74 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 75 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 83, 84 y 85, por ejemplo, las SEQ ID NO: 83 y 84, las SEQ ID NO: 83 y 85 o las SEQ ID NO: 84 y 85, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 83 para CDRH1, la SEQ ID NO: 84 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 85 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 93, 94 y 95, por ejemplo, las SEQ ID NO: 93 y 94, las SEQ ID NO: 93 y 95 o las SEQ ID NO: 94 y 95, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 93 para CDRH1, la SEQ ID NO: 94 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 95 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 103, 104 y 105, por ejemplo, las SEQ ID NO: 103 y 104, las SEQ ID NO: 103 y 105 o las SEQ ID NO: 104 y 105, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 103 para CDRH1, la SEQ ID NO: 104 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 105 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 113, 114 y 115, por ejemplo, las SEQ ID NO:

113 y 114, las SEQ ID NO: 113 y 115 o las SEQ ID NO: 114 y 115, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 113 para CDRH1, la SEQ ID NO: 114 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 115 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 123, 124 y 125, por ejemplo, las SEQ ID NO: 123 y 124, las SEQ ID NO: 123 y 125 o las SEQ ID NO: 124 y 25, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 123 para CDRH1, la SEQ ID NO: 124 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 125 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 133, 134 y 135, por ejemplo, las SEQ ID NO: 133 y 134, las SEQ ID NO: 133 y 135 o las SEQ ID NO: 134 y 135, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 133 para CDRH1, la SEQ ID NO: 134 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 135 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 143, 144 y 145, por ejemplo, las SEQ ID NO: 143 y 144, las SEQ ID NO: 143 y 145 o las SEQ ID NO: 144 y 145, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 143 para CDRH1, la SEQ ID NO: 144 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 145 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 153, 154 y 155, por ejemplo, las SEQ ID NO: 153 y 154, las SEQ ID NO: 153 y 155 o las SEQ ID NO: 154 y 155, tal como una región variable de cadena pesada que

comprende la SEQ ID NO: 153 para CDRH1, la SEQ ID NO: 154 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 155 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 163, 164 y 165, por ejemplo, las SEQ ID NO: 163 y 164, las SEQ ID NO: 163 y 165 o las SEQ ID NO: 164 y 165, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 163 para CDRH1, la SEQ ID NO: 164 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 165 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 173, 174 y 175, por ejemplo, las SEQ ID NO: 173 y 174, las SEQ ID NO: 173 y 175 o las SEQ ID NO: 174 y 175, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 173 para CDRH1, la SEQ ID NO: 174 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 175 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 183, 184 y 185, por ejemplo, las SEQ ID NO: 183 y 184, las SEQ ID NO: 183 y 185 o las SEQ ID NO: 184 y 185, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 183 para CDRH1, la SEQ ID NO: 184 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 185 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 193, 194 y 195, por ejemplo, las SEQ ID NO: 193 y 194, las SEQ ID NO: 193 y 95 o las SEQ ID NO: 194 y 195, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 193 para CDRH1, la SEQ ID NO: 194 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 195 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 203, 204 y 205, por ejemplo, las SEQ ID NO: 203 y 204, las SEQ ID NO: 203 y 205 o las SEQ ID NO: 204 y 205, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 203 para CDRH1, la SEQ ID NO: 204 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 205 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 213, 214 y 215, por ejemplo, las SEQ ID NO: 213 y 214, las SEQ ID NO: 213 y 215 o las SEQ ID NO: 214 y 215, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 213 para CDRH1, la SEQ ID NO: 214 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 215 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 223, 224 y 225, por ejemplo, las SEQ ID NO: 223 y 224, las SEQ ID NO: 223 y 225 o las SEQ ID NO: 224 y 225, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 223 para CDRH1, la SEQ ID NO: 224 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 225 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 233, 234 y 235, por ejemplo, las SEQ ID NO: 233 y 234, las SEQ ID NO: 233 y 235 o las SEQ ID NO: 234 y 235, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 233 para CDRH1, la SEQ ID NO: 234 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 235 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 243, 244 y 245, por ejemplo, las SEQ ID NO:

243 y 244, las SEQ ID NO: 243 y 245 o las SEQ ID NO: 244 y 245, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 243 para CDRH1, la SEQ ID NO: 244 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 245 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 253, 254 y 255, por ejemplo, las SEQ ID NO: 253 y 254, las SEQ ID NO: 253 y 255 o las SEQ ID NO: 254 y 255, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 253 para CDRH1, la SEQ ID NO: 254 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 255 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 263, 264 y 265, por ejemplo, las SEQ ID NO: 263 y 264, las SEQ ID NO: 263 y 265 o las SEQ ID NO: 264 y 265, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 263 para CDRH1, la SEQ ID NO: 264 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 265 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 273, 274 y 275, por ejemplo, las SEQ ID NO: 273 y 274, las SEQ ID NO: 273 y 275 o las SEQ ID NO: 274 y 275, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 273 para CDRH1, la SEQ ID NO: 274 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 275 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 283, 284 y 285, por ejemplo, las SEQ ID NO: 283 y 284, las SEQ ID NO: 283 y 285 o las SEQ ID NO: 284 y 285, tal como una región variable de cadena pesada que

comprende la SEQ ID NO: 283 para CDRH1, la SEQ ID NO: 284 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 285 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 293, 294 y 295, por ejemplo, las SEQ ID NO: 293 y 294, las SEQ ID NO: 293 y 295 o las SEQ ID NO: 294 y 295, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 293 para CDRH1, la SEQ ID NO: 294 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 295 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 303, 304 y 305, por ejemplo, las SEQ ID NO: 303 y 304, las SEQ ID NO: 303 y 305 o las SEQ ID NO: 304 y 305, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 303 para CDRH1, la SEQ ID NO: 304 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 305 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 313, 314 y 315, por ejemplo, las SEQ ID NO: 313 y 314, las SEQ ID NO: 313 y 315 o las SEQ ID NO: 314 y 315, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 313 para CDRH1, la SEQ ID NO: 314 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 315 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 323, 324 y 325, por ejemplo, las SEQ ID NO: 323 y 324, las SEQ ID NO: 323 y 325 o las SEQ ID NO: 324 y 325, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 323 para CDRH1, la SEQ ID NO: 324 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 325 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 333, 334 y 335, por ejemplo, las SEQ ID NO: 333 y 334, las SEQ ID NO: 333 y 335 o las SEQ ID NO: 334 y 335, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 333 para CDRH1, la SEQ ID NO: 334 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 335 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 343, 344 y 345, por ejemplo, las SEQ ID NO: 343 y 344, las SEQ ID NO: 343 y 345 o las SEQ ID NO: 344 y 345, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 343 para CDRH1, la SEQ ID NO: 344 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 345 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 353, 354 y 355, por ejemplo, las SEQ ID NO: 353 y 354, las SEQ ID NO: 353 y 355 o las SEQ ID NO: 354 y 355, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 353 para CDRH1, la SEQ ID NO: 354 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 355 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 363, 364 y 365, por ejemplo, las SEQ ID NO: 363 y 364, las SEQ ID NO: 363 y 365 o las SEQ ID NO: 364 y 365, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 363 para CDRH1, la SEQ ID NO: 364 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 365 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 373, 374 y 375, por ejemplo, las SEQ ID NO:

373 y 374, las SEQ ID NO: 373 y 375 o las SEQ ID NO: 374 y 375, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 373 para CDRH1, la SEQ ID NO: 374 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 375 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 383, 384 y 385, por ejemplo, las SEQ ID NO: 383 y 384, las SEQ ID NO: 383 y 385 o las SEQ ID NO: 384 y 385, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 383 para CDRH1, la SEQ ID NO: 384 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 385 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 393, 394 y 395, por ejemplo, las SEQ ID NO: 393 y 394, las SEQ ID NO: 393 y 395 o las SEQ ID NO: 394 y 395, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 393 para CDRH1, la SEQ ID NO: 394 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 395 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 403, 404 y 405, por ejemplo, las SEQ ID NO: 403 y 404, las SEQ ID NO: 403 y 405 o las SEQ ID NO: 404 y 405, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 403 para CDRH1, la SEQ ID NO: 404 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 405 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 413, 414 y 415, por ejemplo, las SEQ ID NO: 413 y 414, las SEQ ID NO: 413 y 415 o las SEQ ID NO: 414 y 415, tal como una región variable de cadena pesada que

comprende la SEQ ID NO: 413 para CDRH1, la SEQ ID NO: 414 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 415 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 423, 424 y 425, por ejemplo, las SEQ ID NO: 423 y 424, las SEQ ID NO: 423 y 425 o las SEQ ID NO: 424 y 425, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 423 para CDRH1, la SEQ ID NO: 424 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 425 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 433, 434 y 435, por ejemplo, las SEQ ID NO: 433 y 434, las SEQ ID NO: 433 y 435 o las SEQ ID NO: 434 y 435, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 433 para CDRH1, la SEQ ID NO: 434 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 435 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 443, 444 y 445, por ejemplo, las SEQ ID NO: 443 y 444, las SEQ ID NO: 443 y 445 o las SEQ ID NO: 444 y 445, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 443 para CDRH1, la SEQ ID NO: 444 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 445 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 453, 454 y 455, por ejemplo, las SEQ ID NO: 453 y 454, las SEQ ID NO: 453 y 455 o las SEQ ID NO: 454 y 455, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 453 para CDRH1, la SEQ ID NO: 454 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 455 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 463, 464 y 465, por ejemplo, las SEQ ID NO: 463 y 464, las SEQ ID NO: 463 y 465 o las SEQ ID NO: 464 y 465, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 463 para CDRH1, la SEQ ID NO: 464 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 465 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 473, 474 y 475, por ejemplo, las SEQ ID NO: 473 y 474, las SEQ ID NO: 473 y 475 o las SEQ ID NO: 474 y 475, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 473 para CDRH1, la SEQ ID NO: 474 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 475 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 483, 484 y 485, por ejemplo, las SEQ ID NO: 483 y 484, las SEQ ID NO: 483 y 485 o las SEQ ID NO: 484 y 485, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 483 para CDRH1, la SEQ ID NO: 484 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 485 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 493, 494 y 495, por ejemplo, las SEQ ID NO: 493 y 494, las SEQ ID NO: 493 y 495 o las SEQ ID NO: 494 y 495, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 493 para CDRH1, la SEQ ID NO: 494 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 495 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 503, 504 y 505, por ejemplo, las SEQ ID NO:

503 y 504, las SEQ ID NO: 503 y 505 o las SEQ ID NO: 504 y 505, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 503 para CDRH1, la SEQ ID NO: 504 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 505 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 513, 514 y 515, por ejemplo, las SEQ ID NO: 513 y 514, las SEQ ID NO: 513 y 515 o las SEQ ID NO: 514 y 515, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 513 para CDRH1, la SEQ ID NO: 514 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 515 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 523, 524 y 525, por ejemplo, las SEQ ID NO: 523 y 524, las SEQ ID NO: 523 y 525 o las SEQ ID NO: 524 y 525, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 523 para CDRH1, la SEQ ID NO: 524 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 525 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 533, 534 y 535, por ejemplo, las SEQ ID NO: 533 y 534, las SEQ ID NO: 533 y 535 o las SEQ ID NO: 534 y 535, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 533 para CDRH1, la SEQ ID NO: 534 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 535 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 543, 544 y 545, por ejemplo, las SEQ ID NO: 543 y 544, las SEQ ID NO: 543 y 545 o las SEQ ID NO: 544 y 545, tal como una región variable de cadena pesada que

comprende la SEQ ID NO: 543 para CDRH1, la SEQ ID NO: 544 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 545 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 553, 554 y 555, por ejemplo, las SEQ ID NO: 553 y 554, las SEQ ID NO: 553 y 555 o las SEQ ID NO: 554 y 555, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 553 para CDRH1, la SEQ ID NO: 554 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 555 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 563, 564 y 565, por ejemplo, las SEQ ID NO: 563 y 564, las SEQ ID NO: 563 y 565 o las SEQ ID NO: 564 y 565, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 563 para CDRH1, la SEQ ID NO: 564 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 565 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 573, 574 y 575, por ejemplo, las SEQ ID NO: 573 y 574, las SEQ ID NO: 573 y 575 o las SEQ ID NO: 574 y 575, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 573 para CDRH1, la SEQ ID NO: 574 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 575 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 583, 584 y 585, por ejemplo, las SEQ ID NO: 583 y 584, las SEQ ID NO: 583 y 585 o las SEQ ID NO: 584 y 585, tal como una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 583 para CDRH1, la SEQ ID NO: 584 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 585 para CDRH3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 8, 9 y 10, por ejemplo, las SEQ ID NO: 8 y 9, las SEQ ID NO: 8 y 10 o las SEQ ID NO: 9 y 10, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 8 para CDRL1, la SEQ ID NO: 9 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 10 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 18, 19 y 20, por ejemplo, las SEQ ID NO: 18 y 19, las SEQ ID NO: 18 y 20 o las SEQ ID NO: 19 y 20, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 18 para CDRL1, la SEQ ID NO: 19 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 20 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 28, 29 y 30, por ejemplo, las SEQ ID NO: 28 y 29, las SEQ ID NO: 28 y 30 o las SEQ ID NO: 29 y 30, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 28 para CDRL1, la SEQ ID NO: 29 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 30 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 38, 39 y 40, por ejemplo, las SEQ ID NO: 38 y 39, las SEQ ID NO: 38 y 40 o las SEQ ID NO: 39 y 40, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 38 para CDRL1, la SEQ ID NO: 39 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 40 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 48, 49 y 50, por ejemplo, las SEQ ID NO: 48

y 49, las SEQ ID NO: 48 y 50 o las SEQ ID NO: 49 y 50, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 48 para CDRL1, la SEQ ID NO: 49 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 50 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 58, 59 y 60, por ejemplo, las SEQ ID NO: 58 y 59, las SEQ ID NO: 58 y 60 o las SEQ ID NO: 59 y 60, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 58 para CDRL1, la SEQ ID NO: 59 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 60 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 68, 69 y 70, por ejemplo, las SEQ ID NO: 68 y 69, las SEQ ID NO: 68 y 70 o las SEQ ID NO: 69 y 70, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 68 para CDRL1, la SEQ ID NO: 69 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 70 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 78, 79 y 80, por ejemplo, las SEQ ID NO: 78 y 79, las SEQ ID NO: 78 y 80 o las SEQ ID NO: 79 y 80, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 78 para CDRL1, la SEQ ID NO: 79 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 80 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 88, 89 y 90, por ejemplo, las SEQ ID NO: 88 y 89, las SEQ ID NO: 88 y 90 o las SEQ ID NO: 89 y 90, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la

SEQ ID NO: 88 para CDRL1, la SEQ ID NO: 89 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 90 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 98, 99 y 100, por ejemplo, las SEQ ID NO: 98 y 99, las SEQ ID NO: 98 y 100 o las SEQ ID NO: 99 y 100, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 98 para CDRL1, la SEQ ID NO: 99 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 100 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 108, 109 y 110, por ejemplo, las SEQ ID NO: 108 y 109, las SEQ ID NO: 108 y 110 o las SEQ ID NO: 109 y 110, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 108 para CDRL1, la SEQ ID NO: 109 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 110 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 118, 119 y 120, por ejemplo, las SEQ ID NO: 118 y 119, las SEQ ID NO: 118 y 120 o las SEQ ID NO: 119 y 120, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 118 para CDRL1, la SEQ ID NO: 119 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 120 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 128, 129 y 130, por ejemplo, las SEQ ID NO: 128 y 129, las SEQ ID NO: 128 y 130 o las SEQ ID NO: 129 y 130, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 128 para CDRL1, la SEQ ID NO: 129 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 130 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 138, 139 y 140, por ejemplo, las SEQ ID NO: 138 y 139, las SEQ ID NO: 138 y 140 o las SEQ ID NO: 139 y 140, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 138 para CDRL1, la SEQ ID NO: 139 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 140 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 148, 149 y 150, por ejemplo, las SEQ ID NO: 148 y 149, las SEQ ID NO: 148 y 150 o las SEQ ID NO: 149 y 150, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 148 para CDRL1, la SEQ ID NO: 149 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 120 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 158, 159 y 160, por ejemplo, las SEQ ID NO: 158 y 159, las SEQ ID NO: 158 y 160 o las SEQ ID NO: 159 y 160, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 158 para CDRL1, la SEQ ID NO: 159 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 160 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 168, 169 y 170, por ejemplo, las SEQ ID NO: 168 y 169, las SEQ ID NO: 168 y 170 o las SEQ ID NO: 169 y 170, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 168 para CDRL1, la SEQ ID NO: 169 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 170 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 178, 179 y 180, por ejemplo, las SEQ ID NO:

178 y 179, las SEQ ID NO: 178 y 180 o las SEQ ID NO: 179 y 180, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 178 para CDRL1, la SEQ ID NO: 179 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 180 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 188, 189 y 190, por ejemplo, las SEQ ID NO: 188 y 189, las SEQ ID NO: 188 y 190 o las SEQ ID NO: 189 y 190, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 188 para CDRL1, la SEQ ID NO: 189 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 190 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 198, 199 y 200, por ejemplo, las SEQ ID NO: 198 y 199, las SEQ ID NO: 198 y 200 o las SEQ ID NO: 199 y 200, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 198 para CDRL1, la SEQ ID NO: 199 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 200 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 208, 209 y 210, por ejemplo, las SEQ ID NO: 208 y 209, las SEQ ID NO: 208 y 210 o las SEQ ID NO: 209 y 210, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 208 para CDRL1, la SEQ ID NO: 209 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 210 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 218, 219 y 220, por ejemplo, las SEQ ID NO: 218 y 219, las SEQ ID NO: 218 y 220 o las SEQ ID NO: 219 y 220, tal como una región variable de cadena ligera que

comprende la SEQ ID NO: 218 para CDRL1, la SEQ ID NO: 219 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 220 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 228, 229 y 230, por ejemplo, las SEQ ID NO: 228 y 229, las SEQ ID NO: 228 y 230 o las SEQ ID NO: 229 y 230, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 228 para CDRL1, la SEQ ID NO: 229 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 230 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 238, 239 y 240, por ejemplo, las SEQ ID NO: 238 y 239, las SEQ ID NO: 238 y 240 o las SEQ ID NO: 239 y 240, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 238 para CDRL1, la SEQ ID NO: 239 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 240 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 248, 249 y 250, por ejemplo, las SEQ ID NO: 248 y 249, las SEQ ID NO: 248 y 250 o las SEQ ID NO: 249 y 250, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 248 para CDRL1, la SEQ ID NO: 249 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 220 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 258, 259 y 260, por ejemplo, las SEQ ID NO: 258 y 259, las SEQ ID NO: 258 y 260 o las SEQ ID NO: 259 y 260, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 258 para CDRL1, la SEQ ID NO: 259 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 260 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 268, 269 y 270, por ejemplo, las SEQ ID NO: 268 y 269, las SEQ ID NO: 268 y 270 o las SEQ ID NO: 269 y 270, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 268 para CDRL1, la SEQ ID NO: 269 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 270 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 278, 279 y 280, por ejemplo, las SEQ ID NO: 278 y 279, las SEQ ID NO: 278 y 280 o las SEQ ID NO: 279 y 280, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 278 para CDRL1, la SEQ ID NO: 279 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 280 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 288, 289 y 290, por ejemplo, las SEQ ID NO: 288 y 289, las SEQ ID NO: 288 y 290 o las SEQ ID NO: 289 y 290, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 288 para CDRL1, la SEQ ID NO: 289 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 290 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 298, 299 y 300, por ejemplo, las SEQ ID NO: 298 y 299, las SEQ ID NO: 298 y 300 o las SEQ ID NO: 299 y 300, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 298 para CDRL1, la SEQ ID NO: 299 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 300 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 308, 309 y 310, por ejemplo, las SEQ ID NO:

308 y 309, las SEQ ID NO: 308 y 310 o las SEQ ID NO: 309 y 310, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 308 para CDRL1, la SEQ ID NO: 309 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 310 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 318, 319 y 320, por ejemplo, las SEQ ID NO: 318 y 319, las SEQ ID NO: 318 y 320 o las SEQ ID NO: 319 y 320, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 318 para CDRL1, la SEQ ID NO: 319 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 320 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 328, 329 y 330, por ejemplo, las SEQ ID NO: 328 y 329, las SEQ ID NO: 328 y 330 o las SEQ ID NO: 329 y 330, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 328 para CDRL1, la SEQ ID NO: 329 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 330 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 338, 339 y 340, por ejemplo, las SEQ ID NO: 338 y 339, las SEQ ID NO: 338 y 340 o las SEQ ID NO: 339 y 340, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 338 para CDRL1, la SEQ ID NO: 339 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 340 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 348, 349 y 350, por ejemplo, las SEQ ID NO: 348 y 349, las SEQ ID NO: 348 y 350 o las SEQ ID NO: 349 y 350, tal como una región variable de cadena ligera que

comprende la SEQ ID NO: 348 para CDRL1, la SEQ ID NO: 349 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 320 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 358, 359 y 360, por ejemplo, las SEQ ID NO: 358 y 359, las SEQ ID NO: 358 y 360 o las SEQ ID NO: 359 y 360, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 358 para CDRL1, la SEQ ID NO: 359 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 360 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 368, 369 y 370, por ejemplo, las SEQ ID NO: 368 y 369, las SEQ ID NO: 368 y 370 o las SEQ ID NO: 369 y 370, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 368 para CDRL1, la SEQ ID NO: 369 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 370 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 378, 379 y 380, por ejemplo, las SEQ ID NO: 378 y 379, las SEQ ID NO: 378 y 380 o las SEQ ID NO: 379 y 380, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 378 para CDRL1, la SEQ ID NO: 379 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 380 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 388, 389 y 390, por ejemplo, las SEQ ID NO: 388 y 389, las SEQ ID NO: 388 y 390 o las SEQ ID NO: 389 y 390, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 388 para CDRL1, la SEQ ID NO: 389 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 390 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 398, 399 y 400, por ejemplo, las SEQ ID NO: 398 y 399, las SEQ ID NO: 398 y 400 o las SEQ ID NO: 399 y 400, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 398 para CDRL1, la SEQ ID NO: 399 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 400 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 408, 409 y 410, por ejemplo, las SEQ ID NO: 408 y 409, las SEQ ID NO: 408 y 410 o las SEQ ID NO: 409 y 410, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 408 para CDRL1, la SEQ ID NO: 409 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 410 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 418, 419 y 420, por ejemplo, las SEQ ID NO: 418 y 419, las SEQ ID NO: 418 y 420 o las SEQ ID NO: 419 y 420, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 418 para CDRL1, la SEQ ID NO: 419 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 420 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 428, 429 y 430, por ejemplo, las SEQ ID NO: 428 y 429, las SEQ ID NO: 428 y 430 o las SEQ ID NO: 429 y 430, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 428 para CDRL1, la SEQ ID NO: 429 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 430 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 438, 439 y 440, por ejemplo, las SEQ ID NO:

438 y 439, las SEQ ID NO: 438 y 440 o las SEQ ID NO: 439 y 440, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 438 para CDRL1, la SEQ ID NO: 439 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 440 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 448, 449 y 450, por ejemplo, las SEQ ID NO: 448 y 449, las SEQ ID NO: 448 y 450 o las SEQ ID NO: 449 y 450, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 448 para CDRL1, la SEQ ID NO: 449 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 420 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 458, 459 y 460, por ejemplo, las SEQ ID NO: 458 y 459, las SEQ ID NO: 458 y 460 o las SEQ ID NO: 459 y 460, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 458 para CDRL1, la SEQ ID NO: 459 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 460 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 468, 469 y 470, por ejemplo, las SEQ ID NO: 468 y 469, las SEQ ID NO: 468 y 470 o las SEQ ID NO: 469 y 470, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 468 para CDRL1, la SEQ ID NO: 469 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 470 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 478, 479 y 480, por ejemplo, las SEQ ID NO: 478 y 479, las SEQ ID NO: 478 y 480 o las SEQ ID NO: 479 y 480, tal como una región variable de cadena ligera que

comprende la SEQ ID NO: 478 para CDRL1, la SEQ ID NO: 479 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 480 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 488, 489 y 490, por ejemplo, las SEQ ID NO: 488 y 489, las SEQ ID NO: 488 y 490 o las SEQ ID NO: 489 y 490, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 488 para CDRL1, la SEQ ID NO: 489 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 490 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 498, 499 y 500, por ejemplo, las SEQ ID NO: 498 y 499, las SEQ ID NO: 498 y 500 o las SEQ ID NO: 499 y 500, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 498 para CDRL1, la SEQ ID NO: 499 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 500 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 508, 509 y 510, por ejemplo, las SEQ ID NO: 508 y 509, las SEQ ID NO: 508 y 510 o las SEQ ID NO: 509 y 510, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 508 para CDRL1, la SEQ ID NO: 509 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 510 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 518, 519 y 520, por ejemplo, las SEQ ID NO: 518 y 519, las SEQ ID NO: 518 y 520 o las SEQ ID NO: 519 y 520, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 518 para CDRL1, la SEQ ID NO: 519 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 520 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 528, 529 y 530, por ejemplo, las SEQ ID NO: 528 y 529, las SEQ ID NO: 528 y 530 o las SEQ ID NO: 529 y 530, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 528 para CDRL1, la SEQ ID NO: 529 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 530 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 538, 539 y 540, por ejemplo, las SEQ ID NO: 538 y 539, las SEQ ID NO: 538 y 540 o las SEQ ID NO: 539 y 540, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 538 para CDRL1, la SEQ ID NO: 539 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 540 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 548, 549 y 550, por ejemplo, las SEQ ID NO: 548 y 549, las SEQ ID NO: 548 y 550 o las SEQ ID NO: 549 y 550, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 548 para CDRL1, la SEQ ID NO: 549 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 520 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 558, 559 y 560, por ejemplo, las SEQ ID NO: 558 y 559, las SEQ ID NO: 558 y 560 o las SEQ ID NO: 559 y 560, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 558 para CDRL1, la SEQ ID NO: 559 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 560 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 568, 569 y 570, por ejemplo, las SEQ ID NO:

568 y 569, las SEQ ID NO: 568 y 570 o las SEQ ID NO: 569 y 570, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 568 para CDRL1, la SEQ ID NO: 569 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 570 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 578, 579 y 580, por ejemplo, las SEQ ID NO: 578 y 579, las SEQ ID NO: 578 y 580 o las SEQ ID NO: 579 y 580, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 578 para CDRL1, la SEQ ID NO: 579 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 580 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 588, 589 y 590, por ejemplo, las SEQ ID NO: 588 y 589, las SEQ ID NO: 588 y 590 o las SEQ ID NO: 589 y 590, tal como una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 588 para CDRL1, la SEQ ID NO: 589 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 590 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 103 para CDRH1, la SEQ ID NO: 104 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 105 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 108, 109 y 120, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 108 para CDRL1, la SEQ ID NO: 109 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 120 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 113 para CDRH1, la SEQ ID NO: 114 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 115 para CDRH3 y al menos

una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 118, 119 y 120, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 118 para CDRL1, la SEQ ID NO: 119 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 120 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 123 para CDRH1, la SEQ ID NO: 124 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 125 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 128, 129 y 130, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 128 para CDRL1, la SEQ ID NO: 129 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 130 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 133 para CDRH1, la SEQ ID NO: 134 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 135 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 138, 139 y 140, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 138 para CDRL1, la SEQ ID NO: 139 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 140 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 143 para CDRH1, la SEQ ID NO: 144 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 145 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 148, 149 y 150, en particular una región variable de cadena

ligera que comprende la SEQ ID NO: 148 para CDRL1, la SEQ ID NO: 149 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 150 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 153 para CDRH1, la SEQ ID NO: 154 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 155 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 158, 159 y 160, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 158 para CDRL1, la SEQ ID NO: 159 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 160 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 163 para CDRH1, la SEQ ID NO: 164 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 165 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 168, 169 y 170, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 168 para CDRL1, la SEQ ID NO: 169 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 170 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 173 para CDRH1, la SEQ ID NO: 174 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 175 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 178, 179 y 180, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 178 para CDRL1, la SEQ ID NO: 179 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 180 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada

que comprende la SEQ ID NO: 183 para CDRH1, la SEQ ID NO: 184 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 185 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 188, 189 y 190, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 188 para CDRL1, la SEQ ID NO: 189 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 190 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 193 para CDRH1, la SEQ ID NO: 194 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 195 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 198, 199 y 200, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 198 para CDRL1, la SEQ ID NO: 199 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 200 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 203 para CDRH1, la SEQ ID NO: 204 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 205 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 208, 209 y 220, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 208 para CDRL1, la SEQ ID NO: 209 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 220 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 213 para CDRH1, la SEQ ID NO: 214 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 215 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 218,

219 y 220, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 218 para CDRL1, la SEQ ID NO: 219 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 220 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 223 para CDRH1, la SEQ ID NO: 224 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 225 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 228, 229 y 230, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 228 para CDRL1, la SEQ ID NO: 229 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 230 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 233 para CDRH1, la SEQ ID NO: 234 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 235 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 238, 239 y 240, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 238 para CDRL1, la SEQ ID NO: 239 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 240 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 243 para CDRH1, la SEQ ID NO: 244 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 245 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 248, 249 y 250, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 248 para CDRL1, la SEQ ID NO: 249 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 250 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 253 para CDRH1, la SEQ ID NO: 254 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 255 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 258, 259 y 260, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 258 para CDRL1, la SEQ ID NO: 259 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 260 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 263 para CDRH1, la SEQ ID NO: 264 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 265 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 268, 269 y 270, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 268 para CDRL1, la SEQ ID NO: 269 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 270 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 273 para CDRH1, la SEQ ID NO: 274 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 275 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 278, 279 y 280, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 278 para CDRL1, la SEQ ID NO: 279 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 280 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 283 para CDRH1, la SEQ ID NO: 284 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 285 para CDRH3 y al menos

una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 288, 289 y 290, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 288 para CDRL1, la SEQ ID NO: 289 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 290 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 293 para CDRH1, la SEQ ID NO: 294 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 295 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 298, 299 y 300, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 298 para CDRL1, la SEQ ID NO: 299 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 300 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 303 para CDRH1, la SEQ ID NO: 304 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 305 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 308, 309 y 320, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 308 para CDRL1, la SEQ ID NO: 309 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 320 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 313 para CDRH1, la SEQ ID NO: 314 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 315 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 318, 319 y 320, en particular una región variable de cadena

ligera que comprende la SEQ ID NO: 318 para CDRL1, la SEQ ID NO: 319 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 320 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 323 para CDRH1, la SEQ ID NO: 324 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 325 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 328, 329 y 330, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 328 para CDRL1, la SEQ ID NO: 329 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 330 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 333 para CDRH1, la SEQ ID NO: 334 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 335 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 338, 339 y 340, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 338 para CDRL1, la SEQ ID NO: 339 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 340 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 343 para CDRH1, la SEQ ID NO: 344 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 345 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 348, 349 y 350, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 348 para CDRL1, la SEQ ID NO: 349 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 350 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada

que comprende la SEQ ID NO: 353 para CDRH1, la SEQ ID NO: 354 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 355 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 358, 359 y 360, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 358 para CDRL1, la SEQ ID NO: 359 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 360 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 363 para CDRH1, la SEQ ID NO: 364 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 365 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 368, 369 y 370, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 368 para CDRL1, la SEQ ID NO: 369 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 370 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 373 para CDRH1, la SEQ ID NO: 374 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 375 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 378, 379 y 380, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 378 para CDRL1, la SEQ ID NO: 379 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 380 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 383 para CDRH1, la SEQ ID NO: 384 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 385 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 388,

389 y 390, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 388 para CDRL1, la SEQ ID NO: 389 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 390 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 393 para CDRH1, la SEQ ID NO: 394 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 395 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 398, 399 y 400, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 398 para CDRL1, la SEQ ID NO: 399 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 400 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 403 para CDRH1, la SEQ ID NO: 404 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 405 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 408, 409 y 420, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 408 para CDRL1, la SEQ ID NO: 409 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 420 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 413 para CDRH1, la SEQ ID NO: 414 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 415 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 418, 419 y 420, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 418 para CDRL1, la SEQ ID NO: 419 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 420 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 423 para CDRH1, la SEQ ID NO: 424 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 425 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 428, 429 y 430, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 428 para CDRL1, la SEQ ID NO: 429 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 430 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 433 para CDRH1, la SEQ ID NO: 434 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 435 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 438, 439 y 440, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 438 para CDRL1, la SEQ ID NO: 439 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 440 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 443 para CDRH1, la SEQ ID NO: 444 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 445 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 448, 449 y 450, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 448 para CDRL1, la SEQ ID NO: 449 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 450 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 453 para CDRH1, la SEQ ID NO: 454 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 455 para CDRH3 y al menos

una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 458, 459 y 460, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 458 para CDRL1, la SEQ ID NO: 459 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 460 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 463 para CDRH1, la SEQ ID NO: 464 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 465 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 468, 469 y 470, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 468 para CDRL1, la SEQ ID NO: 469 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 470 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 473 para CDRH1, la SEQ ID NO: 474 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 475 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 478, 479 y 480, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 478 para CDRL1, la SEQ ID NO: 479 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 480 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 483 para CDRH1, la SEQ ID NO: 484 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 485 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 488, 489 y 490, en particular una región variable de cadena

ligera que comprende la SEQ ID NO: 488 para CDRL1, la SEQ ID NO: 489 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 490 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 493 para CDRH1, la SEQ ID NO: 494 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 495 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 498, 499 y 500, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 498 para CDRL1, la SEQ ID NO: 499 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 500 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 503 para CDRH1, la SEQ ID NO: 504 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 505 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 508, 509 y 520, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 508 para CDRL1, la SEQ ID NO: 509 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 520 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 513 para CDRH1, la SEQ ID NO: 514 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 515 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 518, 519 y 520, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 518 para CDRL1, la SEQ ID NO: 519 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 520 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada

que comprende la SEQ ID NO: 523 para CDRH1, la SEQ ID NO: 524 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 525 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 528, 529 y 530, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 528 para CDRL1, la SEQ ID NO: 529 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 530 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 533 para CDRH1, la SEQ ID NO: 534 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 535 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 538, 539 y 540, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 538 para CDRL1, la SEQ ID NO: 539 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 540 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 543 para CDRH1, la SEQ ID NO: 544 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 545 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 548, 549 y 550, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 548 para CDRL1, la SEQ ID NO: 549 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 550 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 553 para CDRH1, la SEQ ID NO: 554 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 555 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 558,

559 y 560, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 558 para CDRL1, la SEQ ID NO: 559 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 560 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 563 para CDRH1, la SEQ ID NO: 564 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 565 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 568, 569 y 570, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 568 para CDRL1, la SEQ ID NO: 569 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 570 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 573 para CDRH1, la SEQ ID NO: 574 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 575 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 578, 579 y 580, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 578 para CDRL1, la SEQ ID NO: 579 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 580 para CDRL3.

En una realización, una molécula de unión de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 583 para CDRH1, la SEQ ID NO: 584 para CDRH2 y la SEQ ID NO: 585 para CDRH3 y al menos una CDR en una región variable de cadena ligera seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 588, 589 y 590, en particular una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 588 para CDRL1, la SEQ ID NO: 589 para CDRL2 y la SEQ ID NO: 590 para CDRL3.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 2, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 7, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 7.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 12, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 17, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 12 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 17.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 22, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ

ID NO: 27, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 22 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 27.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 32, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 37, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 32 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 37.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 52, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 57, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 52 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 57.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 62, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 67, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 62 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 67.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 72, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 77, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 72 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 77.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 82, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ

ID NO: 87, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 82 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 87.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 92, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 97, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 92 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 97.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 102, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 107, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 102 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 107.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 112, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 117, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 112 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 117.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 122, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 127, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 122 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 127.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 132, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ

ID NO: 137, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 132 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 137.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 152, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 157, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 152 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 157.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 162, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 167, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 162 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 167.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 172, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 177, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 172 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 177.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 182, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 187, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 182 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 187.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 192, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ

ID NO: 197, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 192 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 197.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 202, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 207, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 202 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 207.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 212, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 217, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 212 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 217.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 222, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 227, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 222 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 227.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 232, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 237, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 232 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 237.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 242, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ

ID NO: 247, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 242 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 247.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 252, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 257, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 252 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 257.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 262, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 267, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 262 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 267.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 272, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 277, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 272 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 277.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 282, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 287, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 282 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 287.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 292, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ

ID NO: 297, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 292 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 297.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 302, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 307, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 302 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 307.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 312, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 317, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 312 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 317.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 322, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 327, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 322 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 327.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 332, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 337, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 332 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 337.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 352, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ

ID NO: 357, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 352 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 357.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 362, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 367, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 362 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 367.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 372, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 377, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 372 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 377.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 382, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 387, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 382 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 387.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 392, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 397, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 392 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 397.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 402, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ

ID NO: 407, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 402 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 407.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 412, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 417, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 412 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 417.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 422, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 427, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 422 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 427.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 432, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 437, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 432 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 437.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 452, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 457, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 452 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 457.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 462, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ

ID NO: 467, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 462 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 467.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 472, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 477, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 472 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 477.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 482, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 487, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 482 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 487.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 492, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 497, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 492 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 497.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 502, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 507, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 502 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 507.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 512, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ

ID NO: 517, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 512 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 517.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 522, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 527, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 522 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 527.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 532, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 537, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 532 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 537.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 552, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 557, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 552 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 557.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 562, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 567, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 562 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 567.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 572, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ

ID NO: 577, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 572 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 577.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 582, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 587, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 582 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 587.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 592, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 594, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 592 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 59.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 596, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 598, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 596 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 598.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 600, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 602, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 600 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 602.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 604, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ

ID NO: 606, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 604 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 606.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 608, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 610, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 608 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 610.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 612, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 614, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 612 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 614.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 616, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 618, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 616 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 618.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 620, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 622, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 620 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 622.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ ID NO: 624, por ejemplo, como región variable en una cadena pesada.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de SEQ

ID NO: 626, por ejemplo, como región variable en una cadena ligera.

En una realización, la molécula de unión de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 624 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 626.

En otra realización, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo aislado o a un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-33, que comprende un VH y un VL, en donde el VH tiene secuencias de aminoácidos al menos un 90%, por ejemplo, un 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% idénticas a un VH como se ha divulgado anteriormente, por ejemplo, la SEQ ID NO: 182 o la SEQ ID NO: 616

En otra realización, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-33, que comprende un VH y un VL, en donde un VH como se ha divulgado anteriormente, por ejemplo, en la SEQ ID NO: 182 o la SEQ ID NO: 616, tiene una secuencia con 1, 2, 3 o 4 aminoácidos en la cadena principal reemplazados independientemente con un aminoácido diferente o eliminados.

En otra realización, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo aislado o a un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-33, que comprende un VH y un VL, en donde el VL tiene secuencias de aminoácidos al menos un 90%, por ejemplo, un 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% idénticas a un VL como se ha divulgado anteriormente, por ejemplo, la SEQ ID NO: 187 o la SEQ ID NO: 618.

En otra realización, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-33, que comprende un VH y un VL, en donde un VL como se ha divulgado anteriormente, por ejemplo, en la SEQ ID NO: 187 o la SEQ ID NO: 618, tiene una secuencia con 1, 2, 3 o 4 aminoácidos en la cadena principal reemplazados independientemente con un aminoácido diferente o eliminados.

En otra realización, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo aislado o a un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-33, que comprende un VH y un VL, en donde el VH tiene secuencias de aminoácidos al menos un 90%, por ejemplo, un 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% idénticas a un VH como se ha divulgado anteriormente, por ejemplo, la SEQ ID NO: 182 o la SEQ ID NO. 616 y un VL tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 90%, por ejemplo, un 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% idéntica a un VL como se ha divulgado anteriormente, por ejemplo, la SEQ ID NO: 187 o la SEQ ID NO: 618.

En otra realización, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-33, que comprende un VH y un VL, en donde un VH como se ha divulgado anteriormente, por ejemplo, la SEQ ID NO: 182 o la SEQ ID NO: 616 tiene una secuencia con 1, 2, 3 o 4 aminoácidos en la cadena principal que están reemplazados independientemente con un aminoácido diferente o eliminados, un VL divulgada anteriormente, por ejemplo, en la SEQ ID NO: 187 o la SEQ ID NO: 618, tiene una secuencia

con 1, 2, 3 o 4 aminoácidos en la cadena principal que están reemplazados independientemente con un aminoácido diferente o eliminados.

En una realización, se proporciona un anticuerpo o un fragmento de unión que bloquea de manera cruzada una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión de acuerdo con la presente divulgación, en particular en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión se une al mismo epítopo que una molécula divulgada en el presente documento.

En algunas realizaciones, la molécula de unión o el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones, la molécula de unión o el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo de origen natural, un fragmento scFv, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')2, un minibody, un diabody, un triabody, un tetrabody o un anticuerpo monocatenario. En algunas realizaciones, la molécula de unión o el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo monoclonal.

En otra realización, la presente divulgación se refiere a un polinucleótido que codifica la molécula de unión o el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la divulgación, en particular como se describe en el presente documento. En determinadas realizaciones, el polinucleótido codifica el VH de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la divulgación. En determinadas realizaciones, el polinucleótido codifica un VL de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la divulgación.

En algunas realizaciones, la divulgación se refiere a un vector que comprende el polinucleótido de la divulgación.

En algunas realizaciones, la divulgación se refiere a una composición que comprende el polinucleótido o un vector de la divulgación.

En otra realización, se proporciona una célula hospedadora que comprende el polinucleótido o un vector de la divulgación.

En otra realización, la divulgación del presente documento se refiere a un método para producir un anticuerpo anti-IL-33 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende cultivar la célula hospedadora de la divulgación y recuperar dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas realizaciones, la divulgación se refiere a un anticuerpo anti-IL-33 o un fragmento de unión a antígeno del mismo producido mediante un método de la divulgación.

En otra realización, la divulgación se refiere a una composición farmacéutica que comprende una molécula de unión o un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del misma de la divulgación y un vehículo.

En otra realización, la divulgación se refiere a un método para tratar a un sujeto con una afección inflamatoria que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación que inhibe la producción de citocinas impulsada por IL-33.

En otra realización, se proporciona un método para tratar a un sujeto con una afección inflamatoria que

comprende administrar una molécula de unión de la presente divulgación o una composición que comprende a la misma.

En un aspecto, se proporciona una molécula de unión de la presente divulgación o una composición que comprende la misma para su uso en el tratamiento, por ejemplo, de una afección inflamatoria, en particular como se describe en el presente documento.

En una realización, se proporciona el uso de una molécula de unión de la presente divulgación o una composición que comprende la misma en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una afección inflamatoria.

En una realización, la afección inflamatoria se selecciona entre asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), rinosinusitis crónica, una enfermedad fibroproliferativa (por ejemplo, fibrosis pulmonar), eosinofilia pulmonar, neoplasia maligna pleural, artritis reumatoide, enfermedad vascular del colágeno, enfermedad vascular ateroesclerótica, urticaria, enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn o enfermedad celíaca), lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica progresiva, granulomatosis de Wegener, choque séptico y enfermedad de Bechet.

En algunas realizaciones, la afección inflamatoria es un trastorno alérgico, por ejemplo, asma, rinosinusitis crónica, alergia alimentaria, eccema o dermatitis, en particular, asma, tal como asma refractaria (también citada como asma grave).

En algunas realizaciones, la respuesta o la afección inflamatoria se encuentra en las vías respiratorias de dicho sujeto.

En una realización, la respuesta o la afección inflamatoria se encuentra en el músculo liso.

En otra realización, la divulgación se refiere a un método para prevenir una respuesta inflamatoria en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a IL-33 y no bloquea la unión de IL-33 a ST2, en donde se reduce la señalización de ST2.

En otra realización, la divulgación se refiere a un método para prevenir una respuesta inflamatoria en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación que inhibe la producción de citocinas impulsada por IL-33.

En otra realización, la divulgación se refiere a un método para prevenir una respuesta inflamatoria en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de una molécula de unión o un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la divulgación.

En otra realización, la divulgación se refiere a un método para identificar un anticuerpo terapéutico o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende seleccionar un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a IL-33, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo no bloquea la unión de IL-33 a ST2 e inhibe la producción de citocinas impulsada por IL-33.

En una realización, se proporciona la inmunización de un hospedador con redIL-33, por ejemplo, estabilizada en forma reducida o un mutante de la misma que tiene una

capacidad reducida para formar enlaces disulfuro, en particular, una capacidad reducida para formar un enlace disulfuro en una o más ubicaciones seleccionadas independientemente entre Cys-208, Cys-227, Cys-232 y Cys-259. En una realización, el método comprende además las etapas de explorar los anticuerpos del hospedador, por ejemplo, empleando ensayos funcionales y aislando y/o replicando al menos las regiones variables de al menos uno de dichos anticuerpos.

En una realización, se proporciona el uso de redIL-33, por ejemplo, estabilizada en forma reducida o un mutante de la misma que tiene una capacidad reducida para formar enlaces disulfuro, en particular, una capacidad reducida para formar un enlace disulfuro en una o más ubicaciones seleccionadas independientemente entre Cys-208, Cys-227, Cys-232 y Cys-259 para identificar un inhibidor de la señalización de ST2, en particular, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo específico para redIL-33. En una realización, el uso emplea interrogar a una biblioteca, por ejemplo, una biblioteca de anticuerpos de presentación en fagos empleando dicha proteína o un fragmento activo de la misma.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la divulgación no inhibe la señalización de NFκB.

En una realización, se proporciona un método para identificar o generar una molécula de unión de la presente divulgación empleando redIL-33 o un mutante de la presente divulgación (citado en el presente documento de manera colectiva como "una proteína de la presente divulgación"). En una realización, el método comprende la etapa de

interrogar a una biblioteca con proteínas de la presente divulgación para identificar una molécula de unión. En una realización, el método comprende inmunizar a un hospedador con una proteína de la presente divulgación.

En una realización, se proporciona un epítopo de IL-33, al que se une una molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como se divulga en el presente documento, en particular un epítopo catalítico, es decir, un epítopo cuya unión aumenta la velocidad de conversión de la forma reducida de IL-33 a la forma oxidada.

En otra realización, la divulgación se refiere a un método para detectar la expresión de redIL-33 en una muestra.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

I. Definiciones

"Aislado", en el sentido empleado en el presente documento, se refiere a una proteína en un ambiente no natural, concretamente aislada de la naturaleza, por ejemplo, el término no incluye la proteína *in vivo*, ni la proteína en una muestra tomada del cuerpo de un ser humano o de un animal. En general, las proteínas se encontrarán en un vehículo, tal como un líquido o medo o pueden formularse, congelarse o criodesecarse y todas estas formas pueden estar abarcadas por "aislada", según sea adecuado. En una realización, aislado no se refiere a la proteína en un gel, por ejemplo, un gel empleado en un análisis de transferencia de Western o similar.

La proteína IL-33, tal como se emplea en el presente documento, se refiere a la interleucina 33, concretamente una proteína interleucina 33 de mamífero, por ejemplo, la

proteína humana depositada con el número de UniProt O95760. Sin embargo, dados los descubrimientos de los presentes inventores, es evidente que esta entidad no se encuentra en una sola especie, sino que existe en una forma reducida y una oxidada. Dada la rápida oxidación de la forma reducida *in vivo*, por ejemplo, en un periodo de 5 minutos a 40 minutos, e *in vitro,* las referencias de la técnica anterior a la IL-33 son generalmente, de hecho, referencias a la forma oxidada. Además, los ensayos comerciales parecen cuantificar esta forma oxidada.

IL-33 oxidada, IL-33-DSB (unida por disulfuro) y DSB IL-33 se emplean de manera indistinta en el presente documento.

IL-33 oxidada, tal como se emplea en el presente documento, se refiere a una proteína visible en forma de una banda distinguible, por ejemplo, mediante análisis de transferencia de Western en condiciones no reductoras, en particular, con una masa 4 Da menor que la de la forma reducida correspondiente. En particular, se refiere a una proteína con uno o dos enlaces disulfuro entre las cisteínas seleccionadas independientemente entre las cisteínas 208, 227, 232 y 259. En una realización, la IL-33 oxidada no muestra unión a ST2.

IL-33 reducida y redIL-33 se emplean de manera indistinta en el presente documento.

IL-33 reducida, tal como se emplea en el presente documento, se refiere a la forma de IL-33 que se une a ST2 y desencadena la señalización dependiente de ST2. En particular, las cisteínas 208, 227, 232 y 259 de la forma reducida no están unidas por disulfuro. Un fragmento activo de redIL-33, tal como se emplea en el presente documento,

se refiere a un fragmento con una actividad comparable a la de redIL-33, por ejemplo, un alcance de la señalización dependiente de ST2 similar. En una realización, un fragmento activo tiene un 20, 30 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99% de la actividad de redIL-33 de longitud completa.

La señalización dependiente de ST-2, tal como se emplea en el presente documento, se refiere al sistema IL-33/ST2, en donde el reconocimiento de la IL-33 por parte de ST2 promueve la dimerización con IL1-RAcP sobre la superficie celular y dentro de la célula, el reclutamiento de los componentes del complejo de receptor MyD88, TRAF6 e IRAK1-4 al dominio TIR intracelular. Por lo tanto, la señalización dependiente de ST-2 puede interrumpirse alterando la interacción de IL-33 con ST2 o como alternativa, interrumpiendo la interacción con IL-1RAcP.

"Estabilizada en una forma reducida", tal como se emplea en el presente documento, se refiere a una modificación que promueve que las proteínas adopten o permanezcan en la forma reducida o que previene la formación de IL-33 oxidada.

En una realización, la estabilización es por conjugación a una entidad química, por ejemplo, biotinilación. redIL-33 tiene tendencia a monobiotinilarse cuando se expone a pH neutro al reactivo que reacciona con -SH, biotina-BMCC (disponible de Thermo scientific). El análisis llevado a cabo por los presentes inventores sugiere que la biotinilación se produce en Cys208. La biotinilación en esta ubicación parece bloquear y/o reducir la oxidación de la proteína. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, el análisis *in silico* llevado a cabo por los

inventores sugiere que Cys208 es un potencial iniciador de las actividades necesarias para los cambios conformacionales y la oxidación de la proteína.

En una realización, la estabilización es biotinilación en Cys208.

En una realización, se reemplaza Cys208 por un aminoácido, tal como serina. En una realización, se reemplaza Cys227 por un aminoácido, tal como serina. En una realización, se reemplaza Cys232 por un aminoácido, tal como serina. En una realización, se reemplaza Cys259 por un aminoácido, tal como serina. En una realización, se reemplazan independientemente Cys208 y 227 por un aminoácido, tal como serina. En una realización, se reemplazan independientemente Cys208 y 232 por un aminoácido, tal como serina. En una realización, se reemplazan independientemente Cys208 y 259 por un aminoácido, tal como serina. En una realización, se reemplazan independientemente Cys208, 227 y 232 por un aminoácido, tal como serina. En una realización, se reemplazan independientemente Cys208, 227 y 259 por un aminoácido, tal como serina. En una realización, se reemplazan independientemente Cys208, 232 y 259 por un aminoácido, tal como serina. En una realización, se reemplazan independientemente Cys227, 232 y 259 por un aminoácido, tal como serina. En una realización, se reemplazan independientemente Cys208, 227, 232 y 259 por un aminoácido, tal como serina.

La mutación, tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un cambio en la secuencia de aminoácidos o a un cambio en una secuencia de polinucleótidos, de tal forma que el aminoácido codificado

por el polinucleótido es diferente o se obtiene alguna otra diferencia tangible, por ejemplo, funcional. Concretamente, el cambio puede comprender la eliminación o sustitución de un resto de aminoácido. La optimización de codones o la redundancia en el código genético no son una mutación en el contexto de la presente solicitud.

Generalmente, se empleará mutación en el presente documento en donde se produzca un cabio en la secuencia de aminoácidos o de polinucleótido para la proteína nativa o de tipo silvestre, mientras que se empleará variante cuando se describan cambios para nuevas secuencias.

Nativo, en el sentido empleado en el presente documento se refiere a una entidad, tal como un aminoácido, que se encuentra en la secuencia de tipo silvestre o que es por lo demás de origen natural.

Conjugado, en el sentido empleado en el presente documento, se refiere a una conexión que une dos entidades o fragmentos, por ejemplo, un enlace, tal como un enlace covalente.

Una entidad, en el sentido empleado en el presente documento, se refiere a un "elemento", molécula, fragmento, átomo, componente o similar.

Una entidad química es una molécula o fragmento del tipo preparado mediante procesos químicos sintéticos.

En una realización, la estabilidad es mediante la mutación de la proteína IL-33, por ejemplo, una mutación puntual, concretamente reemplazando uno o más aminoácidos de cisteína por un aminoácido alternativo, por ejemplo, serina. Un aminoácido alternativo, en el sentido empleado en este contexto, se refiere a un aminoácido que no sea cisteína. En una realización, el aminoácido es un

aminoácido de origen no natural. En una realización, el aminoácido es un aminoácido de origen natural. En una realización, el aminoácido es proteico. En una realización, el aminoácido es serina, que es ventajoso debido a que es una sustitución conservadora y generalmente se conserva la actividad de la proteína después de esta sustitución.

La estabilización de la redIL-33 es importante debido a que fija la forma de la IL-33 en la conformación activa, lo que a su vez puede usarse como herramienta para obtener moléculas de unión que atenúan la actividad de la proteína. En una realización, se emplea la proteína estabilizada para interrogar a una biblioteca de moléculas, tal como una fagoteca de anticuerpos o bibliotecas sintéticas de anticuerpos. En una realización, la proteína estabilizada se emplea para inmunizar a un hospedador, proporcionando de este modo por primera vez la oportunidad de generar anticuerpos específicos para la forma reducida.

"Atenúa la actividad de", en el sentido empleado en el presente documento, se refiere a reducir la actividad relevante o detener la actividad relevante. En general, atenuación e inhibición se emplean de manera indistinta en el presente documento, a menos que el contexto indique lo contrario.

En una realización, la atenuación es mediante la unión a redIL-33. En una realización, la molécula de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, es específica para redIL-33, es decir, tiene una mayor afinidad por redIL-33 que por la forma oxidada, por ejemplo, una afinidad 1, 2, 3, 4, 5 o más veces mayor. Esta se cita en el presente documento como un anticuerpo específico para redIL-33.

En una realización, un anticuerpo específico para redIL-33 se une de tal forma que bloquea estéricamente la unión al receptor ST2.

En una realización, un anticuerpo específico para redIL-33 se une de tal forma que bloquea estéricamente la unión al receptor IL-1RAcP.

En una realización, un anticuerpo específico para redIL-33 se une de tal forma que bloquea alostéricamente la unión al receptor ST2.

En una realización, un anticuerpo específico para redIL-33 se une de tal forma que bloquea alostéricamente la unión al receptor IL-1RAcP.

En una realización, un anticuerpo específico para redIL-33 se une de tal forma que bloquea alostéricamente la señalización a través del receptor ST2, pero puede unirse a ST2 y/o IL-1RAcP.

En una realización, el anticuerpo se une a la forma oxidada de IL-33 y cataliza la conversión de la forma reducida a la forma oxidada. Sn desear quedar ligados a teoría alguna, puede ser que al unirse a la forma oxidada, se desplace el equilibrio del proceso en favor de la conversión a la forma oxidada.

Cabe destacar que el término "un", "uno" o "una", en relación con una entidad, se refiere a uno o más de esa entidad; por ejemplo, se entiende que "un anticuerpo anti-IL-33" representa uno o más anticuerpos anti-IL-33. Como tales, los términos "un", "uno" (o "una"), "uno o más", y "al menos uno" pueden utilizarse indistintamente en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término "polipéptido" abarque el singular,

"polipéptido", así como el plural, "polipéptidos" y se refiere a una molécula compuesta de monómeros (aminoácidos) unida linealmente por enlaces amida (también conocidos como enlaces peptídicos). El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena o cadenas de dos o más aminoácidos y no se refiere a una longitud específica del producto. Por lo tanto, péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptdos, "cadena de aminoácidos" o cualquier otro término usado para hacer referencia a una cadena o a cadenas de dos o más aminoácidos, se encuentran incluidos dentro de la definición de "polipéptido" y el término "polipéptido" puede usarse en lugar de, o de manera indistinta con, cualquiera de estos términos. Se pretende que el término "polipéptido" también haga referencia a los productos de las modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido que incluyen, sin carácter limitante, glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos bloqueadores/protectores conocidos, escisión proteolítica o modificación mediante aminoácidos de origen no natural. Un polipéptido puede obtenerse de una fuente biológica natural o producirse mediante tecnología recombinante, pero no se traduce necesariamente a partir de una secuencia de ácido nucleico designada. Puede generarse de cualquier forma, incluyendo por síntesis química.

Los polipéptidos con una estructura tridimensional definida se denominan plegados y los polipéptidos que no poseen una estructura tridimensional definida, sino que adoptan una gran cantidad de conformaciones diferentes, se denominan no plegados. Tal como se usa en el presente documento, el término glucoproteína se refiere a una

proteína acoplada a al menos un resto de carbohidrato que está unido a la proteína mediante una cadena lateral que contiene oxígeno o que contiene nitrógeno de un resto de aminoácido, por ejemplo, un resto de serina o un resto de asparagina.

Se pretende que un polipéptido "aislado" o un fragmento, variante o derivado del mismo haga referencia a un polipéptido que no se encuentra dentro de su medio natural. No se requiere un nivel concreto de purificación. Por ejemplo, se puede retirar un polipéptido aislado de su entorno nativo o natural. Los polipéptidos producidos de manera recombinante y las proteínas expresadas en células hospedadoras se consideran aislados a efectos de la divulgación, al igual que los polipéptidos nativos o recombinantes que se hayan separado, fraccionado o purificado parcial o sustancialmente mediante cualquier técnica adecuada.

Proteína, en el sentido empleado en el presente documento, se refiere a un polipéptido con estructura secundaria y terciaria.

También se incluyen como polipéptidos de la presente divulgación los fragmentos, derivados, análogos o variantes de los polipéptidos anteriores y cualquier combinación de los mismos.

Los términos "fragmento", "variante", "derivado" y "análogo", por ejemplo, cuando hacen referencia a una proteína o polipéptido de la presente divulgación, tales como anticuerpos anti-IL-33 o polipéptidos de anticuerpo de la presente divulgación, incluyen cualquier polipéptido que conserve al menos parte de las propiedades de unión a antígeno del anticuerpo o polipéptido de anticuerpo

correspondiente de la divulgación. Los fragmentos de polipéptidos de la presente divulgación incluyen fragmentos proteolíticos, así como fragmentos de eliminación, además de fragmentos de anticuerpo específicos descritos en otra parte del presente documento. Las variantes de los anticuerpos y polipéptidos de anticuerpo anti-IL-33 de la presente divulgación incluyen fragmentos tal como se han descrito anteriormente y también polipéptidos con secuencias de aminoácidos alteradas debido a sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos. Las variantes pueden ser de origen natural o de origen no natural. Pueden producirse variantes de origen no natural usando técnicas de mutagénesis conocidas en la técnica.

Los polipéptidos variantes pueden comprender sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras. Los polipéptidos variantes también pueden citarse en el presente documento como "análogos de polipéptidos". Tal como se usa en el presente documento, un "derivado" de, por ejemplo, un anticuerpo o polipéptido de anticuerpo anti-IL-33 se refiere a un polipéptido concreto que tiene uno o más restos derivatizados químicamente mediante la reacción de un grupo lateral funcional. También se incluyen como "derivados" aquellos péptidos que contienen uno o más derivados de aminoácidos de origen natural de los veinte aminoácidos estándar. Por ejemplo, puede sustituirse prolina por 4-hidroxiprolina; puede sustituirse lisina por 5-hidroxilisina; puede sustituirse histidina por 3-metilhistidina; puede sustituirse serina por homoserina; y puede sustituirse lisina por ornitina. Los derivados de anticuerpos y polipéptidos de anticuerpo anti-IL-33 de la presente

divulgación pueden incluir polipéptidos que se hayan alterados para que muestren característica adicionales no encontradas en el anticuerpo o polipéptido de anticuerpo de referencia de la divulgación.

Se pretende que el término "polinucleótido" abarque un ácido nucleico individual así como múltiples ácidos nucleicos y se refiere a una molécula o construcción de ácido nucleico, por ejemplo, ARN mensajero (ARNm) o ADN plasmídico (ADNp). Un polinucleótido puede comprender un enlace fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (por ejemplo, un enlace amida, tal como se encuentra en los ácidos peptidonucleicos (APN)). La expresión "ácido nucleico" se refiere a uno cualquiera o más de los segmentos de ácido nucleico, por ejemplo, fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido. Por ácido o polinucleótido "aislado" se entiende una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que se ha extraído de su ambiente natural. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante que codifica una molécula de unión anti-IL-33, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, contenido en un vector se considera aislado para los fines de la presente divulgación. Otros ejemplos de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes conservados en células hospedadoras heterólogas o polinucleótidos purificados (parcial o sustancialmente) en solución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de polinucleótidos de la presente divulgación. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados de acuerdo con la presente divulgación incluyen además dichas moléculas producidas sintéticamente. Además, un polinucleótido o un

ácido nucleico puede ser o incluir un elemento regulador, tal como un promotor, un sitio de unión a ribosomas o un terminador de la transcripción.

Tal como se usa en el presente documento, una "región codificante" es una porción de ácido nucleico que consiste en codones que se traducen en aminoácidos. Aunque un "codón de parada" (TAG, TGA o TAA) no se traduce en un aminoácido, puede considerarse parte de una región codificante, pero cualquier secuencia flanqueante, por ejemplo, promotores, sitios de unión a ribosomas, terminadores transcripcionales, intrones y similares no forman parte de una región codificante. Pueden estar presentes dos o más regiones codificantes de la presente divulgación en una sola construcción de polinucleótido, por ejemplo, en un solo vector o en construcciones de polinucleótido separadas, por ejemplo, en vectores separados (diferentes). Además, cualquier vector puede contener una sola región codificante o puede comprender dos o más regiones codificantes, por ejemplo, un solo vector puede codificar por separado una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina. Además, un vector, polinucleótido o ácido nucleico de la divulgación puede codificar regiones codificantes heterólogas, tanto fusionadas como no fusionadas a un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IL-33 o un fragmento, variante o derivado del mismo. Las regiones codificantes heterólogas incluyen, sin limitación, elementos o motivos especializados, tales como un péptido señal secretor o un dominio funcional heterólogo.

En determinadas realizaciones, el polinucleótido o ácido nucleico es ADN. En el caso d ADN, un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido normalmente puede incluir un promotor y/u otros elementos de control de la transcripción o de la traducción asociados operablemente con una o más regiones codificantes. Una asociación operativa es cuando una región codificante para un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, se asocia con una o más secuencias reguladoras de tal forma que se pone la expresión del producto génico bajo la influencia o el control de las secuencias reguladoras. Dos fragmentos de ADN (tales como una región codificante de polipéptido y un promotor asociado con la misma) están "asociados operablemente" en caso de que la inducción de la función del promotor de como resultado la transcripción de ARNm que codifica el producto génico deseado y en caso de que la naturaleza del enlace no interfiera con la capacidad de las secuencias reguladoras de la expresión para dirigir la expresión del producto génico o interferir con la capacidad del molde de ADN para transcribirse. De esta manera, una región promotora se asociará operativamente con un ácido nucleico que codifica un polipéptido si el promotor era capaz de efectuar la transcripción de este ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico para células que dirige la transcripción sustancial del ADN únicamente en células predeterminadas. Otros elementos de control de la transcripción, además de un promotor, por ejemplo, potenciadores, operadores, represores, y señales de terminación de la transcripción, pueden asociarse con el polinucleótido para dirigir la transcripción específica de

célula. Se divulgan en el presente documento los promotores adecuados y otras regiones control de la transcripción.

Los expertos en la materia estarán familiarizados con una variedad de regiones control de la transcripción. Estas incluyen, sin limitación, regiones control de la transcripción que funcionan en células de vertebrados, tal como, pero no de forma limitativa, segmentos promotores y potenciadores procedentes de citomegalovirus (el promotor temprano inmediato, junto con el intrón-A), virus 40 de simio (el promotor temprano), y los retrovirus (tales como el virus del sarcoma de Rous). Otras regiones de control de la transcripción incluyen aquellas procedentes de genes de vertebrados, tales como actina, proteína de choque térmico, hormona del crecimiento bovina y β-globina de conejo, así como otras secuencias capaces de controlar la expresión génica en células eucariotas. Las regiones de control de la transcripción adicionales adecuadas incluyen promotores y potenciadores específicos de tejido, así como promotores inducibles por linfocinas (por ejemplo, promotores inducibles por interferones o interleucinas).

De manera similar, un experto habitual en la materia conoce una variedad de elementos control de la traducción. Estos incluyen, pero sin limitación, sitios de unión a ribosomas, codones de inicio y terminación de la traducción y elementos procedentes de picornavirus (en particular, un sito de entrada a ribosomas interno o IRES, también citado como una secuencia CITE).

En otras realizaciones, un polinucleótido de a presente divulgación es ARN, por ejemplo, en forma de ARN mensajero (ARNm).

Los polinucleótidos y las regiones codificantes de ácido nucleico de la presente divulgación pueden asociarse con regiones codificantes adicionales que codifican péptidos secretorios o de señal, que dirigen la secreción de un polipéptido codificado por un polinucleótido de la presente divulgación. De acuerdo con la hipótesis de la señal, las proteínas secretadas por células de mamíferos tienen un péptido señal o secuencia líder secretora que se escinde de la proteína madura una vez que se ha iniciado la exportación de la cadena de la proteína de crecimiento a través del retículo endoplásmico rugoso. Un experto habitual en la materia será consciente de que los polipéptidos secretados por células de vertebrados tienen generalmente un péptido de señal fusionado con el extremo N terminal del polipéptido, que se escinde del polipéptido completo o de "longitud completa" para producir una forma secretada o "madura" del polipéptido. En determinadas realizaciones, se usa el péptido de señal nativo, por ejemplo, por ejemplo, un péptido de señal de cadena pesada o de cadena ligera de inmunoglobulina, o un derivado funcional de esa secuencia que conserva la capacidad para dirigir la secreción del polipéptido que se encuentra asociado operablemente con el mismo. Como alternativa, puede usarse un péptido de señal de mamífero heterólogo o un derivado funcional del mismo. Por ejemplo, puede sustituirse la secuencia líder de tipo silvestre con la secuencia líder del activador de plasminógeno tisular humano (TPA) o β-glucuronidasa de ratón.

Una "molécula de unión" o una "molécula de unión a antígeno" de la presente divulgación se refiere, en su sentido más amplio, a una molécula que se une

específicamente a un determinante antigénico. En una realización, la molécula de unión se une específicamente a IL-33, en particular, a redIL-33 o a IL-33-DSB. En una realización, una molécula de unión de la divulgación es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En otra realización, una molécula de unión de la divulgación comprende al menos una CDR de cadena pesada o ligera de una molécula de anticuerpo de referencia. En otra realización, una molécula de unión de la divulgación comprende al menos seis CDR de una o más moléculas de anticuerpo de referencia.

La presente divulgación se refiere a determinados anticuerpos anti-IL-33 o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos.

Anticuerpo, en el sentido empleado en el presente documento, se refiere a una molécula de inmunoglobulina tal como se describe en más detalle más adelante, en particular a un anticuerpo de longitud completa o a una molécula que comprende un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, una molécula de DVD-Ig y similares.

Un fragmento de unión es un fragmento de unión a epítopo/antígeno de un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, que comprende un sitio de unión, en particular, que comprende 6 CDR, tal como 3 CDR en la región variable de cadena pesada y 3 CDR en la región variable de cadena ligera.

A menos que se haga referencia a anticuerpos de longitud completa, tales como anticuerpos de origen natural, la expresión "anticuerpos anti-IL-33" abarca anticuerpos de longitud completa así como fragmentos de unión a antígeno, variantes, análogos o derivados de dichos

anticuerpos, por ejemplo, moléculas de anticuerpo o de inmunoglobulina de origen natural o moléculas o fragmentos de anticuerpo diseñados por ingeniería genética que se unen a un antígeno de un modo similar a las moléculas de anticuerpo.

Los anticuerpos "humanos" o "completamente humanos", tal como se usan en el presente documento, incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados a partir de bibliotecas de inmunoglobulina humana o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas. Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos pueden producirse por una serie de métodos conocidos en la técnica que incluyen métodos de presentación en fago usando bibliotecas obtenidas a partir de secuencias de inmunoglobulina humanas, tal como se describe en Vaughan *et al.*, *Nat. Biotech. 14*:309-314 (1996), Sheets *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. 95*:6157-6162 (1998), Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol. 227*:381 (1992) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol. 222*:581 (1991)). Las técnicas para la generación y el uso de fagotecas de anticuerpos se describen también en, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.° 5,969,108, 6,172,197, 5,885,793, 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915; 6,593,081; 6,300,064; 6,653,068; 6,706,484; y 7,264,963; y Rothe *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 376:1382 (2008) (cada uno de los cuales se incorpora por referencia en su totalidad). Además, como es de sobra conocido en la técnica, pueden producirse anticuerpos humanos usando

ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humanos. Para una revisión acerca de esta tecnología, véase Lonberg y Huszar, *Int. Rev. Immunol. 13*:65-93 (1995). Los anticuerpos "humanos" o "completamente humanos" también incluyen anticuerpos que comprenden al menos le dominio variable de una cadena pesada o al menos los dominios variables de una cadena pesada y una cadena ligera, donde los dominios variables tienen la secuencia de aminoácidos de los dominios variables de inmunoglobulina humana.

Los anticuerpos "humanos" o "completamente humanos" también incluyen anticuerpos "humanos" o "completamente humanos", tal como se han descrito anteriormente, que comprenden, consisten esencialmente en o consisten en, variantes (incluyendo derivados) de moléculas de anticuerpo (por ejemplo, las regiones VH y/o las regiones VL) descritas en el presente documento, uniéndose dichos anticuerpos o fragmentos de los mismos inmunoespecíficamente a un polipéptido de IL-33 o un fragmento o variante del mismo de acuerdo con la presente divulgación.

Pueden usarse técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo anti-IL-33 humano, incluyendo, pero sin limitación, mutagénesis de sitio dirigido y mutagénesis mediada por la PCR, que dan como resultado sustituciones de aminoácidos. En una realización, las variantes (incluyendo derivados) codifican menos de 50 sustituciones de aminoácidos, menos de 40 sustituciones de aminoácidos, menos de 30 sustituciones de

aminoácidos, menos de 25 sustituciones de aminoácidos, menos de 20 sustituciones de aminoácidos, menos de 15 sustituciones de aminoácidos, menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos o menos de 2 sustituciones de aminoácidos en relación con la región VH, la CDRH1, CDRH2, CDRH3, la región VL, la CDRL1, CDRL2 o CDRL3 de referencia.

En determinadas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos conservadoras, descritas en más detalle más adelante. Como alternativa, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de la totalidad o parte de la secuencia codificante, tal como por mutagénesis de saturación y puede explorarse la actividad biológica de los mutantes resultantes para identificar mutantes que conservan la actividad (por ejemplo, la capacidad de unirse a un polipéptido de IL-33, por ejemplo, IL-33 humana, de primate, murina o cualquier combinación de humana, de primate y murina). Dichas variantes (o derivados de las mismas) de anticuerpos "humanos" o "completamente humanos" también pueden citarse como anticuerpos humanos o completamente humanos que están "optimizados" u "optimizados para la unión al antígeno" e incluyen, pero sin limitación, anticuerpos que tienen afinidad mejorada por el antígeno, anticuerpos con especificidad antigénica alterada o anticuerpos con posibles desventajas estructurales reducidas.

Estructuras de inmunoglobulina básicas en sistemas de vertebrados se entienden relativamente bien. véase, por ejemplo, Harlow et al. (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (2ª ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Tal como se describirá con mayor detalle más adelante, el término "inmunoglobulina" comprende varias clases extensas de polipéptidos que se pueden distinguir bioquímicamente. Los expertos en la materia apreciarán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, (γ, μ, α, δ, ε) con algunas subclases entre ellas (por ejemplo, γ1-γ4). La naturaleza de esta cadena es la que determina la "clase" del anticuerpo como IgG, IgM, IgA IgG o IgE, respectivamente. Las subclases de inmunoglobulinas (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc. se encuentran bien caracterizadas y se sabe que confieren especialización funcional. Las versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos son fácilmente distinguibles por los expertos en la matera a la vista de la presente divulgación y, por consiguiente, se encuentran dentro del alcance de la presente divulgación. Aunque la siguiente descripción se referirá de manera general a la clase IgG de moléculas de inmunoglobulina, todas las clases de inmunoglobulina se encuentran claramente dentro del alcance de la presente divulgación. En referencia a una IgG, una molécula de inmunoglobulina convencional comprende dos polipéptidos de cadena ligera idénticos con un peso molecular de aproximadamente 23,000 Dalton y dos polipéptidos de cadena pesada idénticos con un peso molecular de 53,000-70,000. Las cuatro cadenas están normalmente unidas por enlaces disulfuro en una configuración en "Y", en donde las cadenas ligeras sujetan a las cadenas pesadas que comienzan en la embocadura de la "Y" y continúan a lo largo de la región variable.

Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda (κ, λ). Cada clase de cadena pesada puede estar unida con

una cadena ligera kappa o una lambda. En general, las cadenas ligeras y pesadas se unen covalentemente entre sí y las porciones de "cola" de las dos cadenas pesadas se unen entre sí mediante enlaces covalentes disulfuro o mediante enlaces no covalentes cuando las inmunoglobulinas se generan por hibridomas, células B o células hospedadoras modificadas por ingeniería genética. En la cadena pesada, la secuencia de aminoácidos discurre desde el extremo N-terminal en los extremos de horquilla de la configuración Y al extremo C-terminal en la parte inferior de cada una de las cadenas.

La base del anticuerpo "Y" se denomina la región Fc (Fragmento, cristalizable) y está compuesta de dos cadenas pesadas que aportan dos o tres dominios constantes, dependiendo de la clase del anticuerpo. Por lo tanto, la región Fc de une a una clase específica de receptores de Fc y a otras moléculas inmunitarias, tales como proteínas de complemento. Las cadenas tanto ligeras como pesadas se dividen en regiones de homología estructural y funcional. Los términos "constante" y "variable" se utilizan funcionalmente. En este sentido, se apreciará que lo dominios variables tanto de las porciones de cadena ligera (Vλ o Vκ) y de cadena pesada (VH) determinan el reconocimiento y la especificidad por el antígeno. Por el contrario, los dominios constantes de la cadena ligera (CL) y de la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) confieren propiedades biológicas importantes, tales como secreción, movilidad transplacentaria, unión al receptor de Fc, unión al complemento y similares. Por convención, la numeración de los dominios de la región constante aumenta a medida que se vuelven más distales del sitio de unión al antígeno o al

extremo amino del anticuerpo. La porción N-terminal es una región variable y en la porción C-terminal se encuentra una región constante; los dominios CH3 y CL comprenden de hecho el extremo carboxilo de la cadena pesada y de la cadena ligera, respectivamente.

Como se ha indicado anteriormente, la región variable permite que el anticuerpo reconozca de manera selectiva y se una específicamente a epítopos sobre antígenos. Es decir, el dominio VL y el dominio VH o un subconjunto de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) dentro de estos dominios variables de un anticuerpo, se combinan para formar la región variable que define un sitio de unión a antígeno tridimensional. Esta estructura cuaternaria del anticuerpo forma el sitio de unión a antígeno presente en el extremo de cada brazo de la Y. Más específicamente, el sitio de unión a antígeno se define por tres CDR en cada una de las cadenas VH y VL. Por ejemplo, en algunos casos, en determinadas moléculas de inmunoglobulina procedentes de especies de camélidos o diseñadas por ingeniería genética basándose en inmunoglobulinas de camélido, una molécula de inmunoglobulina completa puede consistir solo en las cadenas pesadas, sin cadenas ligeras. Véase, por ejemplo, Hamers-Casterman *et al*., *Nature 363*:446-448 (1993).

En anticuerpos que se producen de manera natural, las seis "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR" presentes en cada dominio de unión a antígeno son secuencias de aminoácidos cortas, no contiguas que están situadas específicamente para formar el dominio de unión a antígeno a medida que el anticuerpo adopta su configuración tridimensional en un entorno acuoso. El resto de los

aminoácidos en los dominios de unión a antígeno, citados como regiones "marco conservadas" muestran una menor variabilidad intermolecular. Las regiones marco conservadas adoptan en su mayoría una conformación de β-lámina y las CDR forman bucles que conectan y en algunos casos forman parte de la estructura de la β-lámina. Por lo tanto, las regiones marco conservadas actúan formando un armazón que posibilita el posicionamiento de las CDR en la orientación correcta mediante interacciones intercadena no covalentes. El dominio de unión a antígeno formado por las CDR posicionadas define una superficie complementaria al epítopo sobre el antígeno inmunorreactivo. Esta superficie complementaria fomenta la unión no covalente del anticuerpo a su epítopo relacionado. Los aminoácidos que forman las CDR y las regiones marco conservadas, respectivamente, pueden identificarse fácilmente para cualquier dominio variable de cadena pesada o ligera por una persona normalmente versada en la materia ya que se han definido de una manera precisa (véase más adelante).

En caso de que haya dos o más definiciones de un término que se use y/o acepte en la técnica, se pretende que la definición del término empleada en el presente documento incluya todos estos significados, a menos que se indique explícitamente lo contrario. Un ejemplo específico es el uso del término "región determinante de complementariedad" ("CDR") para describir los sitios no contiguos que se combinan con el antígeno y que se encuentran en la región variable de los polipéptidos de las cadenas tanto pesadas como ligeras. Esta región concreta se ha descrito por Kabat *et al.* (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological

Interest" y por Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol. 196*:901-917 (1987), que se incorporan al presente documento por referencia, incluyendo las definiciones restos de aminoácidos solapantes o subconjuntos de estos cuando se comparan entre si. No obstante, se pretende que la aplicación de cualquiera de las definiciones para referirse a una CDR de un anticuerpo o variantes del mismo esté dentro del alcance del término según se define y utiliza en el presente documento. Los restos de aminoácido adecuados que abarcan las CDR, según se definen por cada una de las referencias citadas anteriormente se exponen a continuación en la tabla **Table 1** a modo de comparación. Los números de resto exactos que abarcan una CDR concreta variarán dependiendo de la secuencia y el tamaño de la CDR. Los expertos en la materia pueden determinar de manera rutinaria qué restos comprenden una CDR particular a partir de la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

Tabla 1. Definiciones de las CDR[1]

	Kabat	Chothia
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

[1]La numeración de todas las definiciones de CDR en la tabla 1 es acorde con las convenciones de numeración expuestas por Kabat et al. (véase más adelante).

Kabat *et al.* también definieron un sistema de numeración para secuencias de dominio variable que es aplicable a cualquier anticuerpo. Una persona normalmente versada en la materia puede asignar de manera unívoca este sistema de "numeración de Kabat" a cualquier secuencia de dominio variable, sin depender de ningún dato experimental más allá de la secuencia en sí. Tal como se usa en el presente documento, la "numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración expuesto por Kabat *et al.* (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest." A menos que se especifique lo contrario, las referencias a la numeración de las posiciones de restos de aminoácido específicos en un anticuerpo anti-IL-33 o un fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo de la presente divulgación es acorde al sistema de numeración de Kabat.

Los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la divulgación incluyen, pero sin limitación, anticuerpos policlonales, monoclonales, multiespecíficos, de ratón, de ser humano, humanizados, primatizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos de unión a epítopo, por ejemplo, Fab, Fab' y $F(ab')_2$, Fd, Fv, Fv monocatenarios (scFv), Fv unidos por disulfuro (sdFv), fragmentos que comprenden un dominio VL o VH, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id para anticuerpos anti-IL-33 divulgados en el presente documento). Las moléculas scFv se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos N.° 5,892,019. Las moléculas de inmunoglobulina o de

anticuerpo de la divulgación pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2, etc.), o subclase de molécula de inmunoglobulina.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "porción de cadena pesada" incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena ligera de inmunoglobulina. Un polipéptido que comprende una porción de cadena pesada comprende al menos uno de: un dominio CH1, un dominio de bisagra (por ejemplo, región bisagra superior, intermedia o inferior) un dominio CH2, un dominio CH3 o una variante o fragmento del mismo. Por ejemplo, un polipéptido de unión para su uso en la divulgación puede comprender una cadena de polipéptido que comprende un dominio CH1; una cadena de polipéptido que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra y un dominio CH2; una cadena de polipéptido que comprende un dominio CH1 y un dominio CH3; una cadena de polipéptido que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra y un dominio CH3; o una cadena de polipéptido que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En otra realización, un polipéptido de la divulgación comprende una cadena de polipéptido que comprende un dominio CH3. Además, un polipéptido de unión para su uso en la divulgación puede carecer de al menos una parte de un dominio CH2 (por ejemplo, la totalidad o parte de un dominio CH2). Tal como se ha expuesto anteriormente, una persona normalmente versada en la materia entenderá que estos dominios (por ejemplo, las porciones de cadena pesada) pueden modificarse de tal modo que varían en cuanto

a su secuencia de aminoácidos respecto de la molécula de inmunoglobulina de origen natural.

En determinados anticuerpos anti-IL-33 o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos divulgados en el presente documento, las porciones de cadena pesada de una cadena de polipéptido de un multímero son idénticas a aquellas en una segunda cadena de polipéptido del multímero. Como alternativa, los monómeros que contienen una porción de cadena pesada de la divulgación no son idénticos. Por ejemplo, cada monómero puede comprender un sitio de unión a antígeno diana diferente, formando, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico.

Las porciones de cadena pesada de una molécula de unión para su uso en los métodos de diagnóstico y tratamiento divulgados en el presente documento pueden obtenerse de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, una porción de cadena pesada de un polipéptido puede comprender un dominio C_{H1} procedente de una molécula de IgG1 y una región bisagra procedente de una molécula de IgG3. En otro ejemplo, una porción de cadena pesada puede comprender una región bisagra procedente, en parte, de una molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG3. En otro ejemplo, una porción de cadena pesada puede comprender una bisagra quimérica procedente, en parte, de una molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG4.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "porción de cadena ligera" incluye secuencias de aminoácido procedentes de una cadena ligera de inmunoglobulina, por ejemplo, una cadena ligera kappa o lambda. Preferentemente,

la porción de cadena ligera comprende al menos uno de un dominio VL o CL.

Los anticuerpos anti-IL-33 o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos divulgados en el presente documento pueden describirse o especificarse en términos de los epítopos o las porciones de un antígeno, por ejemplo, un polipéptido diana divulgado en el presente documento (por ejemplo, IL-33 de longitud completa o madura) que reconocen o al que se unen específicamente. La porción de un polipéptido diana que interactúa específicamente con el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo es un "epítopo" o un "determinante antigénico". Un polipéptido diana puede comprender un solo epítopo, pero normalmente comprende al menos dos epítopos y puede incluir cualquier número de epítopos, dependiendo del tamaño, la conformación y el tipo de antígeno. Además, cabe destacar que un "epítopo" en un polipéptido diana puede ser o puede incluir elementos no polipeptídicos, por ejemplo, un epítopo puede incluir una cadena lateral de carbohidrato.

Se cree que el tamaño mínimo de un epítopo peptídico o polipeptídico es de aproximadamente cuatro a cinco aminoácidos. Los epítopos peptídicos o polipeptídicos contienen preferentemente al menos siete, más preferentemente al menos nueve y lo más preferentemente entre al menos aproximadamente 15 y aproximadamente 30 aminoácidos. Ya que una CDR puede reconocer a un péptido o polipéptido antigénico en su forma terciaria, los aminoácidos que comprenden un epítopo no tienen por qué ser contiguos y en algunos casos, pueden incluso no encontrarse en la misma cadena de péptido. Un epítopo peptídico o polipeptídico reconocido por los anticuerpos anti-IL-33 de

la presente divulgación puede contener una secuencia de al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, más preferentemente al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25 o entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 aminoácidos contiguos o no contiguos de la IL-33.

Por "se une específicamente" se entiende generalmente que un anticuerpo se une a un epítopo a través de su dominio de unión a antígeno y que la unión implica cierta complementariedad entre el dominio de unión a antígeno y el epítopo. Según esta definición, se dice que un anticuerpo "se une específicamente" a un epítopo cuando se une a ese epítopo, a través de su dominio de unión a antígeno, más fácilmente de lo que se uniría a un epítopo aleatorio no relacionado. El término "especificidad" se usa en el presente documento para calificar la afinidad relativa mediante la cual un determinado anticuerpo se une a un determinado epítopo. Por ejemplo, puede considerarse que el anticuerpo "A" tiene una especificidad mayor por un epítopo dado que el anticuerpo "B" o puede decirse que el anticuerpo "A" se une al epítopo "C" con una mayor especificidad que la que tiene por el epítopo relacionado "D".

En una realización, un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo se une preferencialmente a IL-33. Por "se une preferencialmente" se entiende que el anticuerpo se une específicamente a un epítopo más fácilmente de lo que se uniría a un epítopo relacionado, similar, homólogo o análogo. Por lo tanto, un anticuerpo que "se une preferencialmente" a un epítopo dado se unirá con mayor probabilidad a ese epítopo que a un epítopo relacionado,

incluso aunque dicho anticuerpo pueda presentar reactividad cruzada con el epítopo relacionado.

A modo de ejemplo no limitante, puede considerarse que un anticuerpo se une preferencialmente a un primer epítopo en caso de que se una a dicho primer epítopo con una constante de disociación (K_D) que es menor que la K_D del anticuerpo por el segundo epítopo. En otro ejemplo no limitante, puede considerarse que un anticuerpo se une preferencialmente a un primer antígeno en caso de que se una al primer epítopo con una afinidad que es al menos un orden de magnitud menor que la K_D del anticuerpo por el segundo epítopo. En otro ejemplo no limitante, puede considerarse que un anticuerpo se une preferencialmente a un primer epítopo en caso de que se una al primer epítopo con una afinidad que es al menos dos órdenes de magnitud menor que la K_D del anticuerpo por el segundo epítopo.

En otro ejemplo no limitante, puede considerarse que un anticuerpo se une preferencialmente a un primer epítopo en caso de que se una al primer epítopo con una velocidad de disociación (k(off)) que es menor que la k(off) del anticuerpo por el segundo epítopo. En otro ejemplo no limitante, puede considerarse que un anticuerpo se une preferencialmente a un primer epítopo en caso de que se una al primer epítopo con una afinidad que es al menos un orden de magnitud menor que la k(off) del anticuerpo por el segundo epítopo. En otro ejemplo no limitante, puede considerarse que un anticuerpo se une preferencialmente a un primer epítopo en caso de que se una al primer epítopo con una afinidad que es al menos dos órdenes de magnitud menor que la k(off) del anticuerpo por el segundo epítopo.

En una realización, puede decirse que un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del miso de acuerdo con la presente divulgación se une a un polipéptido diana divulgado en el presente documento (por ejemplo, IL-33, por ejemplo, IL-33 humana, de primate, murina o cualquier combinación de humana, de primate y murina) o un fragmento o variante de la misma con una velocidad de disociación (k(off)) menor o igual a 5 X 10^{-1} s^{-1}, 10^{-1} s^{-1}, 5 X 10^{-2} s^{-1}, 10^{-2} s^{-1}, 5 X 10^{-3} s^{-1} o 10^{-3} s^{-1}. Por ejemplo, puede decirse que un anticuerpo de la divulgación se une a un polipéptido diana divulgado en el presente documento (por ejemplo, IL-33, por ejemplo, IL-33 humana, de primate, murina o cualquier combinación de humana, de primate y murina) o un fragmento o variante de la misma con una velocidad de disociación (k(off)) menor o igual a 5 X 10^{-4} s^{-1}, 10^{-4} s^{-1}, 5 X 10^{-5} s^{-1} o 10^{-5} s^{-1}, 5 X 10^{-6} s^{-1}, 10^{-6} s^{-1}, 5 X 10^{-7} s^{-1} o 10^{-7} s^{-1}.

En una realización, puede decirse que un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo divulgado en el presente documento se une a un polipéptido diana divulgado en el presente documento (por ejemplo, IL-33, por ejemplo, IL-33 humana, de primate, murina o cualquier combinación de humana, de primate y murina) o un fragmento o variante de la misma con una velocidad de asociación (k(on)) mayor o igual a 10^{3} M^{-1} s^{-1}, 5 X 10^{3} M^{-1} s^{-1}, 10^{4} M^{-1} s^{-1} o 5 X 10^{4} M^{-1} s^{-1}. Por ejemplo, puede decirse que un anticuerpo de la divulgación se une a un polipéptido diana divulgado en el presente documento (por ejemplo, IL-33, por ejemplo, IL-33 humana, de primate, murina o cualquier combinación de humana, de primate y murina) o un fragmento o variante de la misma con una

velocidad de asociación (k(on)) mayor o igual a 10^5 M^{-1} s^{-1}, 5 X 10^5 M^{-1} s^{-1}, 10^6 M^{-1} s^{-1} o 5 X 10^6 M^{-1} s^{-1} o 10^7 M^{-1} s^{-1}.

Reactividad cruzada, en el sentido empleado en el presente documento, pretende hacer referencia a los casos donde las moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos, se unen al mismo epítopo o a epítopos solapantes. La unión de inhibición competitiva, en el sentido empleado en el presente documento, es una forma de reactividad cruzada.

Se dice que un anticuerpo inhibe de manera competitiva la unión de un anticuerpo de referencia a un epítopo concreto en caso de que se una preferencialmente a ese epítopo en la medida que bloquea, hasta cierto punto, la unión del anticuerpo de referencia al epítopo. La inhibición competitiva puede determinarse mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, ensayos en fase sólida, tales como ensayos ELISA de competición, inmunoensayos de fluorescencia de lantánido potenciada por disociación (DELFIA®, Perkin Elmer) y ensayos de unión a radioligandos. Puede decirse que un anticuerpo inhibe de manera competitiva la unión del anticuerpo a un epítopo dado en al menos un 90%, al menos un 80%, al menos un 70%, al menos un 60% o al menos un 50%.

Tal como se usa en el presente documento, el término "afinidad" se refiere a una medida de la fuerza de la unión de un epítopo individual con la CDR de una molécula de inmunoglobulina. Véase, por ejemplo, Harlow *et al*. (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed.) páginas 27-28. Tal como se usa en el presente documento, el término "avidez" se refiere a la estabilidad general del complejo entre una población de

inmunoglobulinas y un antígeno, es decir, la fuerza de combinación funcional de una mezcla de inmunoglobulina con el antígeno. Véase, por ejemplo, Harlow en las páginas 29-34. La avidez está relacionada tanto con la afinidad de las moléculas de inmunoglobulina individuales en la población con los epítopos específicos como con las valencias de las inmunoglobulinas y el antígeno. Por ejemplo, la interacción entre un anticuerpo monoclonal bivalente y un antígeno con una estructura de epítopo altamente repetitiva, tal como un polímero, tendrá una gran avidez.

Los anticuerpos anti-IL-33 o los fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la divulgación también pueden describirse o especificarse en términos de su reactividad cruzada. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "reactividad cruzada" se refiere a la capacidad de un anticuerpo, específico para un antígeno, de reaccionar con un segundo antígeno; una medida del grado de relación entre dos sustancias antigénicas diferentes. Por lo tanto, un anticuerpo presenta reactividad cruzada en caso de que se una a un epítopo diferente al que indujo su formación. El epítopo con reactividad cruzada contiene generalmente muchas de las mismas características estructurales complementarias del epítopo inductor y en algunos casos, puede encajar mejor que el original.

Por ejemplo, determinados anticuerpos tienen cierto grado de reactividad cruzada, en tanto que se unen a epítopos relacionados pero no idénticos, por ejemplo, epítopos con al menos un 95%, al menos un 90%, al menos un 85%, al menos un 80%, al menos un 75%, al menos un 70%, al menos un 65%, al menos un 60%, al menos un 55% y al menos

un 50% de identidad (calculada usando métodos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento) respecto de un epítopo de referencia. Puede decirse que un anticuerpo tiene poca o ninguna reactividad cruzada en caso de que no se una a epítopos con menos de un 95%, menos de un 90%, menos de un 85%, menos de un 80%, menos de un 75%, menos de un 70%, menos de un 65%, menos de un 60%, menos de un 55% y menos de un 50% de identidad (calculada usando métodos conocidos en la técnica y descrito en el presente documento) respecto de un epítopo de referencia. Puede considerarse un anticuerpo como "altamente específico" para un epítopo determinado en caso de que no se una a cualquier otro análogo, ortólogo u homólogo de ese epítopo.

Las moléculas de unión anti-IL-33, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la divulgación también pueden describirse o especificarse en términos de su afinidad de unión a un polipéptido de la divulgación por ejemplo, IL-33, por ejemplo, IL-33 humana, de primate, murina o cualquier combinación de humana, de primate y murina. Las afinidades de unión preferidas incluyen aquellas con una constante de disociación o Kd de menos de 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M o 10^{-15} M.

Los anticuerpos anti-IL-33 o los fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la divulgación pueden ser "multiespecíficos", por ejemplo, biespecíficos, lo que significa que reconocen y se unen a

dos o más epítopos diferentes presentes en uno o más antígenos diferentes (por ejemplo, proteínas) al mismo tiempo. Por lo tanto, que un anticuerpo anti-IL-33 sea "monoespecífico" o "multiespecífico", por ejemplo, biespecífico se refiere al número de diferentes epítopos con los que reacciona un polipéptido de unión. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítopos de un polipéptido diana descrito en el presente documento o puede ser específico para un polipéptido diana así como para un epítopo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo o un material de soporte sólido.

Tal como se usa en el presente documento, el término "valencia" se refiere al número de dominios de unión potenciales, por ejemplo, dominios de unión a antígeno presentes en un polipéptido de unión o una molécula de unión a IL-33, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Cada dominio de unión se une específicamente a un epítopo. Cuando un polipéptido de unión o una molécula de unión a IL-33 comprende más de un dominio de unión, cada dominio de unión puede unirse específicamente al mismo epítopo, para un anticuerpo con dos dominios de unión, denominado "monoespecífico bivalente" o para diferentes epítopos, para un anticuerpo con dos dominios de unión, denominado "biespecífico bivalente". Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo también puede ser biespecífico y bivalente para cada especificidad (lo que se denomina "anticuerpos tetravalentes biespecíficos"). En otra realización, pueden producirse minibodies tetravalentes o anticuerpos de dominio eliminado.

Los anticuerpos bivalentes biespecíficos y los métodos para producirlos se describen, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos N.° 5,731,168; 5,807,706; 5,821,333; y el las Publicaciones de Solicitud de patente de los Estados Unidos N.° 2003/020734 y 2002/0155537, cuyas divulgaciones se incorporan al presente documento por referencia. Los anticuerpos tetravalentes biespecíficos y los métodos para producirlos se describen, por ejemplo, en los documentos WO 02/096948 y WO 00/44788, incorporándose las divulgaciones de ambos al presente documento por referencia. Véase, de manera general, las Publicaciones PCT WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt *et al.*, *J. Immunol. 147*:60-69 (1991); las Patentes de los Estados Unidos N.° 4,474,893; 4,714,681; 4,925,648; 5,573,920; 5,601,819; Kostelny *et al.*, *J. Immunol. 148*: 1547-1553 (1992).

Tal como se ha indicado previamente, las estructuras de las subunidades y la configuración tridimensional de las regiones constantes de las diversas clases de inmunoglobulina son bien conocidas. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "dominio VH" incluye el dominio variable amino-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina y la expresión "dominio CH1" incluye el primer dominio de región constante (más próximo al amino-terminal) de una cadena pesada de inmunoglobulina. El dominio CH1 se encuentra adyacente al dominio VH y está en posición amino-terminal respecto de la región bisagra de una molécula de cadena pesada de inmunoglobulina.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "dominio CH2" incluye la porción de una molécula de cadena pesada que se extiende, por ejemplo, desde aproximadamente

el resto 244 al resto 360 de un anticuerpo usando esquemas de numeración convencionales (restos 244 a 360, sistema de numeración de Kabat; y restos 231-340, sistema de numeración EU; véase Kabat EA *et al*.). El dominio CH2 es único, en tanto que no está estrechamente emparejado con otro dominio. En su lugar, se interponen dos cadenas de carbohidrato unidas en N entre los dos dominios CH2 de una molécula de IgG nativa intacta. También se ha documentado exhaustivamente que el dominio CH3 se extiende desde el dominio CH2 hasta el extremo C-terminal de la molécula de IgG y comprende aproximadamente 108 restos.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "región bisagra" incluye la porción de una molécula e cadena pesada que enlaza el dominio CH1 con el domino CH2. Esta región bisagra comprende aproximadamente 25 restos y es flexible, permitiendo de este modo que las dos regiones de unión a antígeno N-terminales se muevan de manera independiente. Las regiones bisagra pueden subdividirse en tres dominios distintos: dominios bisagra superior, intermedio e inferior (Roux *et al.*, *J. Immunol. 161*:4083 (1998)).

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "enlace disulfuro" incluye el enlace covalente formado entre dos átomos de azufre. El aminoácido cisteína comprende un grupo tiol que puede formar un enlace o puente disulfuro con un segundo grupo tiol. En la mayoría de las moléculas de IgG de origen natural, las regiones CH1 y CL están unidas mediante un enlace disulfuro y las dos cadenas pesadas están unidas por dos enlaces disulfuro en posiciones correspondientes a 239 y 242 usando el sistema

de numeración de Kabat (posición 226 o 229, sistema de numeración EU).

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo quimérico" se referirá a cualquier anticuerpo en donde la región o sitio inmunorreactivo se obtiene o procede de una primera especie y la región constante (que puede estar intacta o ser parcial o modificada de acuerdo con la presente divulgación) se obtiene de una segunda especie. En determinadas realizaciones, la región o el sitio de unión a la diana será de una fuente no humana (por ejemplo, de ratón o primate) y la región constante es humana.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo modificado por ingeniería genética" se referirá a un anticuerpo humano en el que el dominio variable en la cadena pesada o la cadena ligera o en ambas está alterado mediante al menos un reemplazo de aminoácidos. En una realización, el reemplazo de restos marco conservados reducirá la potencial inmunogenicidad cambiando el resto marco conservado a la línea germinal. En otra realización, el reemplazo de aminoácidos de restos marco conservados o de CDR puede eliminar posibles desventajas estructurales que puedan dar como resultado inestabilidad, agregación o heterogeneidad del producto. Los ejemplos de desventajas no deseadas incluyen cisteínas no emparejadas (lo que puede ocasionar mezclado de los enlaces disulfuro o la formación de aductos de sulfhidrilo variables), sitios de glucosilación unidos a N (que dan como resultado heterogeneidad de la estructura y actividad), así como sitios de desamidación (por ejemplo, NG, NS), isomerización (DG), oxidación (metionina expuesta), e hidrólisis (DP). En

otra realización, el reemplazo de aminoácidos de restos de CDR y marco conservados mediante una estrategia de mutagénesis dirigida o aleatoria puede dar como resultado anticuerpos con características de unión, potencia o especificidad mejoradas. En otra realización, "anticuerpo modificado por ingeniería genética" se refiere a un anticuerpo en el que el dominio variable en la cadena pesada o la cadena ligera o en ambas está alterado mediante un reemplazo al menos parcial de una o más CDR de un anticuerpo con especificidad conocida y, en caso necesario, por un reemplazo de la región marco conservada y un cambio de secuencia. Aunque las CDR pueden proceder de un anticuerpo de la misma clase o incluso subclase que el anticuerpo del que proceden las regiones marco conservadas, se prevé que las CDR procedan de un anticuerpo de una clase diferente y preferentemente, de un anticuerpo de una especie diferente.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo humanizado" se referirá a una molécula de anticuerpo procedente de un anticuerpo de una especie no humana (también citado en el presente documento como un anticuerpo donante) que se une al antígeno deseado que tiene una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la especie no humana y una región marco conservada de una molécula de inmunoglobulina humana (también citado en el presente documento como un anticuerpo aceptor). Puede no ser necesario reemplazar todas las CDR por las CDR completas del dominio variable donante para transferir la capacidad de unión a antígeno de un dominio variable al otro. En su lugar, puede ser necesario transferir únicamente aquellos restos que son

necesarios para mantener la actividad del sitio de unión a la diana.

Además, se reconoce que las regiones marco conservadas dentro del dominio variable en una cadena pesada o una cadena ligera o ambas de un anticuerpo humanizado pueden comprender únicamente restos de origen humano, en cuyo caso estas regiones marco conservadas del anticuerpo humanizado se nombran como "regiones marco conservadas completamente humanas". Como alternativa, pueden modificarse por ingeniería genética uno o más restos de las regiones marco conservadas del dominio variable dentro de la posición correspondiente de las regiones marco conservadas humanas de un dominio variable en una cadena pesada o una cadena ligera o ambas de un anticuerpo humanizado en caso necesario para mantener la unión adecuada o para potenciar la unión al antígeno de IL-33. Una región marco conservada humana que se haya modificado por ingeniería genética de este modo comprenderá por lo tanto una mezcla de restos marco conservados humanos y del donante y se cita en el presente documento como una "región marco conservada parcialmente humana".

Por ejemplo, la humanización de un anticuerpo anti-IL-33 puede llevarse a cabo esencialmente por métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, *Nature 321*:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature 332*:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science 239*:1534-1536 (1988)), sustituyendo las CDR de roedor o mutantes de redor o las secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano anti-IL-33. Véanse también las Patentes de los Estados Unidos N.° 5,225,539; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; 5,859,205;

incorporadas al presente documento por referencia. El anticuerpo humanizado anti-IL-33 resultante comprenderá al menos una CDR de roedor o mutante de roedor dentro de las regiones marco conservadas completamente humanas del dominio variable de la cadena pesada y/o ligera del anticuerpo humanizado. En algunos casos, se reemplazan restos dentro de las regiones marco conservadas de uno o más dominios variables del anticuerpo humanizado anti-IL-33 por restos no humanos correspondientes (por ejemplo, de roedor) (véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos N.° 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; y 6,180,370), en cuyo caso, el anticuerpo humanizado anti-IL-33 comprendería regiones marco conservadas parcialmente humanas dentro del dominio variable de la cadena pesada y/o ligera.

Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en anticuerpo donante. Estas modificaciones se efectúan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo (por ejemplo, para obtener una afinidad deseada). En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno y típicamente dos dominios variables, en los que la totalidad o sustancialmente todas las CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones marco conservadas son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones *et al.*, *Nature 321*:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*

332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol. 2*:593-596 (1992); incorporados al presente documento por referencia. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" pueden incluir anticuerpos en donde se ha sustituido sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos marco conservados se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos N.° 5,225,539; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; 5,859,205. Véase también la Patente de los Estados Unidos N.° 6,180,370, y la Publicación Internacional N.° WO 01/27160, donde se divulgan anticuerpos humanizados y técnicas para producir anticuerpos humanizados que tienen afinidad mejorada por un antígeno predeterminado.

Tal como se usan en el presente documento, los términos "unido", "fusionado" o "fusión" se usan de manera indistinta. Estos términos se refieren a la unión de dos o más elementos o componentes por cualquier medio incluyendo conjugación química o medios recombinantes. Una "fusión en fase" se refiere a la unión de dos o más fases abiertas de lectura (ORF) para formar una ORF continua más larga, de tal modo que mantiene la fase de lectura traduccional correcta de las ORF originales. Por lo tanto, una proteína de fusión recombinante es una sola proteína que contiene dos o más segmentos que corresponden a polipéptidos codificados por las ORF originales (cuyos segmentos no se encuentran normalmente unidos de este modo en la

naturaleza). Aunque la fase de lectura se hace continua de este modo a lo largo de los segmentos fusionados, los segmentos pueden separarse física o espacialmente mediante, por ejemplo, una secuencia enlazadora en fase. Por ejemplo, pueden fusionarse polinucleótidos que codifican las CDR de una región variable de inmunoglobulina mediante un polinucleótido que codifica al menos una región marco conservada de inmunoglobulina o regiones CDR adicionales, en tanto que las CDR "fusionadas" se traduzcan conjuntamente como parte de un polipéptido continuo.

En el contexto de los polipéptidos, una "secuencia lineal" o una "secuencia" es un orden de aminoácidos en un polipéptido en una dirección de amino a carboxilo terminal en la que los restos vecinos entre sí en la secuencia son contiguos en la estructura primaria del polipéptido.

El término "expresión", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un proceso mediante un cual un gen produce un agente bioquímico, por ejemplo, un polipéptido. El proceso incluye cualquier manifestación de la presencia funcional del gen en la célula que incluye, sin carácter limitante, el silenciamiento génico así como también tanto la expresión transitoria como la expresión estable. Esto incluye, sin limitación, la transcripción del gen en el ARN mensajero (ARNm) y la traducción de este ARNm en polipéptidos. Si el producto final deseado es un agente bioquímico, la expresión incluye la creación de ese agente bioquímico y cualquiera de sus precursores. La expresión de un gen produce un “producto génico”. Tal como se usa en el presente documento, un producto génico puede ser un ácido nucleico, por ejemplo, un ARN mensajero producido mediante la transcripción de un gen o un polipéptido que se traduce

a partir de un transcrito. Los productos génicos descritos en el presente documento incluyen además ácidos nucleicos con modificaciones postraduccionales, por ejemplo, poliadenilación o polipéptidos con modificaciones postraduccionales, por ejemplo, metilación, glucosilación, la adición de lípidos, asociación con otras subunidades de proteína, escisión proteolítica y similares.

Los términos "tratar" o "tratamiento", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren tanto a un tratamiento terapéutico como a medidas preventivas o profilácticas, donde el objetivo es prevenir o ralentizar (reducir) un trastorno o cambio fisiológico no deseado, tal como el avance de una afección inflamatoria. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, el alivio de los síntomas, la reducción del alcance de la enfermedad, la estabilización (es decir, no empeoramiento) del estado de la enfermedad, el retraso o la ralentización de la progresión de la enfermedad, la mejora o paliación de la patología y la remisión (ya sea parcial o total), ya sean detectables o no detectables. El "tratamiento" también se puede referir a la prolongación de la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Los sujetos que necesitan tratamiento incluyen los que ya padecen la afección o trastorno, así como aquellos que son propensos a padecer la afección o trastorno, o aquellos en los que se ha de prevenir la afección o trastorno.

El término "sujeto" o "individuo" o "animal" o "paciente" o "mamífero" se refiere a cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, al cual se desea aplicar una diagnosis, pronóstico o terapia. Los sujetos

mamíferos incluyen seres humanos; animales domésticos; animales de granja; animales de zoológico, de deporte o de compañía, tales como perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado, vacas y demás.

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones tales como "un sujeto que se beneficiaría de la administración de un anticuerpo anti-IL-33" y "un animal que necesita tratamiento" incluye sujetos, tales como sujetos mamíferos, que podrían beneficiarse de la administración de un anticuerpo anti-IL-33 usado, por ejemplo, para la detección de un polipéptido anti-IL-33 (por ejemplo, para un procedimiento de diagnóstico) y/o del tratamiento, es decir, la paliación o prevención de una enfermedad, con un anticuerpo anti-IL-33.

II. Descripción del polipéptido diana

Tal como se usa en el presente documento, los términos "IL-33" y "polipéptido de IL-33" se usan de manera indistinta. En determinadas realizaciones, la IL-33 es de longitud completa. En otra realización, la IL-33 es IL-33 madura truncada (aminoácidos 112-270). Estudios recientes sugieren que la IL-33 de longitud completa es activa (Cayrol y Girard, *Proc Natl Acad Sci U S A 106*(22):9021-6 (2009); Hayakawa *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun 387*(1):218-22 (2009); Talabot-Ayer *et al.*, *J Biol Chem. 284*(29):19420-6 (2009)). Sin embargo, la IL-33 procesada N-terminalmente o truncada que incluye, pero sin limitación, los aa 72-270, 79-270, 95-270, 99-270, 107-270, 109-270, 111-270, 112-270 puede tener una actividad mejorada (Lefrancais 2012, 2014). En otras realizaciones, la IL-33 puede incluir una IL-33 de longitud completa, un fragmento de la misma o un mutante o polipéptido variante de IL-33,

en donde el fragmento de IL-33 o el polipéptido variante de IL-33 retiene parte o la totalidad de las propiedades funcionales de la IL-33 activa.

La IL-33 humana es una proteína de 270 aminoácidos (N.° de Referencia O95760) que consta de dos dominios: un homeodominio y un dominio similar a citocina (similar a IL-1). El homeodominio contiene una señal de localización nuclear (NLS). La IL-33 se identificó originalmente como el gen "DVS27" que estaba regulado positivamente en las arterias vasoespásticas cerebrales después de una hemorragia subaracnoidea (Onda *et al.*, *J. Cereb. Blood Flow Metab. 19*:1279-88 (1999)), y como un "factor nuclear de las vénulas endoteliales altas (NF-HEV)", que se expresa en los núcleos de células endoteliales (Baekkevold *et al.*, *Am. J. Pathol 163*:69-79 (2003)). La IL-33 (también denominada IL-1F11) se considera actualmente como el 11º miembro de la familia de IL-1 de citocinas, que también incluye a IL-α, IL1β e IL-18. Véase Oboki *et al.*, *Allergology International 59*:143-160 (2010).

Schmitz *et al.* identificaron originariamente a la IL-33 como el ligando para el receptor huérfano ST2 (también denominado IL-1R4) (Schmitz *et al.*, *Immunity 23*(5)479-90 (2005)). El único ligando conocido del receptor ST2 es IL-33 (Schmitz *et al.* (2005)). El receptor de IL-33 está formado por moléculas heterodiméricas, que consiste en ST2 y la proteína accesoria IL-1R (IL-1RAcP). IL-1RAcP es un componente compartido de los receptores para IL-1α, IL-1β, IL-1F6, IL1F8 e IL1F9. La IL-33 se une al receptor de IL-33, que es un dímero de ST2 e IL-1RAcP. IL-1RAcP no es necesario para la unión, pero es crucial para la señalización. El dominio TIR del receptor de IL-33 recluta

a MyD88 y TRAF6 y la señal del receptor da como resultado la activación de las vías de NFκB y MAP cinasa (Oboki *et al.* (2010)). El receptor de IL-33 puede asociarse potencialmente con otros receptores y se ha comunicado que activa de manera cruzada la tirosina cinasa receptora c-Kit en mastocitos humanos y de ratón (Drube *et al.*, *Blood 115*:3899-906 (2010)). La base estructural para esta activación cruzada es la formación de un complejo entre c-Kit, ST2 e IL-1RAcP. C-Kit e IL-1RAcP interactúan de manera constitutiva y ST2 se une este complejo tras la unión al ligando.

Recientemente, se ha demostrado que IL-33 se une a un segundo complejo heterodimérico de receptor de IL-33. ST2 forma un complejo con otra molécula de la familia de IL-1R, "molécula relacionada con IL-1R de Ig individual" (SIGIRR) (también denominada IL-1R8 de Toll (TIR8)). Se considera que SIGIRR/TIR8 actúa como regulador negativo de IL-1R y de las respuestas inmunitarias mediadas por el receptor de tipo Toll (TLR) (Garlanda *et al.*, *Trends Immunol. 30*:439-46 (2009)). A diferencia de ST2:IL-1RAcP, ST2:SIGIRR parece ser un regulador negativo de la IL-33.

ST2 se expresa de manera basal por las células Th2 y los mastocitos, siendo conocidos ambos tipos celulares por ser mediadores importantes del asma alérgica. IL-33 es capaz de estimular estas (y diversas otras células) para producir una serie de respuestas funcionales que incluyen citocinas y quimiocinas.

Anticuerpos anti-IL-33

En determinadas realizaciones, las moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno o derivados de los mismos de la divulgación, por ejemplo, los

anticuerpos IL330065, IL330099, IL330101, IL330107, IL33149, and IL330180, and 33_640076-4B, 33_640081-AB; 33_640082-6B, 33_640082-7B, 33_640084-2B, 33_640086-6B, 33_640087-7B, 33_640201-2B y 33_640237-2B, se unen a IL-33 e inhiben la liberación de citocinas por mastocitos y células endoteliales y la proliferación de células TF-1, impulsadas por IL-33.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la divulgación comprenden anticuerpos anti-IL-33 o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos que se unen a IL-33, por ejemplo, los anticuerpos IL330065, IL330099, IL330101, IL330107, IL33149 e IL330180 y 33_640076-4B, 33_640081-AB; 33_640082-6B, 33_640082-7B, 33_640084-2B, 33_640086-6B, 33_640087-7B, 33_640201-2B y 33_640237-2B. En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-IL-33 se unen a IL-33 de ser humano, de primate, murina o de cualquier combinación de ser humano, de primate o murina. En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-IL-33 inhiben la producción de citocinas impulsada por IL-33.

En una realización, la presente divulgación proporciona una molécula de unión aislada, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente al mismo epítopo de IL-33 que los anticuerpos IL330065, IL330099, IL330101, IL330107, IL33149 o IL330180 y 33_640076-4B, 33_640081-AB; 33_640082-6B, 33_640082-7B, 33_640084-2B, 33_640086-6B, 33_640087-7B, 33_640201-2B y 33_640237-2B. En otra realización, la presente divulgación proporciona una molécula de unión aislada, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-33 y

que inhibe de manera competitiva a los anticuerpos IL330065, IL330099, IL330101, IL330107, IL33149 o IL330180 y 33_640076-4B, 33_640081-AB; 33_640082-6B, 33_640082-7B, 33_640084-2B, 33_640086-6B, 33_640087-7B, 33_640201-2B y 33_640237-2B frente a la unión específica a IL-33, por ejemplo, IL-33 de ser humano, de primate, murina o de cualquier combinación de ser humano, de primate o murina.

En determinadas realizaciones, la molécula de unión de la divulgación tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 75%, 80%, 85%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% o 95% de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos para la molécula de anticuerpo anti-IL-33 de referencia. En una realización adicional, la molécula de unión comparte al menos un 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia respecto del anticuerpo de referencia. En determinadas realizaciones, el anticuerpo de referencia es IL330065, IL330099, IL330101, IL330107, IL33149 o IL330180 y 33_640076-4B, 33_640081-AB; 33_640082-6B, 33_640082-7B, 33_640084-2B, 33_640086-6B, 33_640087-7B, 33_640201-2B y 33_640237-2B.

En otra realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (dominio VH), donde al menos una de las CDR del dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o idéntica a una región CDR1, CDR2 o CDR3 de las CDR de VH divulgadas anteriormente, en donde un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende el dominio VH codificado se une específica o preferencialmente

a IL-33. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe la producción de citocinas impulsada por IL-33.

En otra realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (dominio VH), donde al menos una de las CDR del dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o idéntica a las CDR de VH divulgadas anteriormente, en donde un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende el dominio VH codificado se une específica o preferencialmente a IL-33. En determinadas realizaciones, el anticuerpo aislado comprende además un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (dominio VL). En determinadas realizaciones, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe la producción de citocinas impulsada por IL-33.

En otra realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (dominio VH), donde al menos una de las CDR del dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos idéntica, excepto por 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácidos conservadoras, a las CDR de VH divulgadas anteriormente, en donde un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende el dominio VH codificado se une específica o preferencialmente a IL-33. En determinadas realizaciones, el anticuerpo aislado comprende además un

dominio VL. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe la producción de citocinas impulsada por IL-33.

En otra realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de VH de SEQ ID NO: 2, 12, 22, 32, 42 o 52, en donde un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende el dominio VH codificado se une específica o preferencialmente a IL-33. En determinadas realizaciones, el anticuerpo aislado comprende además un dominio VL. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe la producción de citocinas impulsada por IL-33.

En otra realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (dominio VL), donde al menos una de las CDR del dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o idéntica a una región CDR1, CDR2 o CDR3 de las secuencias de aminoácidos divulgadas anteriormente, en donde un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende el dominio VL codificado se une específica o preferencialmente a IL-33. En determinadas realizaciones, el anticuerpo aislado comprende además un dominio VH. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o el fragmento de

unión a antígeno del mismo inhibe la producción de citocinas impulsada por IL-33.

En otra realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (dominio VL), donde al menos una de las CDR del dominio VL tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o idéntica a las CDR de VL divulgadas anteriormente, en donde un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende el dominio VL codificado se une específica o preferencialmente a IL-33. En determinadas realizaciones, el anticuerpo aislado comprende además un dominio VH. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe la producción de citocinas impulsada por IL-33.

En otra realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (dominio VL), donde al menos una de las CDR del dominio VL tiene una secuencia de aminoácidos idéntica, excepto por 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácidos conservadoras, a las CDR de VL divulgadas anteriormente, en donde un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende el dominio VL codificado se une específica o preferencialmente a IL-33. En determinadas realizaciones, el anticuerpo aislado comprende además un dominio VH. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o

el fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe la producción de citocinas impulsada por IL-33.

En una realización adicional, la presente divulgación incluye un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de VL divulgada anteriormente, en donde un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende el dominio VL codificado se une específica o preferencialmente a IL-33. En determinadas realizaciones, el anticuerpo aislado comprende además un dominio VH. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe la producción de citocinas impulsada por IL-33.

Las variantes biológicamente activas adecuadas de los anticuerpos anti-IL-33 de la divulgación pueden usarse en los métodos de la presente divulgación. Dichas variantes conservarán las propiedades de unión deseadas del anticuerpo anti-IL-33 parental. Los métodos para producir variantes de anticuerpo se encuentran generalmente disponibles en la técnica.

Los métodos de mutagénesis y de alteración de secuencias de nucleótidos se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Walker y Gaastra, eds. (1983) Techniques in Molecular Biology (MacMillan Publishing Company, Nueva York); Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82*:488-492 (1985); Kunkel *et al.*, *Methods Enzymol. 154*:367-382 (1987); Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor, N.Y.); Patente de

los Estados Unidos N.° 4,873,192; y las referencias citadas en los mismos; incorporados al presente documento por referencia. Puede encontrarse orientación relativa a sustituciones de aminoácidos adecuadas que no afectan a la actividad biológica del polipéptido de interés en el modelo de Dayhoff *et al*. (1978) en Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), págs. 345-352, incorporado al presente documento por referencia en su totalidad. El modelo de Dayhoff *et al*. usa la matriz de similitud de aminoácidos Point Accepted Mutation (PAM) (matriz PAM 250) para determinar sustituciones de aminoácidos conservadoras adecuadas. Pueden preferirse sustituciones conservadoras, tales como el intercambio de un aminoácido por otro que tenga propiedades similares. Los ejemplos de sustituciones de aminoácidos conservadoras enseñadas por la matriz PAM 250 del modelo de Dayhoff *et al*. incluyen, pero sin limitación, Gly↔Ala, Val↔Ile↔Leu, Asp↔Glu, Lys↔Arg, Asn↔Gln y Phe↔Trp↔Tyr.

A la hora de construir variantes de una molécula de unión anti-IL-33, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se efectúan modificaciones del polipéptido de interés de tal forma que las variantes continúan teniendo las propiedades deseadas, por ejemplo, ser capaces de unirse específicamente a una IL-33 y en determinadas realizaciones, no bloquear la unión de IL-33 a ST2. Obviamente, cualquier mutación efectuada en el ADN que codifique el polipéptido variante no debe situar a la secuencia fuera de la fase de lectura y preferentemente, no creará regiones complementarias que pudieran producir una estructura secundaria de ARNm.

Los métodos para medir la especificidad de unión de una molécula de unión anti-IL-33, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, incluyen, pero sin limitación, ensayos de unión competitiva convencionales, ensayos ELISA, ensayos BIACORE, ensayos funcionales, tales como de proliferación o de liberación de factores y similares. Véase, por ejemplo, ensayos de este tipo descritos en el documento WO 93/14125; Shi *et al.*, *Immunity 13*:633-642 (2000); Kumanogoh *et al.*, *J Immunol 169*:1375-1381 (2002); Watanabe *et al.*, *J Immunol 167*:4321-4328 (2001); Wang *et al.*, *Blood 97*:3498-3504 (2001); and Giraudon *et al.*, *J Immunol 172*(2):1246-1255 (2004), todos los cuales se incorporan al presente documento por referencia.

Tal como se describe en el presente documento, en los casos donde cualquier polipéptido particular, incluyendo las regiones constantes, las CDR, los dominios VH o los dominios VH divulgados en el presente documento, sea al menos un 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o incluso un 100% idéntico a otro polipéptido, el % de identidad puede determinarse usando métodos y programas informáticos/software conocidos en la técnica, tales como, pero sin limitación, el programa BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53713). BESTFIT usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489, para obtener el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Cuando se usa BESTFIT o cualquier otro programa de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, un

95% idéntica a una secuencia de referencia de acuerdo con la presente divulgación, los parámetros se ajustan, evidentemente, de tal forma que el porcentaje de identidad se calcule a lo largo de la longitud completa de la secuencia del polipéptido de referencia y se permitan huecos en la homología de hasta el 5% del número total de aminoácidos en la secuencia de referencia.

Para los fines de la presente divulgación, el porcentaje de identidad de secuencia puede determinarse usando el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman usando una búsqueda de hueco afín con una penalización por apertura de hueco de 12 y una penalización por extensión de hueco de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman se explica en Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489. Por ejemplo, una variante puede diferir respecto de un anticuerpo anti-IL-33 de referencia (por ejemplo, IL330065, IL330099, IL330101, IL330107, IL33149 o IL330180) por tan pocos como de 1 a 30 restos de aminoácido, tan pocos como de 1 a 15 restos de aminoácido, tan pocos como de 1 a 10 restos de aminoácidos, tal como 6-10, tan pocos como 5, tan pocos como 4, 3, 2 o incluso 1 resto de aminoácido.

La estructura química precisa de un polipéptido capaz de unirse específicamente a IL-33 y de conservar la actividad deseada depende de una serie de factores. Al estar presentes grupos amino y carboxilo ionizables en la molécula, un polipéptido particular puede obtenerse en forma de una sal ácida o básica o en forma neutra. Todas estas preparaciones que conservan su actividad biológica cuando se colocan en condiciones ambientales adecuadas se incluyen en la definición de los anticuerpos anti-IL-33,

tal como se usa en el presente documento. Además, la secuencia primaria de aminoácidos del polipéptido puede aumentarse mediante derivatización usando restos de azúcar (glucosilación) o mediante otras moléculas complementarias, tales como lípidos, fosfato, grupos acetilo y similares. También puede aumentarse por conjugación con sacáridos. Determinados aspectos de dicho aumento se logra mediante sistemas de procesamiento postraduccional del hospedador productor; pueden introducirse otras modificaciones similares *in vitro*. En cualquier caso, dichas modificaciones se incluyen en la definición de un anticuerpo anti-IL-33 usado en el presente documento, en tanto que no se supriman las propiedades deseadas del anticuerpo anti-IL-33. Se espera que dichas modificaciones puedan afectar cuantitativa o cualitativamente a la actividad, ya sea potenciando o reduciendo la actividad del polipéptido en los diversos ensayos. Además, pueden modificarse restos de aminoácidos individuales en la cadena mediante oxidación, reducción u otra derivatización y el polipéptido puede escindirse para obtener fragmentos que conserven la actividad. Dichas alteraciones que no destruyen las propiedades deseadas (por ejemplo, especificidad de unión por IL-33, afinidad de unión y actividad asociada, por ejemplo, capacidad para inhibir la liberación por mastocitos y células endoteliales de citocinas y la proliferación de células TF-1, impulsadas por IL-33) no apartan a la secuencia de polipéptido de la definición de los anticuerpos anti-IL-33 de interés, tal como se usa en el presente documento.

La técnica proporciona una orientación sustancial relativa a la preparación y uso de variantes de

polipéptidos. Al preparar la molécula de unión anti-IL-33, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo o variantes, un experto en la materia puede determinar fácilmente qué modificaciones en la secuencia nativa de nucleótidos o aminoácidos de la proteína darán como resultado una variante que sea adecuada para su uso como componente terapéuticamente activo de una composición farmacéutica usada en los métodos de la presente divulgación.

Se sabe que las variantes de la región Fc (por ejemplo, sustituciones y/o adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos) pueden potenciar o reducir la función efectora de un anticuerpo y pueden alterar las propiedades farmacocinéticas (por ejemplo, la semivida) del anticuerpo. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N.° 6,737,056B1 y la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.° 2004/0132101A1, que divulgan mutaciones de Fc que optimizan la unión del anticuerpo a receptores de Fc.

En determinados anticuerpos anti-IL-33, la porción Fc puede mutarse para reducir la función efectora usando técnicas conocidas en la especialidad. Por ejemplo, la alteración de un dominio de región constante mediante, por ejemplo, mutaciones puntuales o sustituciones de aminoácidos puede reducir la unión al receptor de Fc del anticuerpo modificado en circulación, minimizando de este modo la eliminación mediada por célula efectoras o por complemento o el daño a las células que expresan o presentan la diana. Por ejemplo, un conjunto particular de sustituciones, la mutación triple L234F/L235E/P331S ("TM"), provoca una profunda reducción en la actividad de unión de

las moléculas de IgG1 humana a C1q, CD64, CD32A y CD16 humanos. *Véase, por ejemplo*, Oganesyan *et al.*, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 64*:700-704 (2008).

En otros casos, puede darse que las modificaciones de la región constante coherentes con la presente divulgación aumenten la semivida en suero. La semivida en suero de las proteínas que comprenden regiones Fc puede aumentarse aumentando la afinidad de unión de la región Fc por FcRn. La expresión "semivida del anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, significa una propiedad farmacocinética de un anticuerpo que es una medida del tiempo de supervivencia de moléculas de anticuerpo tras su administración. La semivida del anticuerpo se puede expresar como el tiempo requerido para eliminar el 50 por ciento de una cantidad conocida de inmunoglobulina del cuerpo de un paciente (u otro mamífero) o un compartimiento específico del mismo, por ejemplo tal como se mide en el suero, es decir, la semivida circulante, o en otros tejidos. La semivida puede variar de una inmunoglobulina o clase de inmunoglobulina a otra. En general, un aumento de la semivida del anticuerpo genera un aumento en el tiempo de permanencia medio en la circulación para el anticuerpo administrado.

Un aumento en la semivida permite reducir la cantidad de fármaco administrado a un paciente así como reducir la frecuencia de administración. Para aumentar la semivida en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítopo de unión a un receptor de reciclaje en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se conoce en la técnica. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "epítopo de unión a un receptor de reciclaje" se

refiere a un epítopo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) que es responsable de aumentar la semivida en suero de la molécula de IgG. También se pueden generar anticuerpos con semividas más prolongadas modificando restos de aminoácidos que se han identificado como participantes en la interacción entre Fc y el receptor FcRn. Por ejemplo, la introducción de la triple mutación M252Y/S254T/T256E ('YTE') en el dominio CH2 de moléculas de inmunoglobulina G (IgG) humana provoca un aumento en su unión al receptor de Fc neonatal (FcRn). *Véase* la Patente de los Estados Unidos N.º 7.083,784, cuyos contenidos se incorporan al presente documento por referencia en su totalidad.

Además, en algunas realizaciones, la región Fc comprende una modificación (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos, inserciones de aminoácidos, eliminaciones de aminoácidos) en una o más posiciones seleccionadas entre el grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 251, 252, 254, 255, 256, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 279, 280, 284, 292, 296, 297, 298, 299, 305, 313, 316, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 339, 341, 343, 370, 373, 378, 392, 416, 419, 421, 440 y 443 numeradas según el índice de EU expuesto en Kabat. Opcionalmente, la región Fc puede comprender un resto de aminoácido de origen no natural en posiciones adicionales o alternativas conocidas en la técnica.

En otras realizaciones, la región Fc comprende al menos una sustitución seleccionada entre el grupo que consiste en 234D, 234E, 234N, 234Q, 234T, 234H, 234Y, 234I, 234V, 234F, 235A, 235D, 235R, 235W, 235P, 235S, 235N, 235Q,

235T, 235H, 235Y, 235I, 235V, 235F, 236E, 239D, 239E, 239N, 239Q, 239F, 239T, 239H, 239Y, 240I, 240A, 240T, 240M, 241W, 241 L, 241Y, 241E, 241 R. 243W, 243L 243Y, 243R, 243Q, 244H, 245A, 247L, 247V, 247G, 251F, 252Y, 254T, 255L, 256E, 256M, 262I, 262A, 262T, 262E, 263I, 263A, 263T, 263M, 264L, 264I, 264W, 264T, 264R, 264F, 264M, 264Y, 264E, 265G, 265N, 265Q, 265Y, 265F, 265V, 265I, 265L, 265H, 265T, 266I, 266A, 266T, 266M, 267Q, 267L, 268E, 269H, 269Y, 269F, 269R, 270E, 280A, 284M, 292P, 292L, 296E, 296Q, 296D, 296N, 296S, 296T, 296L, 296I, 296H, 269G, 297S, 297D, 297E, 298H, 298I, 298T, 298F, 299I, 299L, 299A, 299S, 299V, 299H, 299F, 299E, 305I, 313F, 316D, 325Q, 325L, 325I, 325D, 325E, 325A, 325T, 325V, 325H, 327G, 327W, 327N, 327L, 328S, 328M, 328D, 328E, 328N, 328Q, 328F, 328I, 328V, 328T, 328H, 328A, 329F, 329H, 329Q, 330K, 330G, 330T, 330C, 330L, 330Y, 330V, 330I, 330F, 330R, 330H, 331G, 331A, 331L, 331M, 331F, 331W, 331K, 331Q, 331E, 331S, 331V, 331I, 331C, 331Y, 331H, 331R, 331N, 331D, 331T, 332D, 332S, 332W, 332F, 332E, 332N, 332Q, 332T, 332H, 332Y, 332A, 339T, 370E, 370N, 378D, 392T, 396L, 416G, 419H, 421K, 440Y y 434W numeradas según el índice de EU expuesto en Kabat. Opcionalmente, la región Fc puede comprender restos de aminoácidos adicionales y/o alternativos de origen no naturales conocidos en la técnica.

En realizaciones adicionales, la región Fc comprende al menos una modificación (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos, inserciones de aminoácidos, eliminaciones de aminoácidos) en una o más posiciones seleccionadas entre el grupo que consiste en 234, 235 y 331. En algunas realizaciones, los aminoácidos no naturales se seleccionan del grupo constituido por 234F, 235F, 235Y y 331S. En la presente se proporciona una variante de Fc, en la que la

región Fc comprende al menos un aminoácido no natural en una o más posiciones seleccionadas del grupo constituido por 239, 330 y 332. En algunas realizaciones, los aminoácidos de origen no natural se seleccionan entre el grupo que consiste en 239D, 330L y 332E.

En otras realizaciones, la región Fc comprende al menos un aminoácido de origen no natural en una o más posiciones seleccionadas entre el grupo que consiste en 252, 254 y 256. En determinadas realizaciones, los aminoácidos de origen no natural se seleccionan entre el grupo que consiste en 252Y, 254T y 256E, descritos en la Patente de los Estados Unidos N.° 7.083,784, cuyos contenidos se incorporan al presente documento por referencia en su totalidad.

Pueden usarse otras modificaciones más de la región constante para modificar enlaces disulfuro o restos de oligosacáridos que permiten una localización mejorada debido a una especificidad por el antígeno o una flexibilidad del anticuerpo mejorada. En perfil fisiológico, la biodisponibilidad y otros efectos bioquímicos resultantes de las modificaciones, tales como biodistribución y semivida en suero, pueden medirse y cuantificarse fácilmente usando técnicas inmunológicas bien conocidas sin experimentación innecesaria.

Los anticuerpos anti-IL-33 de la divulgación también incluyen derivados que se modifican, por ejemplo, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo, de tal forma que dicha unión covalente no impide la unión específica del anticuerpo a su epítopo afín. Por ejemplo, pero no en un sentido limitante, los derivados de anticuerpo incluyen anticuerpos que se han

modificado, por ejemplo, por glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Puede llevarse a cabo cualquiera de las numerosas modificaciones químicas mediante técnicas conocidas que incluyen, pero sin limitación, escisión química, acetilación, formilación, etc. específicas. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Una "sustitución de aminoácidos conservadora" es una en la que el resto de aminoácido se reemplaza por un resto de aminoácido que tenga una cadena lateral con una carga similar. Las familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con cargas similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Como alternativa, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de la totalidad o parte de la secuencia codificante, tal como por mutagénesis de saturación y puede explorarse la actividad biológica de los mutantes resultantes para identificar mutantes que conservan la

actividad (por ejemplo, la capacidad de unirse a un polipéptido anti-IL-33).

Por ejemplo, es posible introducir mutaciones únicamente en regiones marco conservadas o únicamente en regiones CDR de una molécula de anticuerpo. Las mutaciones introducidas pueden ser silentes o mutaciones neutras de sentido perdido, es decir, tienen un efecto nulo o escaso en la capacidad de un anticuerpo para unirse al antígeno. Estos tipos de mutaciones pueden ser útiles para optimizar el uso de codones o para mejorar la producción de anticuerpo de un hibridoma. Como alternativa, las mutaciones no neutras de sentido perdido pueden alterar la capacidad de un anticuerpo para unirse al antígeno. Es probable que la ubicación de la mayoría de mutaciones silentes y neutras de sentido perdido se encuentre en las regiones marco conservadas, mientras que es probable que la mayoría de las mutaciones no neutras de sentido perdido se encuentre en las CDR, aunque esto no es un requisito absoluto. Un experto en la materia sería capaz de diseñar y probar moléculas mutantes con propiedades deseadas, tales como no alteración en la actividad de unión a antígeno o alteración en la actividad de unión a antígeno (por ejemplo, mejoras en la actividad de unión a antígeno o cambio en la especificidad o una estabilidad/homogeneidad mejorada de la molécula final). Después de la mutagénesis, la proteína codificada puede expresarse rutinariamente y puede determinarse la actividad funcional y/o biológica de la proteína codificada (por ejemplo, la capacidad de unirse inmunoespecíficamente a al menos un epítopo de un polipéptido de IL-33) usando técnicas descritas en el

presente documento o modificando de manera rutinaria técnicas conocidas en la materia.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la divulgación pueden optimizarse modificando restos marco conservados ubicados en la región/zona de vernier o restos propuestos para soportar la estructura de las regiones CDR (véase, por ejemplo, Foote, J. y G. Winter, *J Mol.Biol. 224.2*: 487-99 (1992); Padlan, E. A., *Mol.Immunol 31.3*: 169-217 (1994)). En algunas realizaciones, estas modificaciones pueden construirse usando mutagénesis de sitio dirigido mediada por la PCR usando métodos de biología molecular convencionales. Los anticuerpos modificados pueden ensayarse respecto de su afinidad de unión, tal como se divulga en el presente documento. En otra realización, también puede efectuarse una optimización adicional, por ejemplo, retromutaciones o maduración por afinidad introduciendo sustituciones de aminoácidos en las regiones CDR o mediante mutagénesis de sitio dirigido.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-IL-33 de la divulgación comprenden al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) optimizada. Por "CDR optimizada" se entiende que la CDR se ha modificado y las secuencias optimizadas se han seleccionado basándose en la afinidad de unión mantenida o mejorada y/o la actividad anti-IL-33 que se confiere a un anticuerpo anti-IL-33 que comprende la CDR optimizada. La "actividad anti-IL-33" puede incluir, por ejemplo, una actividad que modula una o más de las siguientes actividades asociadas con la IL-33, por ejemplo, la liberación de citocinas por mastocitos, células endoteliales y la proliferación de células TF-1 impulsada por IL-33; la liberación de mediadores (por

ejemplo, citocinas o quimiocinas) por basófilos, eosinófilos, células Th2, NK, células NKT, macrófagos o células dendríticas; modulación de receptores de la superficie celular; modulación de la presentación de antígenos; o cualquier otra actividad asociada con la IL-33. La actividad anti-IL-33 también puede atribuirse a una reducción en la incidencia o la gravedad de enfermedades asociadas con la expresión y/o libración de IL-33 incluyendo, pero sin limitación, determinados tipos de afecciones inflamatorias, por ejemplo, un trastorno alérgico tal como asma u otra respuesta inflamatoria en las vías respiratorias de un sujeto. Las modificaciones pueden implicar el reemplazo de restos de aminoácidos dentro de la CDR, de tal forma que un anticuerpo anti-IL-33 conserve la especificidad por el antígeno de IL-33 y tenga una afinidad de unión mejorada y/o una actividad anti-IL-33 mejorada.

IV. Polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-IL-33

La presente divulgación también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos anti-IL-33 de la divulgación o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos.

En una realización, la presente divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente o consiste en un ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (dominio VH), donde al menos una de las CDR del dominio VH está codificada por una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o es idéntica a la secuencia de polinucleótido de las CDRH 1, 2 o 3 de una secuencia

codificante de VH seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 381, 391, 401, 411, 421, 431, 441, 451, 461, 471, 481, 491, 501, 511, 5421, 531, 541, 551, 561, 571, y 581. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe la producción de citocinas impulsada por IL-33.

En otras realizaciones, la presente divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un ácido nucleico que codifica un dominio VH de inmunoglobulina, donde la secuencia de al menos una de las CDR del dominio VH se selecciona entre el grupo que consiste en: (a) una secuencia de CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 93, 103, 113, 123, 133, 143, 153, 163, 173, 183, 193, 203, 213, 223, 233, 243, 253, 263, 273, 283, 293, 303, 313, 323, 333, 343, 353, 363, 373, 383, 393, 403, 413, 423, 433, 443, 453, 463, 473, 483, 493, 503, 513, 5423, 533, 543, 553, 563, 573 y 583; (b) una secuencia de CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44, 54, 64, 74, 84, 94, 104, 114, 124, 134, 144, 154, 164, 174, 184, 194, 204, 214, 224, 234, 244, 254, 264, 274, 284, 294, 304, 314, 324, 334, 344, 354, 364, 374, 384, 394, 404, 414, 424, 434, 444, 454, 464, 474, 484, 494, 504, 514, 5424, 534, 544, 554, 564, 574; y 584y (c) una secuencia de CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 105, 115, 125, 135, 145, 155, 165, 175,

185, 195, 205, 215, 225, 235, 245, 255, 265, 275, 285, 295, 305, 315, 325, 335, 345, 355, 365, 375, 385, 395, 405, 415, 425, 435, 445, 455, 465, 475, 485, 495, 505, 515, 5425, 535, 545, 555, 565, 575 y 585. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe la producción de citocinas impulsada por IL-33.

En una realización adicional, la presente divulgación incluye un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un ácido nucleico que codifica un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a una secuencia de polipéptido de dominio VH de referencia que comprende SEQ ID NO: 2, 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192, 202, 212, 222, 232, 242, 252, 262, 272, 282, 292, 302, 312, 322, 332, 342, 352, 362, 372, 382, 392, 402, 412, 422, 432, 442, 452, 462, 472, 482, 492, 502, 512, 5422, 532, 542, 552, 562, 572, y 582, en donde un anticuerpo anti-IL-33 que comprende el dominio VH codificado se une específica o preferencialmente a IL-33. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe la producción de citocinas impulsada por IL-33.

En una realización, la presente divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente o consiste en un ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (dominio VL), donde al menos una de las CDR del dominio VL está codificada por una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%,

97%, 98%, 99% o es idéntica a la secuencia de polinucleótido de las CDRL 1, 2 o 3 de una secuencia codificante de VL seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 386, 396, 406, 416, 426, 436, 446, 456, 466, 476, 486, 496, 506, 516, 5426, 536, 546, 556, 566, 576, y 586. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe la producción de citocinas impulsada por IL-33.

En otras realizaciones, la presente divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un ácido nucleico que codifica un dominio VL de inmunoglobulina, donde la secuencia de al menos una de las CDR del dominio VL se selecciona entre el grupo que consiste en: (a) una secuencia de CDRL1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8, 18, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 118, 128, 138, 148, 158, 168, 178, 188, 198, 208, 218, 228, 238, 248, 258, 268, 278, 288, 298, 308, 318, 328, 338, 348, 358, 368, 378, 388, 398, 408, 418, 428, 438, 448, 458, 468, 478, 488, 498, 508, 518, 5428, 538, 548, 558, 568, 578, y 588, (b) una secuencia de CDRL2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 9, 19, 29, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 119, 129, 139, 149, 159, 169, 179, 189, 199, 209, 219, 229, 239, 249, 259, 269, 279, 289, 299, 309, 319, 329, 339, 349, 359, 369, 379, 389, 399, 409, 419, 429, 439, 449, 459, 469, 479, 489, 499, 509, 519, 5429, 539, 549, 559, 569, 579, y 589y (c) una secuencia de CDRL3 que comprende la secuencia de

aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 5420, 530, 540, 550, 560, 570, 580 y 590. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe la producción de citocinas impulsada por IL-33.

En una realización adicional, la presente divulgación incluye un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un ácido nucleico que codifica un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a una secuencia de polipéptido de dominio VL de referencia que comprende SEQ ID NO: 7, 17, 27, 37, 47, 57, 67, 77, 87, 97, 107, 117, 127, 137, 147, 157, 167, 177, 187, 197, 207, 217, 227, 237, 247, 257, 267, 277, 287, 297, 307, 317, 327, 337, 347, 357, 367, 377, 387, 397, 407, 417, 427, 437, 447, 457, 467, 477, 487, 497, 507, 517, 5427, 537, 547, 557, 567, 577, y 587, en donde un anticuerpo anti-IL-33 que comprende el dominio VL codificado se une específica o preferencialmente a IL-33. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe la producción de citocinas impulsada por IL-33.

Cualquiera de los polinucleótidos descritos anteriormente puede incluir ácidos nucleicos adicionales que codifican, por ejemplo, un péptido de señal para dirigir la secreción del polipéptido codificado, las regiones constantes de anticuerpo como se describen en el

presente documento u otros polipéptidos heterólogos como se describen en el presente documento. Asimismo, tal como se describe con más detalle en otras partes del presente documento, la presente divulgación incluye composiciones que comprenden uno o más de los polinucleótidos descritos anteriormente.

En una realización, la divulgación incluye composiciones que comprenden un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido, en donde dicho primer polinucleótido codifica un dominio VH como se describe en el presente documento y en donde dicho segundo polinucleótido codifica un dominio VL como se describe en el presente documento. Específicamente, una composición que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un polinucleótido que codifica un dominio VH, tal como se expone en SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 381, 391, 401, 411, 421, 431, 441, 451, 461, 471, 481, 491, 501, 511, 5421, 531, 541, 551, 561, 571, o 581, y un polinucleótido que codifica un dominio VL, por ejemplo, un polinucleótido que codifica el dominio VL como se expone en SEQ ID NO: 66, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 386, 396, 406, 416, 426, 436, 446, 456, 466, 476, 486, 496, 506, 516, 5426, 536, 546, 556, 566, 576, o 586.

La presente divulgación también incluye fragmentos de los polinucleótidos de la divulgación, como se describe en otras partes. Además, la divulgación también contempla

polinucleótidos que codifican polipéptidos de fusión, fragmentos Fab y otros derivados, como se describe en el presente documento.

Los polinucleótidos pueden producirse o fabricarse mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, en caso de que sea conocida la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, puede ensamblarse un polinucleótido que codifica el anticuerpo a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (por ejemplo, como se describe en Kutmeier *et al.*, *Bio Techniques 17*:242 (1994)), que, de manera resumida, implica la síntesis de oligonucleótidos solapantes que contienen porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo, la hibridación y ligamiento de estos oligonucleótidos y después la amplificación de los oligonucleótidos ligados por la PCR.

Como alternativa, puede generarse un polinucleótido que codifica un anticuerpo anti-IL-33 o un fragmento de unión a antígeno, una variante o un derivado del mismo de la divulgación, a partir de ácidos nucleicos de una fuente adecuada. En caso de que no esté disponible un clon que contenga un ácido nucleico que codifique un anticuerpo particular, pero se conozca la secuencia de la molécula de anticuerpo, puede sintetizarse un ácido nucleico que codifique el anticuerpo u obtenerse de una fuente adecuada (por ejemplo, una biblioteca de ADNc de anticuerpos o una biblioteca de ADNc generada a partir de, o ácido nucleico, preferentemente poli A+ARN, aislado de, cualquier tejido o células que expresan el anticuerpo u otro anticuerpo anti-IL-33, tales como células de hibridoma seleccionadas para que expresen el anticuerpo) mediante amplificación por la PCR usando cebadores sintéticos que pueden hibridarse a los

extremos 3' y 5' de la secuencia o por clonación usando una sonda de oligonucleótido específica para la secuencia génica concreta que se va a identificar, por ejemplo, un clon de ADNc de una biblioteca de ADNc que codifica el anticuerpo u otro anticuerpo anti-IL-33. Entonces los ácidos nucleicos amplificados generados mediante PCR pueden clonarse en vectores de clonación que pueden replicarse usando cualquier método conocido en la técnica.

Una vez se haya determinado la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente del anticuerpo anti-IL-33 o el fragmento de unión a antígeno, la variante o el derivado del mismo, puede manipularse su secuencia de nucleótidos usando métodos de sobra conocidos en la técnica para la manipulación de secuencias de nucleótidos, por ejemplo,, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis de sitio dirigido, PCR, etc. (véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al. (1990) Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2ª ed.; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.) y Ausubel et al., eds. (1998) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, NY), que en ambos casos se incorporan por referencia en su totalidad) para generar anticuerpos que tengan una secuencia de aminoácidos diferente para, por ejemplo, crear sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de aminoácidos.

Un polinucleótido que codifica una molécula de unión anti-IL-33, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno, una variante o un derivado del mismo, puede estar compuesto de cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. Por ejemplo, un

polinucleótido que codifica un anticuerpo anti-IL-33 o un fragmento de unión a antígeno, una variante o un derivado del mismo puede estar compuesto de ADN mono y bicatenario, ADN que sea una mezcla de regiones mono y bicatenarias, ARN mono y bicatenario y ARN que sea una mezcla de regiones mono y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarias o más típicamente bicatenarias o una mezcla de regiones mono y bicatenarias. Además, un polinucleótido que codifica una molécula de unión anti-IL-33, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno, una variante o un derivado del mismo puede estar compuesto de regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Un polinucleótido que codifica una molécula de unión anti-IL-33, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno, una variante o un derivado del mismo, también puede contener una o más bases modificadas o armazones de ADN o ARN modificados por motivos de estabilidad o por otras razones. Las bases "modificadas" incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases infrecuentes, tales como inosina. Puede efectuarse una serie de modificaciones en el ADN y el ARN; por lo tanto, "polinucleótido" abarca formas modificadas química, enzimática o metabólicamente.

Un polinucleótido aislado que codifica una variante no natural de un polipéptido procedente de una inmunoglobulina (por ejemplo, una porción de cadena pesada o una porción de cadena ligera de inmunoglobulina) puede crearse introduciendo una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la inmunoglobulina, de tal forma que se introducen una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos

en la proteína codificada. Las mutaciones pueden introducirse mediante técnicas convencionales, tales como mutagénesis de sitio dirigido y mutagénesis mediada por la PCR. Preferentemente, se efectúan sustituciones de aminoácidos conservadoras en uno o más restos de aminoácido no esenciales.

V. Proteínas de fusión y conjugados de anticuerpo

Tal como se describe en más detalle en otras partes del presente documento, las moléculas de unión anti-IL-33, por ejemplo, los anticuerpos de la divulgación o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos, pueden además fusionarse recombinantemente a un polipéptido heterólogo en el extremo N- o C-terminal o conjugarse químicamente (incluyendo conjugaciones covalentes y no covalentes) a polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos anti-IL-33 pueden fusionarse o conjugarse recombinantemente a moléculas útiles como marcadores en ensayos de detección y a moléculas efectoras, tales como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionúclidos o toxinas. Véanse, por ejemplo, las Publicaciones PCT WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; la Patente de los Estados Unidos N.º 5,314,995; y el documento EP 396,387.

Los anticuerpos anti-IL-33 de la divulgación o los fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos pueden incluir derivados que se modifican, por ejemplo, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo, de tal forma que dicha unión covalente no impide la unión del anticuerpo a IL-33. Por ejemplo, pero no en un sentido limitante, los derivados de anticuerpo incluyen anticuerpos que se han modificado, por

ejemplo, por glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Puede llevarse a cabo cualquiera de las numerosas modificaciones químicas mediante técnicas conocidas que incluyen, pero sin limitación, escisión química, acetilación, formilación, etc. específicas. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Las moléculas de unión anti-IL-33, por ejemplo, los anticuerpos de la divulgación o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos, pueden estar compuestos de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isoésteres de péptidos y pueden contener aminoácidos distintos a los 20 aminoácidos codificados genéticamente. Por ejemplo, los anticuerpos anti-IL-33 pueden modificarse mediante procesos naturales, tales como procesamiento postraduccional o mediante técnicas de modificación química que son de sobra conocidas en la técnica. Dichas modificaciones están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una gran cantidad de referencias de investigación. Las modificaciones pueden producirse en cualquier parte de la molécula de unión anti-IL-33, incluyendo el armazón peptídico, las cadenas laterales de los aminoácidos y los extremos amino o carboxilo o en restos tales como carbohidratos. Se apreciará que puede estar presente el mismo tipo de modificación en el mismo o diversos grados en varios sitios en una molécula de unión anti-IL-33 dada. Asimismo, una molécula de unión anti-IL-33 puede contener muchos tipos de

modificaciones. Las moléculas de unión anti-IL-33 pueden estar ramificadas, por ejemplo, a consecuencia de la ubiquitinación y pueden ser cíclicas, con o sin ramificación. Las moléculas de unión anti-IL-33 cíclicas, ramificadas y cíclicas ramificadas pueden ser el resultado de procesos naturales después de la traducción o pueden producirse mediante métodos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o de un derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o de un derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glucosilación, formación de anclaje de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición mediada por ARN transferente de aminoácidos a proteínas, tal como arginilación y ubiquitinación. (Véase, por ejemplo, Proteins--Structure and Molecular Properties, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, NY; 2ª ed. (1993); Johnson, ed. (1983) Posttranslational Covalent Modification of Proteins (Academic Press, NY), págs. 1-12; Seifter *et al.*, *Meth. Enzymol. 182*:626-646 (1990); Rattan *et al.*, *Ann. NY Acad. Sci. 663*:48-62 (1992)).

La presente divulgación también proporciona proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo anti-IL-33 o un fragmento de unión a antígeno, una variante o un derivado

del mismo y un polipéptido heterólogo. El polipéptido heterólogo al cual se fusiona el anticuerpo puede ser útil para el funcionamiento o es útil para dirigirse a las células que expresan el polipéptido anti-IL-33.

En una realización, una proteína de fusión de la divulgación comprende, consiste esencialmente en o consiste en un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de uno cualquiera o más de los dominios VH de un anticuerpo de la divulgación o la secuencia de aminoácidos de uno cualquiera o más de lo dominios VL de un anticuerpo de la divulgación o fragmentos o variantes del mismo y una secuencia de polipéptido heterólogo.

En otra realización, una proteína de fusión para su uso en los métodos de diagnóstico y tratamiento divulgados en el presente documento comprende, consiste esencialmente en o consiste en un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de cualesquiera una, dos o tres de las CDR del dominio VH de un anticuerpo anti-IL-33 o fragmentos, variantes o derivados del mismo o la secuencia de aminoácidos de cualesquiera una, dos o tres de las CDR del dominio VL de un anticuerpo anti-IL-33 o fragmentos, variantes o derivados del mismo y una secuencia de polipéptido heterólogo.

En una realización, una proteína de fusión comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de al menos un dominio VH de un anticuerpo anti-IL-33 de la divulgación y la secuencia de aminoácidos de al menos un dominio VL de un anticuerpo anti-IL-33 de la divulgación o fragmentos, derivados o variantes de los mismos y una secuencia de polipéptido heterólogo. Preferentemente, los dominios VH y VL de la proteína de fusión corresponden a

una sola fuente de anticuerpo (o fragmento scFv o Fab) que se une específicamente a al menos un epítopo de IL-33.

En otra realización más, una proteína de fusión para su uso en los métodos de diagnóstico y tratamiento divulgados en el presente documento comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de cualesquiera una, dos, tres o más de las CDR del dominio VH de un anticuerpo anti-IL-33 y la secuencia de aminoácidos de cualesquiera uno, dos, tres o más de las CDR del dominio VL de un anticuerpo anti-IL-33 o fragmentos o variantes de los mismos y una secuencia de polipéptido heterólogo. Preferentemente, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más de las CDR del dominio VH o el dominio VL corresponden a una sola fuente de anticuerpo (o fragmento scFv o Fab) de la divulgación. Las moléculas de ácido nucleico que codifican estas proteínas de fusión también están abarcadas por la divulgación.

Las proteínas de fusión ilustrativas comunicadas en la bibliografía incluyen fusiones del receptor de células T (Gascoigne *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84*:2936-2940 (1987)); CD4 (Capon *et al.*, *Nature 337*:525-531 (1989); Traunecker *et al.*, *Nature 339*:68-70 (1989); Zettmeissl *et al.*, *DNA Cell Biol. USA 9*:347-353 (1990); and Byrn *et al.*, *Nature 344*:667-670(1990)); L-selectina (receptor homing) (Watson et al., *J. Cell. Biol. 130*:2221-2229 (1990); and Watson *et al.*, *Nature 349*:164-167 (1991)); CD44 (Aruffo *et al.*, *Cell 61*:1303-1313 (1990)); CD28 y B7 (Linsley *et al.*, *J. Exp. Med. 173*:721-730 (1991)); CTLA-4 (Lisley *et al.*, *J. Exp. Med. 174*:561-569 (1991)); CD22 (Stamenkovic *et al.*, *Cell 66*:1333-1344 (1991)); receptor de TNF (Ashkenazi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88*:10535-10539 (1991);

Lesslauer *et al., Eur. J. Immunol. 27*:2883-2886 (1991); y Peppel *et al., J. Exp. Med. 174*:1483-1489 (1991)); y receptor a de IgE (Ridgway y Gorman, J. Cell. Biol. Vol. 135, Resumen N.° 1448 (1991)).

Tal como se describe en otras partes del presente documento, las moléculas de unión anti-IL-33, por ejemplo, los anticuerpos de la divulgación o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos, pueden fusionarse a polipéptidos heterólogos para aumentar la semivida *in vivo* de los polipéptidos o para su uso en inmunoensayos que usan métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización, puede conjugarse PEG a los anticuerpos anti-IL-33 de la divulgación para aumentar su semivida *in vivo*. Véase Leong *et al., Cytokine 16*:106 (2001); Adv. in Drug Deliv. Rev. 54:531 (2002); o Weir *et al., Biochem. Soc. Transactions 30*:512 (2002).

Además, las moléculas de unión anti-IL-33, por ejemplo, los anticuerpos de la divulgación o los fragmentos de unión a antígeno, las variantes o los derivados de los mismos pueden fusionarse a secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar su purificación o detección. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexahistidina, tal como el marcador proporcionado en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif. 91313) entre otros, muchos de los cuales se encuentran disponibles comercialmente. Tal como se describe en Gentz *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86*:821-824 (1989), por ejemplo, la hexahistidina permite una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otros marcadores peptídicos útiles para la purificación incluyen, pero sin limitación, el marcador

"HA", que corresponde a un epítopo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson *et al.*, *Cell 37*:767 (1984)) y el marcador "flag".

Pueden prepararse proteínas de fusión usando métodos que se conocen bien en la técnica (véanse, por ejemplo, las Patentes de lo Estados Unidos N.° 5,136,964 y 5,225,538). El sitio preciso en el que se efectúa la fusión puede seleccionarse empíricamente para optimizar la secreción o las características de unión de la proteína de fusión. Después, se transfecta con el ADN que codifica la proteína de fusión a una célula hospedadora para su expresión.

Las moléculas de unión anti-IL-33, por ejemplo, los anticuerpos de la presente divulgación o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos, pueden usarse en forma no conjugada o pueden conjugarse a al menos una de una serie de moléculas, por ejemplo, para mejorar las propiedades terapéuticas de la molécula, para facilitar la detección de la diana o para obtener imágenes o para tratar al paciente. Las moléculas de unión anti-IL-33, por ejemplo, los anticuerpos de la divulgación o los fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos, pueden marcarse o conjugarse ya sea antes o después de la purificación o cuando se efectúa la purificación.

Concretamente, los anticuerpos anti-IL-33 de la divulgación o los fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos, pueden conjugarse a agentes terapéuticos, profármacos, péptidos, proteínas, enzimas, virus, lípidos, modificadores de la respuesta biológica, agentes farmacéuticos o PEG.

Los expertos en la materia apreciarán que también pueden ensamblarse conjugados usando una diversidad de técnicas dependiendo del agente seleccionado que se vaya a conjugar. Por ejemplo, se preparan conjugados con biotina, por ejemplo, haciendo reaccionar un polipéptido de unión con un éster activado de biotina, tal como el éster de N-hidroxisuccinimida de biotina. De manera similar, pueden prepararse conjugados con un marcador fluorescente en presencia de un agente de acoplamiento, por ejemplo, aquellos listados en el presente documento o por reacción con un isotiocianato, preferentemente, isotiocianato de fluoresceína. Los conjugados de los anticuerpos anti-IL-33 de la divulgación o los fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos, se preparan de un modo análogo.

La presente divulgación abarca además moléculas de unión anti-IL-33, por ejemplo, anticuerpos de la divulgación o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos, conjugados a un agente de diagnóstico o terapéutico. Los anticuerpos anti-IL-33, incluyendo fragmentos de unión a antígeno, variantes y derivados de los mismos, pueden usarse con fines diagnósticos para, por ejemplo, controlar el desarrollo o la progresión de una enfermedad, como parte de un procedimiento de pruebas clínicas para, por ejemplo, determinar la eficacia de un tratamiento y/o régimen preventivo dado. Por ejemplo, puede facilitarse la detección acoplando el anticuerpo anti-IL-33 o un fragmento de unión a antígeno, una variante o un derivado del mismo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostético,

materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales emisores de positrones usando diversas tomografías de emisión de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N.º 4,741,900 para iones metálicos que pueden conjugarse a anticuerpos para su uso como agentes diagnósticos, de acuerdo con la presente divulgación. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa del rábano picante, fosfatasa alcalina, β-galactosidasa o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptadivina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina-fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y los ejemplos de material radiactivo adecuados incluyen ^{125}I, ^{131}I, ^{131}In, ^{90}Y o ^{99}Tc.

Una molécula de unión anti-IL-33, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno, una variante o un derivado del mismo también puede marcarse de manera detectable acoplándolo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia de la molécula de unión anti-IL-33 marcada quimioluminiscentemente se determina posteriormente detectando la presencia de la luminiscencia que surge durante el transcurso de una reacción química. Los ejemplos de compuestos de marcaje quimioluminiscente particularmente

útiles son luminol, isoluminol, éster teromático de acridinio, imidazol, sal acridinio y éster de oxalato.

Una de las formas mediante las que puede marcarse un anticuerpo anti-IL-33 o un fragmento de unión a antígeno, una variante o un derivado del mismo, es uniéndolo a una enzima y usando el producto enlazado en un inmunoensayo enzimático (EIA) (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md.; Diagnostic Horizons 2:1-7 (1978); Voller *et al*., *J. Clin. Pathol. 31*:507-520 (1978); Butler, *Meth. Enzymol. 73*:482-523 (1981); Maggio, ed. (1980) Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, Fla.; Ishikawa et al., eds. (1981) Enzyme Immunoassay (Kgaku Shoin, Tokio). La enzima que está unida al anticuerpo anti-IL-33 reaccionará con un sustrato adecuado, preferentemente un sustrato cromogénico, de tal forma que producirá un resto químico que puede detectarse, por ejemplo, por medios espectrofotométricos, fluorimétricos o visuales. Las enzimas que pueden usarse para marcar detectablemente el anticuerpo incluyen, pero sin limitación, malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-5-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levadura, alfa-glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa. Además, la detección puede llevarse a cabo por métodos colorimétricos que emplean un sustrato cromogénico para la enzima. Además, la detección pude llevarse a cabo por métodos fluorescentes, mediante los

cuales se unen directa o indirectamente metales emisores de fluorescencia, tales como ^{152}Eu u otros de la serie de los lantánidos al anticuerpo anti-IL-33. La detección también puede llevarse a cabo comparando visualmente el alcance de la reacción enzimática de un sustrato en comparación con patrones preparados de una manera similar.

La detección también puede llevarse a cabo usando cualquiera de una serie de inmunoensayos diferentes. Por ejemplo, mediante el marcaje radiactivo de la molécula de unión anti-IL-33, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno, una variante o un derivado del mismo, es posible detectar la molécula de unión mediante el uso de un radioinmunoensayo (véase, por ejemplo, Weintraub (Marzo, 1986) Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques (The Endocrine Society), que se incorpora al presente documento por referencia). El isótopo radiactivo puede detectare por medios que incluyen, pero sin limitación, un contador gamma, un contador de centelleo o autorradiografía.

Una molécula de unión anti-IL-33, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno, una variante o un derivado del mismo, también puede marcarse de manera detectable usando metales emisores de fluorescencia, tales como ^{152}Eu u otros de la serie de los lantánidos. Estos metales pueden unirse a la molécula de unión usando grupos quelantes de metales, tales como ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Las técnicas para conjugar diversos restos a un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-33) o un fragmento de unión a antígeno, una variante o un derivado

del mismo son de sobra conocidos; véase, por ejemplo, Amon et al. (1985) "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy," en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, ed. Reisfeld et al. (Alan R. Liss, Inc.), págs. 243-56; Hellstrom et al. (1987) "Antibodies for Drug Delivery," in Controlled Drug Delivery, ed. Robinson et al. (2ª ed.; Marcel Dekker, Inc.), págs. 623-53); Thorpe (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review," en Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, ed. Pinchera et al., págs. 475-506; "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy," en Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, ed. Baldwin et al., Academic Press, págs. 303-16 (1985); y Thorpe et al. (1982) "The Preparation and Cytotoxic Properties of Antibody-Toxin Conjugates," Immunol. Rev. 62:139-58.

VI. Expresión de polipéptidos de anticuerpo

Las secuencias que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo pueden producirse, ya sea de manera simultánea o por separado, usando retrotranscriptasa y ADN polimerasa según métodos de sobra conocidos. La PCR puede iniciarse por cebadores de región constante consenso o por cebadores más específicos, basándose en las secuencias de ADN y de aminoácidos de cadena ligera y pesada. Tal como se ha descrito anteriormente, la PCR puede usarse también para aislar clones de ADN que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo. En este caso, pueden explorarse las bibliotecas mediante cebadores consenso o sondas homólogas más grandes, tales como sondas de región constante de ratón.

El ADN, típicamente ADN de plásmido, puede aislarse de las células usando técnica conocidas en la materia, mapearse para restricción y secuenciarse de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas expuestas en detalle, por ejemplo, en las referencias anteriores relativas a técnicas de ADN recombinante. Obviamente, el ADN puede ser sintético de acuerdo con la presente divulgación en cualquier instante durante el proceso de aislamiento o su análisis posterior.

Después de la manipulación del material genético aislado para proporcionar anticuerpos anti-IL-33 o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la divulgación, los polinucleótidos que codifican los anticuerpos anti-IL-33 se insertan típicamente en un vector de expresión para su introducción en células hospedadoras que pueden usarse para producir la cantidad deseada de anticuerpo anti-IL-33.

La expresión recombinante de un anticuerpo o un fragmento, derivado o análogo del mismo, por ejemplo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo que se une a una molécula diana descrita en el presente documento, por ejemplo, IL-33, requiere de la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el anticuerpo. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo o una cadena pesada o ligera de un anticuerpo o una porción del mismo (que contiene preferentemente el domino variable de cadena pesada o ligera) de la divulgación, puede producirse el vector para la producción de la molécula de anticuerpo mediante tecnología de ADN recombinante usando técnicas de sobra conocidas en la materia. Por lo tanto, en el presente

documento se describen métodos para preparar una proteína expresando un polinucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo. Pueden usarse métodos de sobra conocido por los expertos en la materia para construir vectores de expresión que contienen secuencias codificantes de anticuerpos y señales de control transcripcional y traduccional adecuadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Por lo tanto, la divulgación proporciona vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpos de la divulgación o una cadena pesada o ligera del mismo o un dominio variable de cadena pesada o ligera, unido operablemente a un promotor. Dichos vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véase, por ejemplo, la Publicación PCT WO 86/05807; la Publicación PCT WO 89/01036; y la Patente de los Estados Unidos N.° 5,122,464) y puede clonarse el dominio variable del anticuerpo en dicho vector para la expresión de la cadena pesada o ligera completa.

El término "vector" o "vector de expresión" se emplea en el presente documento para referirse a vectores usados de acuerdo con la presente divulgación como vehículo para introducir y expresar un gen deseado en una célula hospedadora. Como sabrán los expertos en la materia, dichos vectores pueden seleccionarse fácilmente entre el grupo que consiste en plásmidos, fagos, virus y retrovirus. En general, los vectores compatibles con la presente divulgación comprenderán un marcador de selección, sitios de restricción adecuados para facilitar la clonación del

gen deseado y la capacidad de entrar y/o replicarse en células eucariotas o procariotas.

Para los fines de la presente divulgación, pueden emplearse diversos sistemas de vector de expresión. Por ejemplo, una clase de vector utiliza elementos de ADN que proceden de virus de animales, tales como el virus del papiloma bovino, el virus del polioma, adenovirus, virus vaccinia, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV o MOMLV) o el virus SV40. Otros implican el uso de sistemas policistrónicos con sitios internos de unión a ribosoma. Además, las células que han integrado el ADN en sus cromosomas pueden seleccionarse introduciendo uno o más marcadores que permiten la selección de células hospedadoras transfectadas. El marcador puede proporcionar prototrofia a un hospedador auxótrofo, resistencia a los biocidas (por ejemplo, antibióticos) o resistencia a metales pesados, tales como el cobre. El gen marcador de selección puede unirse directamente a las secuencias de ADN que se van a expresar o introducirse en la misma célula mediante cotransformación. También pueden necesitarse elementos adicionales para una síntesis óptima del ARNm. Estos elementos pueden incluir secuencias de señal, señales de corte y empalme así como promotores transcripcionales, potenciadores y señales de terminación.

En realizaciones particularmente preferidas, los genes clonados de la región variable se insertan en un vector de expresión junto con los genes de la región constante de cadena pesada y ligera (preferentemente humana) sintetizados del modo descrito anteriormente. Obviamente, puede emplearse en la presente divulgación cualquier vector de expresión que sea capaz de provocar expresión en células

eucariotas. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen, pero sin limitación, los plásmidos pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF 1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, and pZeoSV2 (disponibles de Invitrogen, San Diego, Calif.) y el plásmido pCI (disponible de Promega, Madison, Wis.). En general, la exploración de grandes números de células transformadas respecto de aquellas que expresan de manera adecuada altos niveles de cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina es un procedimiento experimental rutinario que puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante sistemas robóticos.

De manera más general, una vez que se ha preparado elector o la secuencia de ADN que codifica una subunidad monomérica del anticuerpo anti-IL-33, puede introducirse el vector de expresión en una célula hospedadora adecuada. La introducción del plásmido en la célula hospedadora puede lograrse mediante diversas técnicas conocidas para los expertos en la materia. Estas incluyen, pero sin limitación, transfección (incluyendo electroforesis y electroporación), fusión de protoplastos, precipitación por fosfato de calcio, fusión celular con ADN envuelto, microinyección e infección con virus intacto. Véase, Ridgway (1988) "Mammalian Expression Vectors" in Vectors, ed. Rodriguez y Denhardt (Butterworths, Boston, Mass.), Capítulo 24.2, págs. 470-472. Típicamente, la introducción del plásmido en el hospedador es mediante electroporación. Las células hospedadoras que portan la construcción de expresión se cultivan en condiciones adecuadas para la producción de cadenas ligeras y de cadenas pesadas y se ensayan respecto de la síntesis de la proteína de cadena pesada y/o ligera. Las técnicas de ensayo ilustrativas

incluyen ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) o análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), inmunohistoquímica y similares.

El vector de expresión se transfiere a una célula hospedadora mediante técnicas convencionales y después se cultivan las células transfectadas mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo para su uso en los métodos descritos en el presente documento. Por lo tanto, la divulgación incluye células hospedadoras que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la divulgación o una cadena pesada o ligera del mismo, unido operablemente a un promotor heterólogo. En realizaciones preferidas para la expresión de anticuerpos bicatenarios, pueden expresarse conjuntamente vectores que codifican las cadenas tanto ligeras como pesadas en la célula hospedadora para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa, tal como se detalla más adelante.

Tal como se usa en el presente documento, "célula hospedadora" se refiere a células que portan vectores construidos usando técnicas de ADN recombinante y que codifican al menos un gen heterólogo. En las descripciones de los procesos para el aislamiento de anticuerpos a partir de hospedadores recombinantes, los términos "célula" y "cultivo celular" se usan de manera indistinta para indicar la fuente del anticuerpo, a menos que se especifique claramente lo contrario. En otras palabras, la recuperación del polipéptido de las "células" puede significar el resultado de centrifugar células completas o del cultivo celular que contiene tanto el medio como las células suspendidas.

Pueden utilizarse una serie de sistemas de hospedador-vector de expresión para expresar moléculas de anticuerpo para su uso en los métodos descritos en el presente documento. Dichos sistemas de hospedador-vector de expresión representan vehículos mediante los cuales pueden producirse y posteriormente purificarse las secuencias de interés, pero también representan células que, cuando se transforman o cotransfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos adecuadas, pueden expresar una molécula de anticuerpo de la divulgación *in situ*. Estos incluyen, pero sin limitación, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformados con vectores de expresión de ADN de bacteriófago, ADN de plásmido o ADN de cósmido recombinante que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas con vectores de expresión de levaduras que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BLK, 293, 3T3) que portan construcciones de expresión recombinantes obtenidas del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el

promotor tardío de adenovirus; el promotor de 7.5K del virus vaccinia). Preferentemente, se usan células bacterianas, tales como *Escherichia coli* y más preferentemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de moléculas de anticuerpo recombinantes completas, para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, las células de mamífero, tales como las células de ovario de hámster chino (CHO), conjuntamente con un vector tal como el elemento promotor del gen temprano intermedio principal del citomegalovirus humano, es un sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foecking *et al.*, *Gene 45*:101 (1986); Cockett *et al.*, *Bio/Technology 8*:2 (1990)).

La línea celular hospedadora usada para la expresión de proteínas es normalmente de origen de mamífero; los expertos en la materia están capacitados para determinar preferencialmente líneas de células hospedadoras concretas que son ideales para expresar en las mismas el producto génico deseado. Las líneas de células hospedadoras ejemplares incluyen, pero sin limitación, CHO (ovario de hámster chino), DG44 y DUXB13 (líneas de ovario de hámster chino, negativas a DHFR), HeLa (carcinoma de cuello de útero humano), CVI (línea de riñón de mono), COS (un derivado de CVI con antígeno T de SV40), VERY, BHK (riñón de cría de hámster), MDCK, 293, WI38, R1610 (fibroblasto de hámster chino), BALBC/3T3 (fibroblasto de ratón), HAK (línea de riñón de hámster), SP2/O (mieloma de ratón), P3X63-Ag3.653 (mieloma de ratón), BFA-1c1BPT (células endoteliales bovinas), RAJI (linfocito humano) y 293 (riñón humano). Las líneas de células hospedadoras se encuentran normalmente disponibles de los servicios comerciales de la

Colección Americana de Cultivos Tipo o de la bibliografía publicada.

Además, puede seleccionarse una cepa de célula hospedadora que module la expresión de las secuencias insertadas o que modifique y procese el producto génico del modo específico deseado. Dichas modificaciones (por ejemplo, glucosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos proteínicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Las diferentes células hospedadoras tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y la modificación postraduccional de proteínas y productos génicos. Las líneas celulares o los sistemas hospedadores adecuados pueden seleccionarse para asegurar la correcta modificación y procesamiento de la proteína exógena expresada. Para este fin, pueden usarse células hospedadoras eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento del transcrito primario, la glucosilación y la fosforilación adecuados del producto génico.

Para la producción a largo plazo de alto rendimiento de proteínas recombinantes, se prefiere una expresión estable. Por ejemplo, pueden modificarse por ingeniería genética líneas celulares que expresan de manera estable la molécula de anticuerpo. En lugar de usar vectores de expresión que contiene orígenes de replicación víricos, las células hospedadoras pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de la expresión adecuados (por ejemplo, secuencias promotoras y potenciadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador de selección. Después de la introducción del ADN exógeno, las células modificadas

por ingeniería genética pueden dejarse crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido y después cambiarse a un medio de selección. El marcador de selección en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de manera estable el plásmido en sus cromosomas y que crezcan formando focos que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método puede emplearse ventajosamente para crear líneas celulares que expresan de manera estable la molécula de anticuerpo.

Puede usarse una serie de sistemas de selección que incluyen, pero sin limitación, los genes para timidina cinasa del herpes simple (Wigler *et al.*, *Cell 13*:223 (1977)), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48*:202 (1992)), y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy *et al.*, *Cell 22*:817 (1980)) que pueden emplearse en células tk-, hgprt- o aprt-, respectivamente. Asimismo, puede usarse la resistencia a antimetabolitos como base para la selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler *et al.*, *Natl. Acad. Sci. USA* 77:357 (1980); O'Hare *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78*:1527 (1981)); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78*:2072 (1981)); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418, Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu y Wu, *Biotherapy 3*:87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32*:573-596 (1993); Mulligan, *Science 260*:926-932 (1993); y Morgan y Anderson, *Ann. Rev. Biochem. 62*:191-217 (1993); TIB TECH 13(5):155-215 (mayo, 1993); e hygro, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre

et al., *Gene 30*:147 (1984). Los métodos conocidos comúnmente en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que pueden usarse se describen en Ausubel et al. (1993) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, NY); Kriegler (1990) "Gene Transfer and Expression" in A Laboratory Manual (Stockton Press, NY); Dracopoli et al. (eds) (1994) Current Protocols in Human Genetics (John Wiley & Sons, NY) Capítulos 12 y 13; Colberre-Garapin et al. (1981) J. Mol. Biol. 150:1, que se incorporan al presente documento por referencia en su totalidad.

Pueden aumentarse los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo mediante la amplificación del vector (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel (1987) "The Use of Vectors Based on Gene Amplification for the Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells in DNA Cloning" (Academic Press, NY) Vol. 3. Cuando un marcador en el sistema de vector que expresa el anticuerpo es amplificable, un aumento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula hospedadora aumentará el número de copias del gen marcador. Ya que la región amplificada se asocia con el gen de anticuerpo, la producción del anticuerpo también aumentará (Crouse *et al.*, *Mol. Cell. Biol. 3*:257 (1983)).

La producción *in vitro* permite aumentar la escala para dar grandes cantidades de los polipéptidos deseados. Las técnicas para el cultivo de células de mamífero en condiciones de cultivo tisular se conocen en la técnica e incluyen cultivo homogéneo en suspensión, por ejemplo, en un reactor de tipo airlift o en un reactor con agitador continuo o cultivo celular inmovilizado o atrapado, por

ejemplo, en fibras huecas, microcápsulas, sobre microperlas de agarosa o cartuchos cerámicos. En caso de que sea necesario y/o deseado, las soluciones de polipéptidos pueden purificarse mediante los métodos de cromatografía convencionales, por ejemplo, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía sobre DEAE-celulosa o cromatografía de (inmuno-)afinidad, por ejemplo, después de la biosíntesis preferencial de un polipéptido de región bisagra sintético o antes o después de la etapa de cromatografía HIC descrita en el presente documento.

Los genes que codifican anticuerpos anti-IL-33 o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la divulgación también pueden expresarse en células no de mamífero, tales como células de insecto, bacterianas o de levadura o células vegetales. Las bacterias que captan fácilmente ácidos nucleicos incluyen miembros de las enterobacterias, tales como cepas de *Escherichia coli* o *Salmonella*; *Bacillaceae*, tales como *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* y *Haemophilus influenzae*. Además, se apreciará que, cuando se expresan en bacterias, los polipéptidos heterólogos forman parte típicamente de cuerpos de inclusión. Los polipéptidos heterólogos tienen que aislarse, purificarse y después ensamblarse en moléculas funcionales. En los casos donde se deseen formas tetravalentes de los anticuerpos, las subunidades se autoensamblarán en anticuerpos tetravalentes (documento WO 02/096948A2).

En sistemas bacterianos, puede seleccionarse ventajosamente una serie de vectores de expresión dependiendo del uso previsto para la molécula de anticuerpo

que se esté expresando. Por ejemplo, cuando se vaya a producir una gran cantidad de dicha proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos de proteína de fusión que se purifiquen fácilmente. Dichos vectores incluyen, pero sin limitación, el vector de expresión en *E. coli* pUR278 (Ruther *et al.*, *EMBO J. 2*:1791 (1983)), en el que la secuencia codificante de anticuerpo pude ligarse individualmente en el vector en fase con la región codificante lacZ de tal forma que se produce una proteína de fusión; los vectores pIN (Inouye e Inouye, *Nucleic Acids Res. 13*:3101-3109 (1985); Van Heeke y Schuster, *J. Biol. Chem. 24*:5503-5509 (1989)); y similares. También pueden usare lo vectores pGEX para expresar polipéptidos exógenos en forma de proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas mediante adsorción y unión a una matriz de perlas de glutatión-agarosa seguido de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir sitios de escisión de proteasa de trombina o de factor Xa, de tal forma que el producto génico diana clonado puede librarse del resto GST.

Además de procariotas, también pueden usarse microbios eucariotas. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura común de panadero, es el microorganismo eucariota más comúnmente usado, aunque se encuentran normalmente disponibles una serie de cepas diferentes, por ejemplo, *Pichia pastoris*.

Para la expresión en *Saccharomyces*, se usa comúnmente, por ejemplo, el plásmido YRp7 (Stinchcomb *et al.*, *Nature*

282:39 (1979); Kingsman *et al.*, *Gene* 7:141 (1979); Tschemper *et al.*, *Gene 10*:157 (1980)). Este plásmido ya contiene el gen TRP1, que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, en N.° de la ATCC 44076 o PEP4-1 (Jones, *Genetics 85*:12 (1977)). Por lo tanto, la presencia de la lesión de trp1 como característica del genoma de la célula hospedadora de levadura proporciona un ambiente eficaz para la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano.

En un sistema de insecto, se usa típicamente el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresa genes exógenos. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante del anticuerpo puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de la poliedrina) del virus y colocarse bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de poliedrina).

Una vez que se ha expresado recombinantemente una molécula de unión de la divulgación, esta puede purificarse mediante cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, en particular por afinidad el antígeno específico por la proteína A y cromatografía en columna de exclusión por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o mediante cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. Como alternativa, un método preferido para aumentar la afinidad de los anticuerpos de la divulgación se divulga en la

Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.° 2002 0123057 A1.

VII. Métodos de tratamiento usando anticuerpos terapéuticos anti-IL-33

Los métodos de la divulgación se refieren al uso de moléculas de unión anti-IL-33, por ejemplo, anticuerpos, incluyendo fragmentos de unión a antígeno, variantes y derivados de los mismos para tratar a pacientes que tengan una enfermedad asociada con la expresión de IL-33 o con células que expresen IL-33. Por "célula que expresa IL-33" se entiende células que expresan el antígeno de IL-33. Se conocen e la técnica métodos para detectar la expresión de IL-33 en células e incluyen, pero sin limitación, técnicas PCR, inmunohistoquímica, citometría de flujo, transferencia de Western, ELISA y similares.

Aunque la siguiente descripción se refiere a métodos diagnósticos y al tratamiento de diversas enfermedades y trastornos con un anticuerpo anti-IL-33 de la divulgación, los métodos descritos en el presente documento también pueden aplicarse a los fragmentos de unión a antígeno, las variantes y los derivados de estos anticuerpos anti-IL-33 que conservan las propiedades deseadas de los anticuerpos anti-IL-33 de la divulgación por ejemplo, la capacidad de unirse específicamente a IL-33 y de neutralizar la actividad patógena de IL-33.

En una realización, el tratamiento incluye la aplicación o administración de una molécula de unión anti-IL-33, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente divulgación a un sujeto o paciente o la aplicación o administración de la molécula de

unión anti-IL-33 a un tejido o línea celular aislada de un sujeto o paciente, donde el sujeto o paciente tiene una enfermedad, un síntoma de un enfermedad o una predisposición hacia una enfermedad. En otra realización, se prevé que el tratamiento también incluya la aplicación o administración de una composición farmacéutica que comprenda la molécula de unión anti-IL-33, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente divulgación a un sujeto o paciente o la aplicación o administración de una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión anti-IL-33 a un tejido o línea celular aislada de un sujeto o paciente que tiene una enfermedad, un síntoma de una enfermedad o una predisposición hacia una enfermedad.

Las moléculas de unión anti-IL-33, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno del mismo de la presente divulgación son útiles para el tratamiento de diversas afecciones inflamatorias. Por "actividad antinflamatoria" se entiende una reducción en la tasa de respuesta inflamatoria en una célula que expresa IL-33 y por lo tanto, una reducción en la inflamación en un tejido que surge durante la terapia. Por ejemplo, la terapia con al menos un anticuerpo anti-IL-33 provoca una respuesta fisiológica, por ejemplo, una reducción en la respuesta inflamatoria que es beneficiosa respecto del tratamiento de patologías asociadas con células que expresan IL-33 en un ser humano.

En una realización, la divulgación se refiere a moléculas de unión anti-IL-33, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, de acuerdo con la presente divulgación, para su uso como medicamento,

en particular, para su uso en el tratamiento o la profilaxis de una respuesta inflamatoria o para su uso en el tratamiento de una afección inflamatoria, por ejemplo, asma o EPOC. En determinadas realizaciones, una molécula de unión anti-IL-33, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo de la divulgación se usa para el tratamiento de un trastorno alérgico. En determinadas realizaciones, una molécula de unión anti-IL-33, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo de la divulgación se usa para el tratamiento de una respuesta inflamatoria en las vías respiratorias de un sujeto o paciente.

De acuerdo con los métodos de la presente divulgación, se usa al menos una molécula de unión anti-IL-33, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como se define en otras partes del presente documento, para promover una respuesta terapéutica positiva respecto de una respuesta inflamatoria. Por "respuesta terapéutica positiva" respecto del tratamiento de la inflamación se entiende una mejora en la enfermedad asociada con la actividad antinflamatoria de estas moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de los mismos y/o una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad. Es decir, puede observarse un efecto antinflamatorio, la prevención de más inflamación y/o una reducción en una inflamación existente y/o una reducción en uno o más síntomas asociados con la enfermedad. Por lo tanto, por ejemplo, puede caracterizarse una mejora en la enfermedad como una respuesta completa. Por "respuesta completa" se entiende una ausencia de enfermedad clínica detectable, con normalización de los resultados de

cualquier prueba anterior. Dicha respuesta debe persistir durante al menos un mes después del tratamiento de acuerdo con los métodos de la divulgación. Como alternativa, una mejora en la enfermedad puede clasificarse como que es una respuesta parcial.

Las moléculas de unión anti-IL-33, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos también pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades y deficiencias o trastornos inflamatorios del sistema inmunitario que se asocian con células que expresan IL-33. Las enfermedades inflamatorias se caracterizan por inflamación y destrucción de tejidos o por una combinación de los mismos. Por "actividad antinflamatoria" se entiende una reducción o prevención de la inflamación. "Enfermedad inflamatoria" incluye cualquier proceso inflamatorio mediado por el sistema inmunitario donde el evento desencadenante o la diana de la respuesta inmunitaria implica antígenos no propios, incluyendo, por ejemplo, aloantígenos, xenoantígenos, antígenos víricos, antígenos bacterianos, antígenos desconocidos o alérgenos. En una realización, la enfermedad inflamatoria es un trastorno inflamatorio de las vías respiratorias, por ejemplo, asma o EPOC.

El asma se considera una enfermedad inflamatoria común de las vías respiratorias caracterizada, por ejemplo, por síntomas variables o recurrentes, obstrucción reversible de las vías respiratorias y broncoespasmo. Los síntomas del asma pueden incluir pitidos, tos, opresión en el pecho y falta de aliento. Los síntomas pueden desencadenarse por exposición a alérgenos o irritantes. El asma puede clasificarse como atópica (extrínseca) o no atópica

(intrínseca), basándose en si los síntomas se desencadenan por alérgenos (atópica) o no (no atópica). Una exacerbación aguda del asma se cita normalmente como un "ataque de asma". Los síntomas adicionales que pueden producirse durante un ataque de asma incluyen el uso de músculos accesorios de la respiración (músculos esternocleidomastoideo y escaleno del cuello), puede haber un pulso paroxístico (un pulso que es más débil durante la inhalación y más fuerte durante la exhalación) y exceso de hinchado del pecho. Debido a la falta de oxígeno puede aparecer una coloración azul en la piel y las uñas.

De acuerdo con los métodos de la presente divulgación, se usa al menos una molécula de unión anti-IL-33, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como se define en otras partes del presente documento, para promover una respuesta terapéutica positiva respecto del tratamiento o prevención de una enfermedad inflamatoria. Por "respuesta terapéutica positiva", respecto de una enfermedad inflamatoria, se entiende una mejora en la enfermedad asociada con la actividad antinflamatoria o similares, de estos anticuerpos y/o una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad. Es decir, puede observarse una reducción en la respuesta inflamatoria, incluyendo, pero sin limitación, secreción reducida de citocinas inflamatorias, moléculas de adhesión, proteasas, inmunoglobulinas, combinaciones de los mismos y similares, producción aumentada de proteínas antinflamatorias, una reducción en el número de células autorreactivas, un aumento en la tolerancia inmunitaria, inhibición de la supervivencia de células autorreactivas, reducción de la apoptosis, reducción de la migración de

células endoteliales, aumento en la migración espontánea de monocitos, reducción y/o disminución de uno o más síntomas mediados por la estimulación de células que expresan IL-33. Dichas respuestas terapéuticas positivas no están limitadas a la ruta de administración.

Puede evaluarse la respuesta clínica usando técnicas de examen tales como obtención de imágenes de resonancia magnética (IRM), obtención de imágenes radiográficos con rayos X, exploración por tomografía computarizada (TC), citometría de flujo o análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), histología, patología macroscópica y bioquímica sanguínea, incluyendo sin carácter limitante cambios detectables mediante ELISA, RIA, cromatografía y similares. Además de estas respuestas terapéuticas positivas, el sujeto que se somete a terapia con la molécula de unión anti-IL-33, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo puede experimentar el efecto beneficioso de una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad.

Las moléculas de unión anti-IL-33, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la divulgación pueden usarse en combinación con cualquier terapia conocida para enfermedades inflamatorias, incluyendo cualquier agente o combinación de agentes conocidos como útiles o que se haya usado o que se utilice en la actualidad para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, por ejemplo, asma o EPOC. Los agentes usados para tratar el asma se dividen en dos clases generales: medicamentos para alivio rápido usados para tratar síntomas agudos; y medicaciones para el control a largo plazo usadas para prevenir exacerbaciones adicionales. Los tratamientos

de acción rápida incluyen, por ejemplo, agonistas de beta-2 adrenorreceptor de corta acción (SABA) (por ejemplo, salbutamol); medicaciones anticolinérgicas (por ejemplo, bromuro de ipratropio), agonistas adrenérgicos (por ejemplo, epinefrina). Los tratamientos para el control a largo plazo incluyen, por ejemplo, glucocorticoides (por ejemplo, propionato de fluticasona); agonistas de beta-2 adrenorreceptor de larga duración (LABA); antagonistas de leucotrienos (por ejemplo, zafirlukast); y estabilizantes de mastocitos (por ejemplo, cromolin sódico). Los tratamientos de control de acción rápida y de larga duración se administran normalmente por vía inhalatoria.

Por lo tanto, en los casos donde las terapias combinadas comprendan la administración de una molécula de unión anti-IL-33 en combinación con la administración de otro agente terapéutico, los métodos de la divulgación abarcan la coadministración, usando formulaciones separadas o una sola formulación farmacéutica y la administración consecutiva en cualquier orden. En algunas realizaciones de la divulgación, los anticuerpos ant-IL-33 descritos en el presente documento se administran en combinación con fármacos antinflamatorios, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo y los agentes terapéuticos pueden administrarse secuencialmente, en cualquier orden o simultáneamente (es decir, de manera concurrente o en el mismo espacio de tiempo).

Una realización adicional de la divulgación es el uso de una molécula de unión anti-IL-33, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, para el control diagnóstico de niveles de proteínas en tejidos como parte de un procedimiento de pruebas clínicas,

por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento concreto. Por ejemplo, puede facilitarse la detección mediante el acoplamiento del anticuerpo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa del rábano picante, fosfatasa alcalina, β-galactosidasa o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptadivina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina-fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y los ejemplos de material radiactivo adecuados incluyen ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S o ^{3}H.

VIII. Composiciones farmacéuticas y métodos de administración

Los métodos para preparar y administrar la molécula de unión anti-IL-33, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la divulgación a un sujeto que lo necesite se conocen bien o se determinan fácilmente por los expertos en la materia. La vía de administración de la molécula de unión anti-IL-33, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo puede ser, por ejemplo, oral, parenteral, por inhalación o tópica. El

término parenteral, tal como se usa en el presente documento, incluye, por ejemplo, administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal. Aunque se contempla claramente que todas estas formas de administración se encuentran dentro del alcance de la divulgación, otro ejemplo de una forma de administración sería una solución para inyección, en particular para el goteo o la inyección intraarterial o intravenosa. Normalmente, una composición farmacéutica adecuada de la divulgación puede comprender un tampón (por ejemplo, tampón acetato, fosfato o citrato), un tensioactivo (por ejemplo, un polisorbato), opcionalmente un agente estabilizante (por ejemplo, albúmina humana), etc. Sin embargo, en otros métodos compatibles con las enseñanzas del presente documento, las moléculas de unión anti-IL-33, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la divulgación, pueden suministrarse directamente al sitio de la población celular adversa, aumento de este modo la exposición del tejido enfermo al agente terapéutico. En una realización, la administración es directamente a la vía respiratoria, por ejemplo, por inhalación o administración intranasal.

Tal como se describe en el presente documento, las moléculas de unión anti-IL-33, por ejemplo, los anticuerpos o fragmento de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la divulgación pueden administrarse en una cantidad farmacéuticamente eficaz para el tratamiento *in vivo* de enfermedades mediadas por células que expresan IL-33, tales como determinados tipos de enfermedades inflamatorias. A este respecto, se apreciará que las

moléculas de unión divulgadas de la divulgación se formularán de tal forma que se facilite la administración y se promueva la estabilidad del agente activo. Preferentemente, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente divulgación comprenden un vehículo estéril, no tóxico, farmacéuticamente aceptable, tal como suero salino fisiológico, tampones no tóxicos, conservantes y similares. A efectos de la presente solicitud, una cantidad farmacéuticamente eficaz de una molécula de unión anti-IL-33, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, conjugado o no conjugado, se interpretará como una cantidad suficiente para lograr una unión eficaz a una diana y para lograr un beneficio, por ejemplo, para mejorar los síntomas de una enfermedad o afección o para detectar una sustancia o una célula.

Las composiciones farmacéuticas usadas en la presente divulgación puede comprender vehículos farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, agua, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como seroalbúmina humana, sustancias tamponadoras, tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, cloruro sódico, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias a base de celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliacrilatos, ceras, polímeros de bloque de polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y lanolina.

Las preparaciones para administración incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres inyectables, tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen, por ejemplo, agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo suero salino y medio tamponado. En la presente divulgación, los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, tampón fosfato 0.01-0.1 M y preferentemente 0.05 M o suero salino al 0.8%. Otros vehículos parenterales comunes incluyen soluciones de fosfato de sodio, solución de dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, solución de Ringer lactada o aceites no volátiles. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos, tales como los basados en solución de dextrosa de Ringer y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares.

De manera más particular, las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones (en los casos donde sean hidrosolubles) o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En dichos casos, la composición ha de ser estéril y debe ser fluida hasta el punto que pueda inyectarse fácilmente. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y preferentemente, se protegerá frente a la acción contaminante de

microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un medio disolvente o de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. Puede mantenerse una fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula adecuado en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. Se describen formulaciones adecuadas para su uso en los métodos terapéuticos divulgados en el presente documento en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16ª ed. (1980).

Puede prevenirse la acción de los microorganismos mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. Puede provocarse la absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retarda la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

En cualquier caso, las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando un compuesto activo (por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-33 o un fragmento de unión a antígeno, una variante o un derivado del mismo por si mismo o en combinación con otros agentes activos) en la cantidad necesaria en un disolvente adecuado con uno o con una combinación de ingredientes enumerados en el presente documento, según sea necesario, seguido de

esterilización por filtrado. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios de entre aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son secado al vacío y criodesecado, que proporcionan un polvo de un principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo. Las preparaciones para inyección se procesan, rellenan en recipientes tales como ampollas, bolsas, botellas, jeringuillas o viales y se sellan en condiciones asépticas según métodos conocidos en la técnica. Además, las preparaciones pueden envasarse y venderse en forma de kit. Dichos artículos de fabricación tendrán preferentemente etiquetas o prospectos que indiquen que las composiciones asociadas son útiles para tratar a un sujeto que padece o que tiene predisposición a una enfermedad o trastorno.

Las formulaciones parenterales pueden ser una dosis en un solo bolo, una infusión o una dosis de carga en bolo seguida de una dosis de mantenimiento. Estas composiciones pueden administrarse a intervalos específicos fijos o variables, por ejemplo, una vez al día o "según necesidad".

Determinadas composiciones farmacéuticas usadas en la presente divulgación pueden administrarse por vía oral en una forma de dosificación aceptable, por ejemplo, cápsulas, comprimidos, suspensiones acuosas o soluciones. Determinadas composiciones farmacéuticas pueden administrarse también mediante aerosol nasal o inhalación.

Dichas composiciones pueden prepararse como soluciones en suero salino, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para potenciar la biodisponibilidad y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes convencionales.

La cantidad de una molécula de unión anti-IL-33, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento, variante o derivado del mismo que puede combinarse con los materiales de vehículo para producir una sola forma de dosificación variarán dependiendo del sujeto tratado y del modo de administración particular. La composición pueden administrarse como una única dosis, múltiples dosis o a lo largo de un periodo de tiempo establecido en una infusión. Las pautas posológicas también pueden ajustarse para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica).

De acuerdo con el alcance de la presente divulgación, los anticuerpos anti-IL-33 o los fragmentos de unión a antígeno, las variantes o los derivados de los mismos de la divulgación pueden administrarse a un ser humano u otro animal de acuerdo con los métodos anteriormente mencionados de tratamiento en una cantidad suficiente para producir un efecto terapéutico. Los anticuerpos anti-IL-33 o los fragmentos de unión a antígeno, las variantes o los derivados de los mismos de la divulgación pueden administrarse a dicho ser humano u otro animal en una forma de dosificación convencional preparada combinando el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la divulgación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable convencional de acuerdo con técnicas conocidas. Los expertos en la materia reconocerán

que la forma y el carácter del vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable están dictados por la cantidad de principio activo con el que se va a combinar, la ruta de administración y otras variables muy conocidas. Los expertos en la materia además apreciarán que puede resultar muy eficaz un cóctel que comprende una o más especies de moléculas de unión anti-IL-33, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la divulgación.

Por "dosis o cantidad terapéuticamente eficaz" o por "cantidad eficaz" se entiende una cantidad de molécula de unión anti-IL-33, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que cuando se administra, proporciona una respuesta terapéutica positiva respecto del tratamiento de un paciente que tenga una enfermedad o afección que se vaya a tratar.

La presente divulgación también proporciona el uso de una molécula de unión anti-IL-33, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad inflamatoria, incluyendo, por ejemplo, asma o EPOC.

La divulgación también proporciona el uso de una molécula de unión anti-IL-33, por ejemplo, un anticuerpo de la divulgación o un fragmento de unión a antígeno, una variante o un derivado del mismo, en la fabricación de un medicamento para tratar a un sujeto para tratar una enfermedad inflamatoria, en donde el medicamento se usa en un sujeto que se había tratado previamente con al menos una terapia diferente. Por "tratado previamente" o "pretratamiento" se entiende que el sujeto ha recibido una

o más terapias diferentes (por ejemplo, se ha tratado con al menos una terapia antinflamatoria diferente) antes de recibir el medicamento que comprende la molécula de unión anti-IL-33, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno, una variante o un derivado del mismo. "Tratado previamente" o "pretratamiento" incluye sujetos que se han tratado con al menos una terapia diferente en los 2 años, en los 18 meses, en 1 año, en los 6 meses, en los 2 meses, en las 6 semanas, en 1 mes, en las 4 semanas, en las 3 semanas, en las 2 semanas, en 1 semana, en los 6 días, en los 5 días, en los 4 días, en los 3 días, en los 2 días o incluso 1 día antes de iniciar el tratamiento con el medicamento que comprende la molécula de unión anti-IL-33, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno, una variante o un derivado del mismo. No es necesario que el sujeto respondiese al pretratamiento con la terapia o terapias previas. Por lo tanto, el sujeto que recibe el medicamento que comprende la molécula de unión anti-IL-33, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno, una variante o un derivado del mismo podría haber respondido o podría haber fracasado en la respuesta al pretratamiento con la terapia anterior o a una o más de las terapias anteriores en los casos donde el pretratamiento comprenda múltiples terapias.

IX. Diagnóstico

La divulgación proporciona además un método diagnóstico útil durante el diagnóstico de enfermedades mediadas por células que expresan IL-33, tales como determinados tipos de enfermedades inflamatorias que incluyen, por ejemplo, asma, que implican medir el nivel de expresión de la proteína o el transcrito de IL-33 en tejido

u otras células o fluidos corporales de un individuo y comparar el nivel de expresión medido con un nivel de expresión de IL-33 patrón en tejido corporal o fluido corporal normal, mediante el cual, un aumento en el nivel de expresión en comparación con el patrón indica un trastorno.

Los anticuerpos anti-IL-33 de la divulgación y los fragmentos de unión a antígeno, las variantes y los derivados de los mismos pueden usarse para ensayar niveles de proteína IL-33 en una muestra biológica usando métodos inmunohistológicos clásicos conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Jalkanen, *et al*., *J. Cell. Biol. 101*:976-985 (1985); Jalkanen *et al*., *J. Cell Biol*. 105:3087-3096 (1987)). Otros métodos basados en anticuerpos útiles para detectar la expresión de la proteína IL-33 incluyen inmunoensayos, tales como el ensayo inmunosorbente ligando a enzimas (ELISA), inmunoprecipitación o transferencia de Western. Se describen ensayos adecuados en más detalle en otra parte en el presente documento.

Por "ensayar el nivel de expresión del polipéptido IL-33" se entiende medir o estimar cualitativa o cuantitativamente el nivel de polipéptido IL-33 en una primera muestra biológica directamente (por ejemplo, determinando o estimando el nivel de proteína absoluta) o relativamente (por ejemplo, comparando con el nivel de polipéptido asociado con la enfermedad en una segunda muestra biológica). Preferentemente, el nivel de expresión del polipéptido IL-33 en la primera muestra biológica se mide, se estima y se compara con un nivel de polipéptido IL-33 convencional, tomándose el nivel convencional de una segunda muestra biológica obtenida de un individuo que no

tiene el trastorno o determinándose promediando los niveles de una población de individuos que no tienen el trastorno. Tal como se apreciará en la técnica, una vez que se conoce el nivel de polipéptido IL-33 "convencional", puede usarse repetidamente como patrón para la comparación.

Por "muestra biológica" se entiende cualquier muestra biológica obtenida de un individuo, línea celular, cultivo tisular u otra fuente de células que pueda expresan IL-33. Se conocen bien en la técnica métodos para obtener biopsias de tejido y fluidos corporales de mamíferos.

X. Inmunoensayos

Las moléculas de unión anti-IL-33, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la divulgación pueden someterse a ensayo para determinar la unión inmunoespecífica mediante cualquier método conocido en la técnica. Los ensayos de unión pueden llevarse a cabo como ensayos de unión directa o como ensayos de unión competitiva. Los inmunoensayos que pueden emplearse incluyen, pero sin limitación, ELISA (ensayo inmunosorbente ligado a enzimas), transferencia de Western, inmunocitoquímica, inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad, interferometría de biocapas, Octet, ForteBio) y ensayos bioquímicos, tales como inmunoensayos fluorescentes de lantánido potenciados por disociación (DELFIA®, Perkin Elmer), ensayos de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) (por ejemplo, homogéneos de fluorescencia resuelta en tiempo (HTRF® CisBio International) y ensayos de unión de radioligando, solo por nombrar algunos. La unión también puede detectarse en ensayos celulares, por ejemplo, mediante citometría de flujo y tecnología de ensayo

microvolumétrico fluorescente (FMAT®, Applied Biosystems). En un ensayo de unión directa, se ensaya un anticuerpo candidato respecto de la unión al antígeno de IL-33. Por otra parte, los ensayos de unión de competición evalúan la capacidad de un anticuerpo candidato para competir con un anticuerpo o un fragmento anti-IL-33 conocido u otro compuesto, tal como ST2, que se une a IL-33. Dichos ensayos son rutinarios y bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel *et al*., eds, (1994) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc., NY) Vol. 1, que se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad). A continuación se describen brevemente inmunoensayos ejemplares (pero estos no tienen carácter limitante).

Los protocolos de inmunoprecipitación comprenden generalmente lisar una población de células en un tampón de lisis, tal como tampón RIPA (NP-40 o Triton X-100 al 1%, desoxicolato de sodio al 1%, SDS al 0.1%, NaCl 0.15 M, fosfato de sodio 0.01 M a pH 7.2, Trasilol al 1%) complementado con proteína fosfatasa y/o inhibidores de proteasas (por ejemplo, EDTA, PMSF, aprotinina, vanadato de sodio), añadir el anticuerpo de interés al lisado celular, incubar durante un periodo de tiempo (por ejemplo, 1-4 horas) a 4°C, añadir perlas de sefarosa de proteína A y/o proteína G al lisado celular, incubar durante aproximadamente una hora o más a 4°C, lavar las perlas en tampón de lisis y resuspender las perlas en SDS/tampón de muestra. Puede evaluarse la capacidad del anticuerpo de interés para inmunoprecipitar un antígeno particular mediante, por ejemplo, análisis de transferencia de Western. Un experto en la materia podría tener

conocimientos acerca de los parámetros que pueden modificarse para aumentar la unión del anticuerpo a un antígeno y reducir el fondo (por ejemplo, aclarar previamente el lisado celular con perlas de sefarosa). Para una descripción adicional acerca de los protocolos de inmunoprecipitación, véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds, (1994) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc., NY) Vol. 1 en 10.16.1.

El análisis de transferencia de Western normalmente comprende preparar muestras de proteínas, efectuar una electroforesis de las muestras de proteína en un gel de poliacrilamida (por ejemplo, SDS-PAGE al 8%-20%, dependiendo del peso molecular del antígeno), transferir la muestra de proteína del gel de poliacrilamida a una membrana, tal como nitrocelulosa, PVDF o nylon, bloquear la membrana en solución de bloqueo (por ejemplo, PBS con BSA al 3% o leche desnatada), lavar la membrana en tampón de lavado (por ejemplo, PBS-Tween 20), bloquear la membrana con anticuerpo primario (el anticuerpo de interés) diluido en tampón de bloqueo, lavar la membrana en tampón de lavado, bloquear la membrana con un anticuerpo secundario (que reconoce al anticuerpo primario, por ejemplo, un anticuerpo anti-humano) conjugado a un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) o a una molécula radiactiva (por ejemplo, ^{32}P o ^{125}I) diluido en tampón de bloqueo, lavar la membrana en tampón de lavado y detectar la presencia del antígeno. Un experto en la materia tendrá conocimientos acerca de los parámetros que pueden modificarse para aumentar la señal detectada y para reducir el ruido de fondo. Para una descripción adicional acerca de los protocolos de

transferencia de Western, véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds, (1994) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc., NY) Vol. 1 en 10.8.1.

Los ELISA comprenden preparar antígeno, recubrir los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos con el antígeno, añadir el anticuerpo de interés conjugado a un compuesto detectable, tal como un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) a los pocillos e incubar durante un periodo de tiempo y detectar la presencia del antígeno. En los ELISA, el anticuerpo de interés no tiene por qué estar conjugado a un compuesto detectable; en su lugar, puede añadirse a cada pocillo un segundo anticuerpo (que reconoce al anticuerpo de interés) conjugado a un compuesto detectable. Además, en lugar de recubrir los pocillos con el antígeno, el pocillo puede recubrirse con el anticuerpo. En este caso, puede añadirse un segundo anticuerpo conjugado a un compuesto detectable después de la adición del antígeno de interés a los pocillos recubiertos. Un experto en la materia tendrá conocimientos acerca de qué parámetros pueden modificarse para aumentar la señal detectada así como otras variaciones de los ELISA conocidas en la técnica. Para una descripción adicional acerca de los ELISA, véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds, (1994) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc., NY) Vol. 1 en 13.2.1.

Los anticuerpos anti-IL-33 o los fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la divulgación pueden además emplearse histológicamente, como en ensayos de inmunofluorescencia, microscopía inmunoelectrónica o ensayos no inmunológicos, para la detección *in situ* de la proteína IL-33 o variantes

conservadas o fragmentos peptídicos de la misma. La detección *in situ* puede lograrse retirando un espécimen histológico de un paciente y aplicándole al mismo un anticuerpo anti-IL-33 marcado o un fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, aplicado preferentemente recubriendo con el anticuerpo (o fragmento) marcado una muestra biológica. Mediante el uso de un procedimiento de este tipo, es posible determinar no solo la presencia de la proteína IL-33 o variantes conservadas o fragmentos peptídicos, sino también su distribución en el tejido examinado. Utilizando la presente divulgación, los expertos en la materia comprenderán fácilmente que se puede modificar un método cualquiera de una amplia variedad de métodos histológicos (tales como los procedimientos de tinción) con el fin de conseguir dicha detección *in situ*.

Los inmunoensayos y no inmunoensayos para productos génicos de IL-33 o variantes conservadas o fragmentos peptídicos de la misma comprenderán típicamente incubar una muestra, tal como un fluido biológico, un extracto de tejido, células recientemente recogidas o lisados de células que se hayan incubado en cultivo celular, en presencia de un anticuerpo marcado de manera detectable capaz de unirse a IL-33 o a variantes conservadas o fragmentos peptídicos de la misma y detectar el anticuerpo unido mediante cualquiera de una serie de técnicas bien conocidas en la materia.

La muestra biológica puede ponerse en contacto con e inmovilizarse sobre un soporte o vehículo de fase sólida, tal como nitrocelulosa u otro soporte sólido que sea capaz de inmovilizar células, partículas celulares o proteínas solubles. Después, puede lavarse el soporte con tampones

adecuados seguido de tratamiento con el anticuerpo anti-IL-33 marcado de manera detectable o un fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo. Después, puede lavarse el soporte de fase sólida con el tampón una segunda vez para retirar el anticuerpo no unido. Opcionalmente, el anticuerpo se marca con posterioridad. La cantidad de marcador unido sobre el soporte sólido puede detectarse posteriormente por medios convencionales.

Por "soporte o vehículo de fase sólida" se entiende cualquier soporte capaz de unirse a un antígeno o a un anticuerpo. Los soportes o vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, gabros y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble hasta cierto punto o insoluble para los fines de la presente divulgación. El material de soporte puede tener prácticamente cualquier configuración estructural posible, en tanto que la molécula acoplada sea capaz de unirse a un antígeno o un anticuerpo. Por lo tanto, la configuración del soporte puede ser esférica, tal como una perla o cilíndrica, como la superficie interior de un tubo de ensayo o la superficie externa de una varilla. Como alternativa, la superficie puede ser planta, tal como una lámina, tira de ensayo, etc. Los soportes preferidos incluyen perlas de poliestireno. Los expertos en la materia conocerán muchos otros vehículos adecuados para unir anticuerpo o antígeno o serán capaces de determinar los mismos mediante el uso de experimentación rutinaria.

También pueden efectuarse ensayos de unión de fase en solución usando métodos adecuados conocidos en la técnica,

a modo de ejemplo, pero sin limitación, ensayos de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) (por ejemplo, fluorescencia homogénea resuelta en tiempo (HTRF®, Cis Biointernational). Un ensayo HTRF® es una tecnología de ensayo homogéneo que utiliza la transferencia de energía de fluorescencia entre un fluoróforo donante y uno aceptor que se encuentran muy próximos (Mathis, G., *Clin Chem 41*(9):1391-7 (1995)). El ensayo puede usarse para medir interacciones macromoleculares acoplando directa o indirectamente una de las moléculas de interés a un fluoróforo donante, por ejemplo, europio (Eu3+) y acoplando la otra molécula de interés a un fluoróforo aceptor, por ejemplo, XL665 (una aloficocianina reticulada estable). La excitación de la molécula donante da como resultado una emisión de fluorescencia. La energía de esta emisión puede transferirse a un fluoróforo aceptor, cuando se encuentra muy próximo al fluoróforo donante, dando como resultado la emisión de una fluorescencia específica de larga duración.

La actividad de unión de un lote concreto de anticuerpo anti-IL-33 o un fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo puede determinarse de acuerdo con métodos bien conocidos. Los expertos en la materia serán capaces de determinar condiciones de ensayo operativas y óptimas para cada determinación empleando experimentación rutinaria.

Hay una diversidad de métodos disponibles para medir la afinidad de una interacción anticuerpo-antígeno, pero relativamente pocos para determinar constantes de velocidad. La mayoría de los métodos se basan en marcar el anticuerpo o el antígeno, lo que inevitablemente complica

mediciones rutinarias e introduce incertidumbres en las cantidades medidas.

La afinidad de unión de un anticuerpo por un antígeno y la velocidad de disociación de la interacción anticuerpo-antígeno puede determinarse mediante ensayos de unión competitiva. Un ejemplo de un ensayo de unión competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación de antígeno marcado (por ejemplo, ^{3}H o ^{125}I) con el anticuerpo de interés en presencia de cantidades crecientes de antígeno no marcado y la detección del anticuerpo unido al antígeno marcado. La afinidad del anticuerpo de interés por un antígeno particular y las velocidades de disociación de unión pueden determinarse a partir de los datos mediante análisis de gráficas de Scatchard. La competición con un segundo anticuerpo también puede determinarse usando radioinmunoensayos. En este caso, el antígeno se incuba con el anticuerpo de interés que está conjugado a un compuesto marcado (por ejemplo, ^{3}H o ^{125}I) en presencia de cantidades crecientes de un segundo anticuerpo no marcado.

La resonancia de plasmón superficial (SPR) efectuada en BIACORE®, ofrece una serie de ventajas frente a métodos convencionales para medir la afinidad de las interacciones anticuerpo-antígeno: (i) falta de necesidad de marcar el anticuerpo o el antígeno; (ii) los anticuerpos no necesitan purificación previa; (iii) posibilita la medición en tiempo real, permitiendo una rápida comparación semicuantitativa de diferentes interacciones con anticuerpo monoclonal, y es suficiente para muchos fines de evaluación; (iv) la superficie bioespecífica puede regenerarse, de tal forma que puede compararse en idénticas condiciones una serie de diferentes anticuerpos monoclonales; (v) los procedimientos

analíticos están completamente automatizados y pueden efectuarse grandes números de mediciones sin intervención por parte del usuario. BIAapplications Handbook, versión AB (reimpresión de 1998), BIACORE® N.° de código BR-1001-86; BIAtechnology Handbook, versión AB (reimpresión de 1998), BIACORE® N.° de código BR-1001-84. Los estudios de unión basados en la SPR requieren que un miembro de un par de unión esté inmovilizado sobre una superficie sensora. El compañero de unión inmovilizado se cita como el ligando. El compañero de unión en solución se cita como el analito. En algunos casos, el ligando se une indirectamente a la superficie a través de la unión a otra molécula inmovilizada, lo que se cita como la molécula e captura. La respuesta de SPR refleja un cambio en la concentración de masa en la superficie del detector a medida que los analitos se unen o se disocian.

Basándose en la SPR, las mediciones BIACORE® en tiempo real monitorizan las interacciones directamente a medida que se producen. La técnica es ideal para la determinación de parámetros cinéticos. La clasificación de afinidad comparativa es fácil de llevar acabo y pueden derivarse constantes tato cinéticas como de afinidad a partir de los datos del sensograma.

Cuando se inyecta un analito en un pulso discreto a través de una superficie de ligando, el sensograma resultante puede dividirse en tres fases esenciales: (i) Asociación del analito con el ligando durante la inyección de la muestra; (ii) equilibrio de estado estacionario durante la inyección de la muestra, donde la velocidad de unión al analito está equilibrada con la disociación del

complejo; (iii) disociación del analito de la superficie durante el flujo de tampón.

Las fases de asociación y disociación proporcionan información acerca de la cinética de la interacción de analito-ligando (k_a y k_d, las velocidades de formación y disociación del complejo, $k_d/k_a=K_D$). La fase de equilibrio proporciona información acerca de la afinidad de la interacción de analito-ligando (K_D).

El programa informático BIAevaluation proporciona facilidades exhaustivas para ajustar la curva usando tanto integración numérica como algoritmos de ajuste globales. Con un análisis de los datos, pueden obtenerse constantes de velocidad y de afinidad separadas para la interacción a partir de investigaciones BIACORE® sencillas. El intervalo de afinidades medibles mediante esta técnica es muy amplio, variando de mM a pM.

Otro ejemplo de dicho método incluye medir la constante de disociación en equilibrio "K_D" usando un ensayo de exclusión cinética que puede llevarse a cabo, por ejemplo, usando un instrumento KinExa (Sapidyne Instruments). Brevemente, la constante de equilibrio de disociación en fase de solución K_D de los anticuerpos anti-IL-33 puede determinarse mezclando previamente diversas concentraciones del anticuerpo con IL-33 hasta que se alcanza el equilibrio. Después, se mide la cantidad de anticuerpo libre usando el KinExa capturando anticuerpo libre usando perlas recubiertas de IL-33, eliminando por lavado el material no unido y detectando el anticuerpo unido usando un anticuerpo específico para una especie marcado fluorescentemente. La cantidad de anticuerpo libre detectada a cada concentración de IL-33 se representa

frente a la concentración de IL-33 y se usa el programa informático KinExa para calcular la constante de disociación en el equilibrio (K_D).

Los métodos y reactivos adecuados para determinar las características de unión de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo aislado presentado o cualquier derivado alterado/mutante del mismo (descrito más adelante), son conocidos en la técnica y/o se encuentran disponibles comercialmente. Los equipos y programas informáticos diseñados para dichos análisis cinéticos se encuentran disponibles comercialmente (por ejemplo, BIAcore, programa informático BIAevaluation, GE Healthcare; KinExa Software, Sapidyne Instruments).

La especificidad por el epítopo es una característica importante de un anticuerpo monoclonal. A diferencia de las técnicas convencionales que usan radioinmunoensayo, ELISA u otros métodos de adsorción superficial, el mapeo de epítopos con BIACORE®, no necesita del marcaje o purificación de los anticuerpos y permite pruebas con especificidad den varios sitios usando una secuencia de varios anticuerpos monoclonales. Además, pueden procesarse automáticamente grandes cantidades de análisis.

Los experimentos de unión emparejados prueban la capacidad de dos MAb para unirse simultáneamente al mismo antígeno. Los MAb dirigidos contra epítopos diferentes se unirán de manera independiente, mientras que los MAb dirigidos contra epítopos idénticos o estrechamente relacionados interferirán con la unión de los otros. Estos experimentos de unión con BIACORE® son de aplicación directa.

Por ejemplo, puede usarse una molécula de captura para que se una al primer MAb, seguido de la adición de antígeno y un segundo MAb de manera secuencial. Los sensogramas revelarán: (1) qué cantidad del antígeno se une al primer MAb, (2) hasta qué punto se une el segundo MAb al antígeno unido a la superficie, (3) si el segundo MAb no se une o si revertir el orden de las pruebas emparejadas altera los resultados.

La inhibición de péptido es otra técnica usada para el mapeo de epítopos. Este método puede complementar los estudios de unión de anticuerpos emparejados y puede relacionar epítopos funcionales con características estructurales cuando se conoce la secuencia primaria del antígeno. Los péptidos o fragmentos de antígeno se ensayan respecto de la inhibición de la unión de diferentes MAb a antígeno inmovilizado. Se sobreentiende que los péptidos que interfieren con la unión de un MAb dado están relacionados estructuralmente con el epítopo definido por ese MAb.

La práctica de la presente divulgación empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que se encuentran dentro del nivel de conocimientos de la técnica. Dichas técnicas se explican detalladamente en la bibliografía.

Todas las referencias citadas en el presente documento se incorporan al presente documento por referencia en su totalidad.

Los siguientes ejemplos se presentan a modo de ilustración y no a modo de limitación.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1 Muestra un ensayo HTRF para la unión de IL33-ST2 humano en presencia de preparaciones periplásmicas de scFv no purificado. Se resalta un pocillo que contiene el anticuerpo IL330004.

Figura 2 Muestra la neutralización de IL33 humana y de cinomolgo mediante preparaciones de scFv purificadas en un ensayo HTRF de IL33-ST2.

Figura 3 Muestra la neutralización de IL33 humana y de cinomolgo mediante preparaciones de IgG purificadas en un ensayo HTRF de IL33-ST2.

Figura 4 Muestra la neutralización de IL33 humana mediante preparaciones de IgG purificada en ensayos de señalización de NFκB.

Figura 5 Muestra la detección de IL-33 endógena en células de músculo liso bronquial mediante tinción de inmunofluorescencia mediante el anticuerpo para IL-33 IL330004 (panel derecho) en comparación con el control negativo de CAT-002 (panel izquierdo).

Figura 6 Muestra los datos de unión de una sola placa explorada frente a IL-33 humana, IL-33 de cinomolgo e insulina. Se muestra una molécula de unión a IL-33 específica con reactividad cruzada para humano/cinomolgo en el pocillo C4 y los pocillos A12 y B12 contienen clon de unión a IL-33 de control.

Figura 7A Muestra la actividad neutralizante de los anticuerpos en un ensayo de proliferación de TF-1.

Figura 7B Muestra la actividad de neutralización de los anticuerpos en un ensayo de producción de IL-6 de HUVEC.

Figura 8 Muestra la actividad neutralizante de los anticuerpos en un ensayo de producción de citocinas de mastocitos.

Figura 9 Muestra la unión de anticuerpos para IL-33 (IL330065, IL330101, IL330107 e IL330149) a IL-33 humana de longitud completa mediante transferencia de Western.

Figura 10 Muestra la actividad neutralizante de los anticuerpos anti-IL-33 IL330065 e IL330101 en la producción de IL-6 e IL-13 de mastocitos estimulada por lisados celulares de IL-33 de longitud completa.

Figura 11A Muestra un ensayo de competición de receptor-ligando HTRF® en presencia de los anticuerpos IL330065, IL330099, IL330101, IL330107, IL33149 e IL330180.

Figura 11B Muestra el ensayo de translocación de NFκB (p65/RelA) en HUVEC en presencia de los anticuerpos IL330065, IL330099, IL330101, IL330107 e IL330149.

Figura 12A Muestra la unión competitiva de preparaciones de scFv purificado con el mAb IL330101 por la unión a IL-33 humana biotinilada.

Figura 12B Muestra la unión competitiva de preparaciones de scFv purificado con el mAb IL330180 por la unión a IL-33 humana biotinilada.

Figura 13 Muestra la unión competitiva del scFv IL330259 con el mAb IL330101 por la unión a IL-33 humana biotinilada.

Figura 14A Muestra la unión competitiva de la IgG IL330259 con el mAb IL330101 por la unión a IL-33 humana biotinilada.

Figura 14B Muestra la unión competitiva de anticuerpos con el mAb H338L293 por la unión a IL-33 humana biotinilada.

Figura 15 Muestra la actividad neutralizante de los anticuerpos en ensayos de producción de IL-6 de HUVEC o mastocitos.

Figura 16 Muestra un análisis de Schild de IL330388 y H338L293 en un ensayo de producción de IL-6 de mastocitos.

Figura 17 Muestra la actividad de IL-33 humana, IL-33 biotinilada en cisteína o IL-33 pretratada en medio de cultivo celular, medida en ensayos de señalización de HUVEC (30 minutos) y el ensayo de producción de IL-6 (18-24 horas).

Figura 18 Muestra la SDS-PAGE de IL-33 humana, humana biotinilada o de ratón en condiciones reductoras o no reductoras, antes o después del tratamiento con medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM).

Figura 19 Muestra la purificación de IL-33 humana tratada con medio de cultivo celular por SEC.

Figura 20 Muestra la masa intacta de IL-33 tratada con PBS frente a medio, determinada por LC-MS. La IL-33 tratada con IMDM mostró una pérdida de 4 Da en comparación con la tratada con PBS, lo que es compatible con la formación de dos enlaces disulfuro.

Figura 21 Muestra el mapeo de disulfuros de IL-33 humana tratada con medio. Los datos fueron coherentes con la formación de dos puentes disulfuro.

Figura 22A Muestra el análisis por SDS-PAGE de una alta concentración de redIL-33 y DSB IL-33 para análisis por NMR.

Figura 22B Muestra el análisis de coherencia de cuanto múltiple heteronuclear por NMR (HMQC) son superposición de los espectros de HMQC de ^{1}H-^{15}N para IL-33 humana marcada con ^{15}N para redIL-33 y DSB IL-33.

Figura 22C Espectro de dicroísmo circular (CD) de UV cercano.

Figura 22D Muestra características clave de IL-33 (Trp193, cisteínas y sitio de unión a ST2) indicadas dentro de la estructura resuelta de IL-33.

Figura 22E Muestra el espectro de dicroísmo circular (CD) de UV lejano.

Figura 23 Muestra el análisis de intercambio de hidrógeno-deuterio de redIL-33 y DSB IL-33. Las diferencias en la incorporación de deuterio se mapean en la estructura publicada de IL-33.

Figura 24 Muestra la unión de redIL-33 o DSB IL-33 a ST2.

Figura 25 Muestra el análisis de tres ensayos comerciales ELISA para IL-33 para la detección de las formas redIL-33 y DSB IL-33.

Figura 26 Muestra ensayos ELISA que son específicos para la detección de redIL-33.

Figura 27 Muestra un transcurso de tiempo de IL-33 humana incubada en medio de cultivo celular (IMDM) o suero humano. Las formas redIL-33 o DSB IL-33 se miden mediante ELISA o transferencia de Western.

Figura 28 Muestra el análisis de BALF de ratones humanizados para IL-33 recogido en varios instantes después de la exposición intranasal a *Alternaria*, usando una combinación de múltiples ensayos ELISA. Se usaron ensayos de (**A**) Millipore, (**B**) R&D Systems y (**C**) IL330425/sST2-

biotina para medir IL-33 en presencia o ausencia de sST2 (gráficas a la izquierda). Las señales en presencia de sST2 (con eliminación de la señal de la fracción de IL-33 reducida) se compararon con un patrón de IL-33 unida por disulfuro para cuantificar los niveles de IL-33 unida por disulfuro. La señal de IL-33 reducida se calculó como la diferencia en la señal entre las mediciones de IL-33 en presencia y ausencia de ST2, cuantificadas frente a un patrón de IL-33 reducida. Las estimaciones para IL-33 reducida se muestran en las gráficas de la derecha.

Figura 29 Muestra el análisis de BALF de ratones BALB/c de tipo silvestre recogido en diversos instantes de tiempo después de la exposición intranasal a *Alternaria*. Se usó ELISA para IL-33 de ratón (R&D Systems) para medir IL-33 en presencia o ausencia de sST2 (IL-33 de ratón tratada con medio usada como curva patrón). Las señales en presencia de sST2 (con eliminación de la señal de la fracción de IL-33 reducida) se compararon con un patrón de IL-33 de ratón tratada con medio para cuantificar los niveles de IL-33 oxidada. La señal de IL-33 reducida se calculó como la diferencia en la señal entre las mediciones de IL-33 en presencia y ausencia de ST2, cuantificadas frente a un patrón de IL-33 de ratón reducida.

Figura 30A Muestra las unidades relativas de fluorescencia a los 100 minutos después de la incubación de 5uM de anticuerpo con 20uM de IL33 a 25°C en presencia de colorante naranja SYPRO 8x. En presencia de IL-33 H338L293, pero no de IL330004 o del mAb de control, la señal fluorescente aumentada es indicativa de desplegamiento de la proteína.

Figura 30B Muestra las unidades relativas de fluorescencia con el paso del tiempo después de la incubación de diversas concentraciones de H338L293 con 20uM de IL33 a 25°C en presencia de colorante naranja SYPRO 8x. La señal de fluorescencia aumentó con el aumento de la concentración de anticuerpo.

Figura 30C Muestra el análisis de SDS-PAGE de IL-33. La preincubación de IL-33 con H338L293, pero no con mAb de control o sin mAb, aumentó la presencia de la forma unida por disulfuro de migración más rápida de IL-33 en condiciones no reductoras.

Figura 31 Muestra un trascurso de tiempo de la neutralización de la señalización de NFκB estimulada por la neutralización de IL-33 en HUVEC con el mAb H338L293.

Figura 32 Muestra la inhibición de la señal de FRET, producida por la unión de IL-33 humana a ST2 humano, con concentraciones crecientes de H338L293 en condiciones directamente competitivas o después de preincubación con IL-33.

Figura 33 Muestra el mapeo de epítopos de H338L293. El panel superior muestra el análisis SEC de complejos IL33:Igg con H338L293 y digestión posterior con tripsina. El panel inferior muestra el péptido truncado que se determinó que se unía fuertemente a H338L293, coloreado de negro dentro de la estructura de IL-33 descrita por Linger et al 2009.

Figura 34 Muestra la actividad de señalización de NFκB de IL-33 de tipo silvestre (IL33-01) y mutantes de cisteína a serina de IL-33 antes y después del tratamiento durante 18 horas con medio de cultivo celular IMDM.

Figura 35 Muestra que IL33-11 tiene una mayor potencia que IL33-01 (TS) *in vitro* e *in vivo*.

Figura 36 Muestra una superposición de los espectros HMQC de ^{1}H-^{15}N para IL33-01 e IL33-11 0.1 mM marcadas con ^{15}N representadas en negro y rojo, respectivamente. Se indica la asignación para restos relevantes. Los datos muestran cambios de pico aproximadamente en C208 y C259, según se esperaba. Sin embargo, hay más cambios de picos de los esperados de T185 a A196, lo que podría indicar un cambio de conformación.

Figura 37 Muestra un trascurso temporal de la actividad de neutralización de IL-33 del scFv 33v20064 en un ensayo de unión HTRF de IL33-ST2.

Figura 38 Muestra un trascurso temporal de la actividad de neutralización de IL-33 de la IgG 33v20064 en un ensayo de unión HTRF de IL33-ST2.

Figura 39 Muestra la neutralización por anticuerpos de la producción de IL-6 en HUVEC estimuladas por IL-33 de tipo silvestre o mutante.

Figura 40 Muestra la inhibición de la señal de FRET, producida por IL-33-01 humana biotinilada que se une a 33v20064 marcada con DyLight, con concentraciones crecientes de proteínas de prueba. La inhibición de la señal corresponde a la afinidad de unión relativa de 33v20064 por la proteína de ensayo.

Figura 41 Muestra un trascurso temporal de la actividad de neutralización de IL-33 en un ensayo de unión HTRF de IL-33-ST2 de la variante de línea germinal 33_640001 en comparación con el scFv parental 33v20064.

Figura 42 Muestra la neutralización por anticuerpos de la producción de IL-8 en HUVEC estimuladas por IL-33 truncada (112-270) o de longitud completa (1-270).

Figura 43 Muestra el efecto de las proteínas de unión a IL-33 en la conversión de redIL-33 a DSB IL-33.

Figura 44 Muestra la inhibición de la señal de FRET en diferentes instantes, producida por IL-33 humana o de cinomolgo biotinilada que se une al mAb 33_640117, con concentraciones crecientes de proteínas de prueba. La inhibición de la señal corresponde a la afinidad de unión relativa de 33v20064 por la proteína de ensayo.

Figura 45 Muestra la neutralización por anticuerpos de la producción de IL-8 en HUVEC estimuladas por IL-33 truncada (112-270) o de longitud completa (1-270).

Figura 46 Muestra que H338L293 inhibe dependiendo de la dosis la IL-5 de BAL y la eosinofilia inducida por *Alternaria* (ALT) en ratones BALB/c de tipo silvestre. Las sustancias de ensayo se dosificaron por vía intranasal (10, 30 o 100mg/kg según se indica entre paréntesis) a las -2 horas antes de la exposición con 25ug de ALT. Se recogió BALF a las 24 horas después de la exposición a ALT y se analizó respecto de la presencia de IL-5 (**Figura 46A**) y eosinófilos (**Figura 46B**). Se determinó un efecto significativo de las sustancias de ensayo usando ANOVA de una vía con prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. ***p<0.001, ~~p< 0.01 en comparación con el mAb de control (n=4-8). Se usó trampa de IL-33 de ratón como control positivo.

Figura 47 Muestra que H338L293 (30mg/kg) y la trampa de IL-33 de ratón (10mg/kg), pero no IL330004 (30mg/kg), inhiben la IL-5 de BAL inducida por ALT en

ratones humanizados para IL-33. Las sustancias de ensayo se dosificaron por vía intranasal a las -2 horas antes de la exposición con 25ug de ALT. Se recogió BALF a las 24 horas después de la exposición a ALT y se analizó respecto de la presencia de IL-5. Se determinó un efecto significativo de las sustancias de ensayo usando ANOVA de una vía con prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. ***p<0.001, **p< 0.01 (n=4).

Figura 48 Muestra que 33_640050 inhibió de manera dependiente de la dosis la IL-5 de BAL inducida por *Alternaria* en ratones humanizados para IL-33. Las sustancias de ensayo se dosificaron por vía intraperitoneal (0.3, 3 o 30mg/kg según se indica entre paréntesis) a las -24 horas antes de la exposición con 25ug de *Alternaria*. Se recogió BALF a las 24 horas después de la exposición a ALT y se analizó respecto de la presencia de IL-5. Se determinó un efecto significativo de las sustancias de ensayo usando ANOVA de una vía con prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. ***p<0.001, **p< 0.01 (n=4-5).

Figura 49A Muestra el efecto de los anticuerpos en un ensayo de unión FRET de IL33-ST2.

Figura 49B Muestra el efecto de los anticuerpos en la liberación de IL-8 estimulada por IL-33 en HUVEC.

Figura 50 Muestra la especificidad del mAb por IL-33 de diversas especies u otros miembros de la familia de IL-1 usando un ensayo FRET basado en **(A)** IL33 / 33_640087-7B o **(B)** 33_640237-2B.

Figura 51 Muestra el efecto de los anticuerpos en la liberación de IL-8 de HUVEC estimuladas por lisado de pulmón humano.

Figura 52 Muestra que 33_640087-7B inhibió de manera dependiente de la dosis la IL-5 de BAL inducida por *Alternaria* en ratones humanizados para IL-33.

Figura 53A Diseño experimental de un estudio piloto *in vivo* para investigar el potencial de la actividad de IL-33 independiente de ST2.

Figura 53B Análisis de la exposición a IL-33 humana en fluido de BAL después de la administración repetida de IL-33 humana a ratones BALB/c.

Figura 53C Análisis de la exposición a IL-33 en plasma después de una sola administración intraperitoneal de IL-33 humana (10ug).

Figura 53D Análisis de la exposición a IL-33 en plasma después de la administración repetida de IL-33 humana a ratones BALB/c.

Figura 54 Muestra secciones representativas en parafina teñidas con H&E de tejido pulmonar de ratones a los que se administra (**A**) PBS o (**B**) IL-33 por vía intranasal durante 6 semanas.

Figura 55 Muestra la actividad de translocación nuclear de (**A**) p-p38 MAPK o (**B**) p-STAT5 en HUVEC en respuesta a IL-33 reducida o a DSB IL-33.

Figura 55C Análisis de transferencia de Western de p-p38 MAPK, p-JAK2 y p-STAT5 en HUVEC estimuladas durante 15 minutos con IL-33 reducida o DSB IL-33.

Figura 56A Muestra la unión de RAGE-Fc a IL-33 reducida o DSB mediante ELISA.

Figura 56B Muestra la inhibición de la respuesta de pSTAT5 de HUVEC a DSB IL-33 con RAGE-Fc o mAb anti-RAGE.

Figura 56C Muestra la inhibición de la respuesta de pSTAT5 de HUVEC a DSB IL-33 con mAb anti-RAGE.

Figura 57 Muestra el efecto del anti-IL-33 frente al anti-ST2 en la respuesta de pSTAT5 en HUVEC.

Figure 58 Muestra el efecto de los mAb anti-IL-33, anti-ST2 o anti-RAGE en la inhibición inducida por IL-33 de la migración de células A549 frente a (A) IL-33 reducida o (B) DSB IL-33.

Resumen de las secuencias

SEQ ID NO:	Referencia/nombre del anticuerpo	Descripción
1	IL330002	VH DNA
2	IL330002	VH PRT
3	IL330002	VH CDR1 PRT
4	IL330002	VH CDR2 PRT
5	IL330002	VH CDR3 PRT
6	IL330002	VL DNA
7	IL330002	VL PRT
8	IL330002	VL CDR1 PRT
9	IL330002	VL CDR2 PRT
10	IL330002	VL CDR3 PRT
11	IL330004	VH DNA
12	IL330004	VH PRT
13	IL330004	VH CDR1 PRT
14	IL330004	VH CDR2 PRT
15	IL330004	VH CDR3 PRT
16	IL330004	VL DNA
17	IL330004	VL PRT
18	IL330004	VL CDR1 PRT
19	IL330004	VL CDR2 PRT
20	IL330004	VL CDR3 PRT
21	IL330020	VH DNA
22	IL330020	VH PRT

23	IL330020	VH CDR1 PRT
24	IL330020	VH CDR2 PRT
25	IL330020	VH CDR3 PRT
26	IL330020	VL DNA
27	IL330020	VL PRT
28	IL330020	VL CDR1 PRT
29	IL330020	VL CDR2 PRT
30	IL330020	VL CDR3 PRT
31	IL330071	VH DNA
32	IL330071	VH PRT
33	IL330071	VH CDR1 PRT
34	IL330071	VH CDR2 PRT
35	IL330071	VH CDR3 PRT
36	IL330071	VL DNA
37	IL330071	VL PRT
38	IL330071	VL CDR1 PRT
39	IL330071	VL CDR2 PRT
40	IL330071	VL CDR3 PRT
41	IL330125	VH DNA
42	IL330125	VH PRT
43	IL330125	VH CDR1 PRT
44	IL330125	VH CDR2 PRT
45	IL330125	VH CDR3 PRT
46	IL330125	VL DNA
47	IL330125	VL PRT
48	IL330125	VL CDR1 PRT
49	IL330125	VL CDR2 PRT
50	IL330125	VL CDR3 PRT
51	IL330126	VH DNA
52	IL330126	VH PRT

53	IL330126	VH CDR1 PRT
54	IL330126	VH CDR2 PRT
55	IL330126	VH CDR3 PRT
56	IL330126	VL DNA
57	IL330126	VL PRT
58	IL330126	VL CDR1 PRT
59	IL330126	VL CDR2 PRT
60	IL330126	VL CDR3 PRT
61	IL330425	VH DNA
62	IL330425	VH PRT
63	IL330425	VH CDR1 PRT
64	IL330425	VH CDR2 PRT
65	IL330425	VH CDR3 PRT
66	IL330425	VL DNA
67	IL330425	VL PRT
68	IL330425	VL CDR1 PRT
69	IL330425	VL CDR2 PRT
70	IL330425	VL CDR3 PRT
71	IL330428	VH DNA
72	IL330428	VH PRT
73	IL330428	VH CDR1 PRT
74	IL330428	VH CDR2 PRT
75	IL330428	VH CDR3 PRT
76	IL330428	VL DNA
77	IL330428	VL PRT
78	IL330428	VL CDR1 PRT
79	IL330428	VL CDR2 PRT
80	IL330428	VL CDR3 PRT
81	IL330065	VH DNA
82	IL330065	VH PRT

83	IL330065	VH CDR1 PRT
84	IL330065	VH CDR2 PRT
85	IL330065	VH CDR3 PRT
86	IL330065	VL DNA
87	IL330065	VL PRT
88	IL330065	VL CDR1 PRT
89	IL330065	VL CDR2 PRT
90	IL330065	VL CDR3 PRT
91	IL330099	VH DNA
92	IL330099	VH PRT
93	IL330099	VH CDR1 PRT
94	IL330099	VH CDR2 PRT
95	IL330099	VH CDR3 PRT
96	IL330099	VL DNA
97	IL330099	VL PRT
98	IL330099	VL CDR1 PRT
99	IL330099	VL CDR2 PRT
100	IL330099	VL CDR3 PRT
101	IL330101	VH DNA
102	IL330101	VH PRT
103	IL330101	VH CDR1 PRT
104	IL330101	VH CDR2 PRT
105	IL330101	VH CDR3 PRT
106	IL330101	VL DNA
107	IL330101	VL PRT
108	IL330101	VL CDR1 PRT
109	IL330101	VL CDR2 PRT
110	IL330101	VL CDR3 PRT
111	IL330101_fgl	VH DNA
112	IL330101_fgl	VH PRT

113	IL330101_fgl	VH CDR1 PRT
114	IL330101_fgl	VH CDR2 PRT
115	IL330101_fgl	VH CDR3 PRT
116	IL330101_fgl	VL DNA
117	IL330101_fgl	VL PRT
118	IL330101_fgl	VL CDR1 PRT
119	IL330101_fgl	VL CDR2 PRT
120	IL330101_fgl	VL CDR3 PRT
121	IL330107	VH DNA
122	IL330107	VH PRT
123	IL330107	VH CDR1 PRT
124	IL330107	VH CDR2 PRT
125	IL330107	VH CDR3 PRT
126	IL330107	VL DNA
127	IL330107	VL PRT
128	IL330107	VL CDR1 PRT
129	IL330107	VL CDR2 PRT
130	IL330107	VL CDR3 PRT
131	IL330149	VH DNA
132	IL330149	VH PRT
133	IL330149	VH CDR1 PRT
134	IL330149	VH CDR2 PRT
135	IL330149	VH CDR3 PRT
136	IL330149	VL DNA
137	IL330149	VL PRT
138	IL330149	VL CDR1 PRT
139	IL330149	VL CDR2 PRT
140	IL330149	VL CDR3 PRT
141	IL330180	VH DNA
142	IL330180	VH PRT

143	IL330180	VH CDR1 PRT
144	IL330180	VH CDR2 PRT
145	IL330180	VH CDR3 PRT
146	IL330180	VL DNA
147	IL330180	VL PRT
148	IL330180	VL CDR1 PRT
149	IL330180	VL CDR2 PRT
150	IL330180	VL CDR3 PRT
151	IL330259	VH DNA
152	IL330259	VH PRT
153	IL330259	VH CDR1 PRT
154	IL330259	VH CDR2 PRT
155	IL330259	VH CDR3 PRT
156	IL330259	VL DNA
157	IL330259	VL PRT
158	IL330259	VL CDR1 PRT
159	IL330259	VL CDR2 PRT
160	IL330259	VL CDR3 PRT
161	IL330259_fgl	VH DNA
162	IL330259_fgl	VH PRT
163	IL330259_fgl	VH CDR1 PRT
164	IL330259_fgl	VH CDR2 PRT
165	IL330259_fgl	VH CDR3 PRT
166	IL330259_fgl	VL DNA
167	IL330259_fgl	VL PRT
168	IL330259_fgl	VL CDR1 PRT
169	IL330259_fgl	VL CDR2 PRT
170	IL330259_fgl	VL CDR3 PRT
171	H338L293	VH DNA
172	H338L293	VH PRT

173	H338L293	VH CDR1 PRT
174	H338L293	VH CDR2 PRT
175	H338L293	VH CDR3 PRT
176	H338L293	VL DNA
177	H338L293	VL PRT
178	H338L293	VL CDR1 PRT
179	H338L293	VL CDR2 PRT
180	H338L293	VL CDR3 PRT
181	H338L293_fgl	VH DNA
182	H338L293_fgl	VH PRT
183	H338L293_fgl	VH CDR1 PRT
184	H338L293_fgl	VH CDR2 PRT
185	H338L293_fgl	VH CDR3 PRT
186	H338L293_fgl	VL DNA
187	H338L293_fgl	VL PRT
188	H338L293_fgl	VL CDR1 PRT
189	H338L293_fgl	VL CDR2 PRT
190	H338L293_fgl	VL CDR3 PRT
191	IL330377	VH DNA
192	IL330377	VH PRT
193	IL330377	VH CDR1 PRT
194	IL330377	VH CDR2 PRT
195	IL330377	VH CDR3 PRT
196	IL330377	VL DNA
197	IL330377	VL PRT
198	IL330377	VL CDR1 PRT
199	IL330377	VL CDR2 PRT
200	IL330377	VL CDR3 PRT
201	IL330377_fgl	VH DNA
202	IL330377_fgl	VH PRT

203	IL330377_fgl	VH CDR1 PRT
204	IL330377_fgl	VH CDR2 PRT
205	IL330377_fgl	VH CDR3 PRT
206	IL330377_fgl	VL DNA
207	IL330377_fgl	VL PRT
208	IL330377_fgl	VL CDR1 PRT
209	IL330377_fgl	VL CDR2 PRT
210	IL330377_fgl	VL CDR3 PRT
211	IL330388	VH DNA
212	IL330388	VH PRT
213	IL330388	VH CDR1 PRT
214	IL330388	VH CDR2 PRT
215	IL330388	VH CDR3 PRT
216	IL330388	VL DNA
217	IL330388	VL PRT
218	IL330388	VL CDR1 PRT
219	IL330388	VL CDR2 PRT
220	IL330388	VL CDR3 PRT
221	IL330388_fgl	VH DNA
222	IL330388_fgl	VH PRT
223	IL330388_fgl	VH CDR1 PRT
224	IL330388_fgl	VH CDR2 PRT
225	IL330388_fgl	VH CDR3 PRT
226	IL330388_fgl	VL DNA
227	IL330388_fgl	VL PRT
228	IL330388_fgl	VL CDR1 PRT
229	IL330388_fgl	VL CDR2 PRT
230	IL330388_fgl	VL CDR3 PRT
231	IL330396	VH DNA
232	IL330396	VH PRT

233	IL330396	VH CDR1 PRT
234	IL330396	VH CDR2 PRT
235	IL330396	VH CDR3 PRT
236	IL330396	VL DNA
237	IL330396	VL PRT
238	IL330396	VL CDR1 PRT
239	IL330396	VL CDR2 PRT
240	IL330396	VL CDR3 PRT
241	IL330396_fgl	VH DNA
242	IL330396_fgl	VH PRT
243	IL330396_fgl	VH CDR1 PRT
244	IL330396_fgl	VH CDR2 PRT
245	IL330396_fgl	VH CDR3 PRT
246	IL330396_fgl	VL DNA
247	IL330396_fgl	VL PRT
248	IL330396_fgl	VL CDR1 PRT
249	IL330396_fgl	VL CDR2 PRT
250	IL330396_fgl	VL CDR3 PRT
251	IL330398	VH DNA
252	IL330398	VH PRT
253	IL330398	VH CDR1 PRT
254	IL330398	VH CDR2 PRT
255	IL330398	VH CDR3 PRT
256	IL330398	VL DNA
257	IL330398	VL PRT
258	IL330398	VL CDR1 PRT
259	IL330398	VL CDR2 PRT
260	IL330398	VL CDR3 PRT
261	IL330398_fgl	VH DNA
262	IL330398_fgl	VH PRT

263	IL330398_fgl	VH CDR1 PRT
264	IL330398_fgl	VH CDR2 PRT
265	IL330398_fgl	VH CDR3 PRT
266	IL330398_fgl	VL DNA
267	IL330398_fgl	VL PRT
268	IL330398_fgl	VL CDR1 PRT
269	IL330398_fgl	VL CDR2 PRT
270	IL330398_fgl	VL CDR3 PRT
271	ZZ1EBX-E05 (33v20064)	VH DNA
272	ZZ1EBX-E05 (33v20064)	VH PRT
273	ZZ1EBX-E05 (33v20064)	VH CDR1 PRT
274	ZZ1EBX-E05 (33v20064)	VH CDR2 PRT
275	ZZ1EBX-E05 (33v20064)	VH CDR3 PRT
276	ZZ1EBX-E05 (33v20064)	VL DNA
277	ZZ1EBX-E05 (33v20064)	VL PRT
278	ZZ1EBX-E05 (33v20064)	VL CDR1 PRT
279	ZZ1EBX-E05 (33v20064)	VL CDR2 PRT
280	ZZ1EBX-E05 (33v20064)	VL CDR3 PRT
281	ZZ1I6V-H02 (33_640001)	VH DNA
282	ZZ1I6V-H02 (33_640001)	VH PRT
283	ZZ1I6V-H02 (33_640001)	VH CDR1 PRT
284	ZZ1I6V-H02 (33_640001)	VH CDR2 PRT
285	ZZ1I6V-H02 (33_640001)	VH CDR3 PRT
286	ZZ1I6V-H02 (33_640001)	VL DNA
287	ZZ1I6V-H02 (33_640001)	VL PRT
288	ZZ1I6V-H02 (33_640001)	VL CDR1 PRT
289	ZZ1I6V-H02 (33_640001)	VL CDR2 PRT
290	ZZ1I6V-H02 (33_640001)	VL CDR3 PRT
291	ZZ1JRB-A03 (33_640027)	VH DNA
292	ZZ1JRB-A03 (33_640027)	VH PRT

293	ZZ1JRB-A03 (33_640027)	VH CDR1 PRT
294	ZZ1JRB-A03 (33_640027)	VH CDR2 PRT
295	ZZ1JRB-A03 (33_640027)	VH CDR3 PRT
296	ZZ1JRB-A03 (33_640027)	VL DNA
297	ZZ1JRB-A03 (33_640027)	VL PRT
298	ZZ1JRB-A03 (33_640027)	VL CDR1 PRT
299	ZZ1JRB-A03 (33_640027)	VL CDR2 PRT
300	ZZ1JRB-A03 (33_640027)	VL CDR3 PRT
301	ZZ1F7Q-D10 (33_640050)	VH DNA
302	ZZ1F7Q-D10 (33_640050)	VH PRT
303	ZZ1F7Q-D10 (33_640050)	VH CDR1 PRT
304	ZZ1F7Q-D10 (33_640050)	VH CDR2 PRT
305	ZZ1F7Q-D10 (33_640050)	VH CDR3 PRT
306	ZZ1F7Q-D10 (33_640050)	VL DNA
307	ZZ1F7Q-D10 (33_640050)	VL PRT
308	ZZ1F7Q-D10 (33_640050)	VL CDR1 PRT
309	ZZ1F7Q-D10 (33_640050)	VL CDR2 PRT
310	ZZ1F7Q-D10 (33_640050)	VL CDR3 PRT
311	ZZ1F7P-E01 (33_640047)	VH DNA
312	ZZ1F7P-E01 (33_640047)	VH PRT
313	ZZ1F7P-E01 (33_640047)	VH CDR1 PRT
314	ZZ1F7P-E01 (33_640047)	VH CDR2 PRT
315	ZZ1F7P-E01 (33_640047)	VH CDR3 PRT
316	ZZ1F7P-E01 (33_640047)	VL DNA
317	ZZ1F7P-E01 (33_640047)	VL PRT
318	ZZ1F7P-E01 (33_640047)	VL CDR1 PRT
319	ZZ1F7P-E01 (33_640047)	VL CDR2 PRT
320	ZZ1F7P-E01 (33_640047)	VL CDR3 PRT
321	ZZ1IV4-H06 (33_640166)	VH DNA
322	ZZ1IV4-H06 (33_640166)	VH PRT

323	ZZ1IV4-H06 (33_640166)	VH CDR1 PRT
324	ZZ1IV4-H06 (33_640166)	VH CDR2 PRT
325	ZZ1IV4-H06 (33_640166)	VH CDR3 PRT
326	ZZ1IV4-H06 (33_640166)	VL DNA
327	ZZ1IV4-H06 (33_640166)	VL PRT
328	ZZ1IV4-H06 (33_640166)	VL CDR1 PRT
329	ZZ1IV4-H06 (33_640166)	VL CDR2 PRT
330	ZZ1IV4-H06 (33_640166)	VL CDR3 PRT
331	ZZ1IV4-G09 (33_640169)	VH DNA
332	ZZ1IV4-G09 (33_640169)	VH PRT
333	ZZ1IV4-G09 (33_640169)	VH CDR1 PRT
334	ZZ1IV4-G09 (33_640169)	VH CDR2 PRT
335	ZZ1IV4-G09 (33_640169)	VH CDR3 PRT
336	ZZ1IV4-G09 (33_640169)	VL DNA
337	ZZ1IV4-G09 (33_640169)	VL PRT
338	ZZ1IV4-G09 (33_640169)	VL CDR1 PRT
339	ZZ1IV4-G09 (33_640169)	VL CDR2 PRT
340	ZZ1IV4-G09 (33_640169)	VL CDR3 PRT
341	ZZ1K7Q-B11 (33_640170)	VH DNA
342	ZZ1K7Q-B11 (33_640170)	VH PRT
343	ZZ1K7Q-B11 (33_640170)	VH CDR1 PRT
344	ZZ1K7Q-B11 (33_640170)	VH CDR2 PRT
345	ZZ1K7Q-B11 (33_640170)	VH CDR3 PRT
346	ZZ1K7Q-B11 (33_640170)	VL DNA
347	ZZ1K7Q-B11 (33_640170)	VL PRT
348	ZZ1K7Q-B11 (33_640170)	VL CDR1 PRT
349	ZZ1K7Q-B11 (33_640170)	VL CDR2 PRT
350	ZZ1K7Q-B11 (33_640170)	VL CDR3 PRT
351	ZZ1KAD-C04 (33_640036)	VH DNA
352	ZZ1KAD-C04 (33_640036)	VH PRT

353	ZZ1KAD-C04 (33_640036)	VH CDR1 PRT
354	ZZ1KAD-C04 (33_640036)	VH CDR2 PRT
355	ZZ1KAD-C04 (33_640036)	VH CDR3 PRT
356	ZZ1KAD-C04 (33_640036)	VL DNA
357	ZZ1KAD-C04 (33_640036)	VL PRT
358	ZZ1KAD-C04 (33_640036)	VL CDR1 PRT
359	ZZ1KAD-C04 (33_640036)	VL CDR2 PRT
360	ZZ1KAD-C04 (33_640036)	VL CDR3 PRT
361	33_640117	VH DNA
362	33_640117	VH PRT
363	33_640117	VH CDR1 PRT
364	33_640117	VH CDR2 PRT
365	33_640117	VH CDR3 PRT
366	33_640117	VL DNA
367	33_640117	VL PRT
368	33_640117	VL CDR1 PRT
369	33_640117	VL CDR2 PRT
370	33_640117	VL CDR3 PRT
371	ZZ1JLT-F06 (33_640076)	VH DNA
372	ZZ1JLT-F06 (33_640076)	VH PRT
373	ZZ1JLT-F06 (33_640076)	VH CDR1 PRT
374	ZZ1JLT-F06 (33_640076)	VH CDR2 PRT
375	ZZ1JLT-F06 (33_640076)	VH CDR3 PRT
376	ZZ1JLT-F06 (33_640076)	VL DNA
377	ZZ1JLT-F06 (33_640076)	VL PRT
378	ZZ1JLT-F06 (33_640076)	VL CDR1 PRT
379	ZZ1JLT-F06 (33_640076)	VL CDR2 PRT
380	ZZ1JLT-F06 (33_640076)	VL CDR3 PRT
381	ZZ1JMB-H05 (33_640081)	VH DNA
382	ZZ1JMB-H05 (33_640081)	VH PRT

383	ZZ1JMB-H05 (33_640081)	VH CDR1 PRT
384	ZZ1JMB-H05 (33_640081)	VH CDR2 PRT
385	ZZ1JMB-H05 (33_640081)	VH CDR3 PRT
386	ZZ1JMB-H05 (33_640081)	VL DNA
387	ZZ1JMB-H05 (33_640081)	VL PRT
388	ZZ1JMB-H05 (33_640081)	VL CDR1 PRT
389	ZZ1JMB-H05 (33_640081)	VL CDR2 PRT
390	ZZ1JMB-H05 (33_640081)	VL CDR3 PRT
391	ZZ1JMA-B04 (33_640082)	VH DNA
392	ZZ1JMA-B04 (33_640082)	VH PRT
393	ZZ1JMA-B04 (33_640082)	VH CDR1 PRT
394	ZZ1JMA-B04 (33_640082)	VH CDR2 PRT
395	ZZ1JMA-B04 (33_640082)	VH CDR3 PRT
396	ZZ1JMA-B04 (33_640082)	VL DNA
397	ZZ1JMA-B04 (33_640082)	VL PRT
398	ZZ1JMA-B04 (33_640082)	VL CDR1 PRT
399	ZZ1JMA-B04 (33_640082)	VL CDR2 PRT
400	ZZ1JMA-B04 (33_640082)	VL CDR3 PRT
401	ZZ1JLR-D06 (33_640084)	VH DNA
402	ZZ1JLR-D06 (33_640084)	VH PRT
403	ZZ1JLR-D06 (33_640084)	VH CDR1 PRT
404	ZZ1JLR-D06 (33_640084)	VH CDR2 PRT
405	ZZ1JLR-D06 (33_640084)	VH CDR3 PRT
406	ZZ1JLR-D06 (33_640084)	VL DNA
407	ZZ1JLR-D06 (33_640084)	VL PRT
408	ZZ1JLR-D06 (33_640084)	VL CDR1 PRT
409	ZZ1JLR-D06 (33_640084)	VL CDR2 PRT
410	ZZ1JLR-D06 (33_640084)	VL CDR3 PRT
411	ZZ1JMC-H09 (33_640086)	VH DNA
412	ZZ1JMC-H09 (33_640086)	VH PRT

413	ZZ1JMC-H09 (33_640086)	VH CDR1 PRT
414	ZZ1JMC-H09 (33_640086)	VH CDR2 PRT
415	ZZ1JMC-H09 (33_640086)	VH CDR3 PRT
416	ZZ1JMC-H09 (33_640086)	VL DNA
417	ZZ1JMC-H09 (33_640086)	VL PRT
418	ZZ1JMC-H09 (33_640086)	VL CDR1 PRT
419	ZZ1JMC-H09 (33_640086)	VL CDR2 PRT
420	ZZ1JMC-H09 (33_640086)	VL CDR3 PRT
421	ZZ1JMF-G02 (33_640087)	VH DNA
422	ZZ1JMF-G02 (33_640087)	VH PRT
423	ZZ1JMF-G02 (33_640087)	VH CDR1 PRT
424	ZZ1JMF-G02 (33_640087)	VH CDR2 PRT
425	ZZ1JMF-G02 (33_640087)	VH CDR3 PRT
426	ZZ1JMF-G02 (33_640087)	VL DNA
427	ZZ1JMF-G02 (33_640087)	VL PRT
428	ZZ1JMF-G02 (33_640087)	VL CDR1 PRT
429	ZZ1JMF-G02 (33_640087)	VL CDR2 PRT
430	ZZ1JMF-G02 (33_640087)	VL CDR3 PRT
431	33_640076_1	VH DNA
432	33_640076_1	VH PRT
433	33_640076_1	VH CDR1 PRT
434	33_640076_1	VH CDR2 PRT
435	33_640076_1	VH CDR3 PRT
436	33_640076_1	VL DNA
437	33_640076_1	VL PRT
438	33_640076_1	VL CDR1 PRT
439	33_640076_1	VL CDR2 PRT
440	33_640076_1	VL CDR3 PRT
441	33_640081_A	VH DNA
442	33_640081_A	VH PRT

443	33_640081_A	VH CDR1 PRT
444	33_640081_A	VH CDR2 PRT
445	33_640081_A	VH CDR3 PRT
446	33_640081_A	VL DNA
447	33_640081_A	VL PRT
448	33_640081_A	VL CDR1 PRT
449	33_640081_A	VL CDR2 PRT
450	33_640081_A	VL CDR3 PRT
451	33_640082_2	VH DNA
452	33_640082_2	VH PRT
453	33_640082_2	VH CDR1 PRT
454	33_640082_2	VH CDR2 PRT
455	33_640082_2	VH CDR3 PRT
456	33_640082_2	VL DNA
457	33_640082_2	VL PRT
458	33_640082_2	VL CDR1 PRT
459	33_640082_2	VL CDR2 PRT
460	33_640082_2	VL CDR3 PRT
461	33_640084_2	VH DNA
462	33_640084_2	VH PRT
463	33_640084_2	VH CDR1 PRT
464	33_640084_2	VH CDR2 PRT
465	33_640084_2	VH CDR3 PRT
466	33_640084_2	VL DNA
467	33_640084_2	VL PRT
468	33_640084_2	VL CDR1 PRT
469	33_640084_2	VL CDR2 PRT
470	33_640084_2	VL CDR3 PRT
471	33_640086_2	VH DNA
472	33_640086_2	VH PRT

473	33_640086_2	VH CDR1 PRT
474	33_640086_2	VH CDR2 PRT
475	33_640086_2	VH CDR3 PRT
476	33_640086_2	VL DNA
477	33_640086_2	VL PRT
478	33_640086_2	VL CDR1 PRT
479	33_640086_2	VL CDR2 PRT
480	33_640086_2	VL CDR3 PRT
481	33_640087_2	VH DNA
482	33_640087_2	VH PRT
483	33_640087_2	VH CDR1 PRT
484	33_640087_2	VH CDR2 PRT
485	33_640087_2	VH CDR3 PRT
486	33_640087_2	VL DNA
487	33_640087_2	VL PRT
488	33_640087_2	VL CDR1 PRT
489	33_640087_2	VL CDR2 PRT
490	33_640087_2	VL CDR3 PRT
491	33_640076_4	VH DNA
492	33_640076_4	VH PRT
493	33_640076_4	VH CDR1 PRT
494	33_640076_4	VH CDR2 PRT
495	33_640076_4	VH CDR3 PRT
496	33_640076_4	VL DNA
497	33_640076_4	VL PRT
498	33_640076_4	VL CDR1 PRT
499	33_640076_4	VL CDR2 PRT
500	33_640076_4	VL CDR3 PRT
501	33_640082_4	VH DNA
502	33_640082_4	VH PRT

503	33_640082_4	VH CDR1 PRT
504	33_640082_4	VH CDR2 PRT
505	33_640082_4	VH CDR3 PRT
506	33_640082_4	VL DNA
507	33_640082_4	VL PRT
508	33_640082_4	VL CDR1 PRT
509	33_640082_4	VL CDR2 PRT
510	33_640082_4	VL CDR3 PRT
511	33_640082_6	VH DNA
512	33_640082_6	VH PRT
513	33_640082_6	VH CDR1 PRT
514	33_640082_6	VH CDR2 PRT
515	33_640082_6	VH CDR3 PRT
516	33_640082_6	VL DNA
517	33_640082_6	VL PRT
518	33_640082_6	VL CDR1 PRT
519	33_640082_6	VL CDR2 PRT
520	33_640082_6	VL CDR3 PRT
521	33_640082_7	VH DNA
522	33_640082_7	VH PRT
523	33_640082_7	VH CDR1 PRT
524	33_640082_7	VH CDR2 PRT
525	33_640082_7	VH CDR3 PRT
526	33_640082_7	VL DNA
527	33_640082_7	VL PRT
528	33_640082_7	VL CDR1 PRT
529	33_640082_7	VL CDR2 PRT
530	33_640082_7	VL CDR3 PRT
531	33_640086_6	VH DNA
532	33_640086_6	VH PRT

533	33_640086_6	VH CDR1 PRT
534	33_640086_6	VH CDR2 PRT
535	33_640086_6	VH CDR3 PRT
536	33_640086_6	VL DNA
537	33_640086_6	VL PRT
538	33_640086_6	VL CDR1 PRT
539	33_640086_6	VL CDR2 PRT
540	33_640086_6	VL CDR3 PRT
541	33_640087_7	VH DNA
542	33_640087_7	VH PRT
543	33_640087_7	VH CDR1 PRT
544	33_640087_7	VH CDR2 PRT
545	33_640087_7	VH CDR3 PRT
546	33_640087_7	VL DNA
547	33_640087_7	VL PRT
548	33_640087_7	VL CDR1 PRT
549	33_640087_7	VL CDR2 PRT
550	33_640087_7	VL CDR3 PRT
551	ZZ1JMY-H09 (33_640201)	VH DNA
552	ZZ1JMY-H09 (33_640201)	VH PRT
553	ZZ1JMY-H09 (33_640201)	VH CDR1 PRT
554	ZZ1JMY-H09 (33_640201)	VH CDR2 PRT
555	ZZ1JMY-H09 (33_640201)	VH CDR3 PRT
556	ZZ1JMY-H09 (33_640201)	VL DNA
557	ZZ1JMY-H09 (33_640201)	VL PRT
558	ZZ1JMY-H09 (33_640201)	VL CDR1 PRT
559	ZZ1JMY-H09 (33_640201)	VL CDR2 PRT
560	ZZ1JMY-H09 (33_640201)	VL CDR3 PRT
561	ZZ1M37-E06 (33_640237)	VH DNA
562	ZZ1M37-E06 (33_640237)	VH PRT

563	ZZ1M37-E06 (33_640237)	VH CDR1 PRT
564	ZZ1M37-E06 (33_640237)	VH CDR2 PRT
565	ZZ1M37-E06 (33_640237)	VH CDR3 PRT
566	ZZ1M37-E06 (33_640237)	VL DNA
567	ZZ1M37-E06 (33_640237)	VL PRT
568	ZZ1M37-E06 (33_640237)	VL CDR1 PRT
569	ZZ1M37-E06 (33_640237)	VL CDR2 PRT
570	ZZ1M37-E06 (33_640237)	VL CDR3 PRT
571	33_640201_2	VH DNA
572	33_640201_2	VH PRT
573	33_640201_2	VH CDR1 PRT
574	33_640201_2	VH CDR2 PRT
575	33_640201_2	VH CDR3 PRT
576	33_640201_2	VL DNA
577	33_640201_2	VL PRT
578	33_640201_2	VL CDR1 PRT
579	33_640201_2	VL CDR2 PRT
580	33_640201_2	VL CDR3 PRT
581	33_640237_2	VH DNA
582	33_640237_2	VH PRT
583	33_640237_2	VH CDR1 PRT
584	33_640237_2	VH CDR2 PRT
585	33_640237_2	VH CDR3 PRT
586	33_640237_2	VL DNA
587	33_640237_2	VL PRT
588	33_640237_2	VL CDR1 PRT
589	33_640237_2	VL CDR2 PRT
590	33_640237_2	VL CDR3 PRT
591	33_640076_4B	VH DNA
592	33_640076_4B	VH PRT

593	33_640076_4B	VL DNA
594	33_640076_4B	VL PRT
595	33_640081_AB	VH DNA
596	33_640081_AB	VH PRT
597	33_640081_AB	VL DNA
598	33_640081_AB	VL PRT
599	33_640082_6B	VH DNA
600	33_640082_6B	VH PRT
601	33_640082_6B	VL DNA
602	33_640082_6B	VL PRT
603	33_640082_7B	VH DNA
604	33_640082_7B	VH PRT
605	33_640082_7B	VL DNA
606	33_640082_7B	VL PRT
607	33_640084_2B	VH DNA
608	33_640084_2B	VH PRT
609	33_640084_2B	VL DNA
610	33_640084_2B	VL PRT
611	33_640086_6B	VH DNA
612	33_640086_6B	VH PRT
613	33_640086_6B	VL DNA
614	33_640086_6B	VL PRT
615	33_640087_7B	VH DNA
616	33_640087_7B	VH PRT
617	33_640087_7B	VL DNA
618	33_640087_7B	VL PRT
619	33_640201_2B	VH DNA
620	33_640201_2B	VH PRT
621	33_640201_2B	VL DNA
622	33_640201_2B	VL PRT

623	33_640237_2B	VH DNA
624	33_640237_2B	VH PRT
625	33_640237_2B	VL DNA
626	33_640237_2B	VL PRT
627	IL-33_FH humana madura	a.a. 112-270 PRT
628	IL-33_FH de ratón madura	a.a. 109-266 PRT
629	IL-33 de cinomolgo madura	a.a. 112-270 PRT
630	ECD de ST2 humano-Fc/His6	a.a. 1-328 PRT
631	ECD de ST2 de ratón-Fc/His6	a.a. 1-332 PRT
632	IL33-01	a.a. 112-270 PRT
633	IL-33 humana madura TEV 6His	a.a. 112-270 PRT
634	IL33-02	a.a. 112-270 PRT
635	IL33-03	a.a. 112-270 PRT
636	IL33-04	a.a. 112-270 PRT
637	IL33-05	a.a. 112-270 PRT
638	IL33-06	a.a. 112-270 PRT
639	IL33-07	a.a. 112-270 PRT
640	IL33-08	a.a. 112-270

		PRT
641	IL33-09	a.a. 112-270 PRT
642	IL33-10	a.a. 112-270 PRT
643	IL33-11	a.a. 112-270 PRT
644	IL33-12	a.a. 112-270 PRT
645	IL33-13	a.a. 112-270 PRT
646	IL33-14	a.a. 112-270 PRT
647	IL33-15	a.a. 112-270 PRT
648	IL33-16	a.a. 112-270 PRT
649	IL-33 de cinomolgo 10His marcador Avi	a.a. 112-270 PRT
650	ECD de ST2 humana-Flag-His10	a.a. 1-328 PRT

EJEMPLOS

Ejemplo 1 Aislamiento de anticuerpos para IL-33

Clonación, expresión y purificación de IL-33 madura de ser humano, de ratón y de mono cinomolgo

Se obtuvieron las secuencias de proteína para IL-1RAcP y ST2 de Swiss Prot. Aislamiento e identificación de anticuerpos scFv anti-IL-33; se sintetizaron y clonaron moléculas de ADNc que codifican el componente maduro de IL-33 mediante PCR de extensión de cebadores y se clonaron e pJexpress404 (DNA 2.0). Los números de referencia

correspondientes a la información de bases de datos de secuencias para IL-33 humana y de ratón se muestran en la **Tabla 2**. No había disponibles secuencias de mono cinomolgo, por lo que basándose en la alta homología entre el mono cinomolgo y el mono rhesus, se usó la secuencia de mono rhesus (N.° de Referencia ENSMMUT00000030043) para diseñar cebadores capaces de amplificar la secuencia codificante del gen de IL-33 en mono cinomolgo. La secuencia génica de rhesus se alineó con la secuencia de ADNc de IL-33 humana (N.° de Referencia NM_033439), demostrándose con esto que la secuencia de rhesus se ensambló mal y le faltaba el exón 1. Se llevó a cabo una búsqueda BLAST frente a la secuencia genómica de rhesus usando el exón 1 humano y se identificó la secuencia de rhesus que coincidía con el exón 1. Se diseñaron cebadores adicionales para amplificar el exón 1.

Se modificó la secuencia codificante de IL-33 madura para que contuviese un marcador epitópico de 10xhis FLAG® (DYKDDDDKAAHHHHHHHHHH; SEQ ID NO. 627) en el extremo C-terminal de la proteína. Las SEQ ID NO correspondientes a IL-33 humana, de cinomolgo y de ratón madura marcada con Flag®His se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Secuencias para IL-33 madura humana, de ratón y de mono cinomolgo

Especie	**Aminoácidos**	**N.° de Referencia (Swiss-Prot)**	**Marcado con Flag®His Secuencias de IL-33**
Ser humano	112-270	O95760	SEQ ID NO. 627
Ratón	109-266	Q8BVZ5	SEQ ID NO. 628
Cinomolgo	112-270	No disponible	SEQ ID NO. 629

Los vectores se transformaron en células BL21(DE3) competentes (Merck Biosciences, 69450) y se indujo la expresión con IPTG 1mM. Las células recogidas se lisaron con Bugbuster (Merck Biosciences, 70584) y la proteína expresada se purificó usando cromatografía de afinidad de Ni-NTA (columna Histrap HP: GE Healthcare, 17-5248-02) seguido de cromatografía de exclusión por tamaños (columna Superdex 75: GE Healthcare, 17-1068-01).

Modificaciones de proteínas

Las IgG y las proteínas receptoras modificadas usadas en el presente documento se biotinilaron mediante aminas libres usando Sulfo-NHS-LC-Biotina EZ link (Thermo/Pierce, 21335). El reactivo de biotina se disolvió en dimetilformamida anhidra y las soluciones de proteína a base de PBS se ajustaron a pH ~8 con $NaHCO_3$ 1 M en D-PBS (suero salino tamponado con fosfato de Dulbecco). Las proteínas IL-33 usadas en el presente documento se biotinilaron a través de las cisteínas libres usando Biotina-BMCC EZ link (Perbio/Pierce, producto n.º 21900). El reactivo de biotina se disolvió en dimetilformamida anhidra y soluciones de proteínas en PBS mixtas. Las incorporaciones de marcador se evaluaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF en todos los casos y los reactivos no reaccionados se eliminaron mediante intercambio de tampón usando columnas desechables Sephadex G25 equilibradas con PBS. Para la biotinilación, se determinaron las concentraciones finales de proteína mediante la absorbancia a 280 nm usando los coeficientes de extinción calculados a partir de las secuencias de aminoácidos.

Selecciones

Para las selecciones se usó una biblioteca grande de anticuerpos humanos de Fv monocatenarios (scFv), basada en los genes variables (V) de células B humanas procedentes de donantes no expuestos previamente adultos y se clonaron en un vector de fagémido basado en el fago filamentoso M13 (*Hutchings, C., "Generation of Naïve Human Antibody Libraries" in Antibody Engineering, Dubel. Berlin, Springer Laboratory Manuals: p. 93 (2001); Lloyd et al., Protein Eng. Des. Sel. 22(3):159-68 (2009)*). Se aislaron anticuerpos scFv específicos para IL-33 de la biblioteca de presentación en fagos en una serie de ciclos de selección repetidos de IL-33 recombinante humana y/o de ratón esencialmente como se describe en Vaughan *et al.* (*Nat. Biotechnol. 14*(3):309-14 (1996)). En la **Tabla 3** se muestra una lista de reactivos de IL-33 usados en el presente documento.

Tabla 3: Reactivos del ensayo de unión de ELISA

Reactivo	**Proveedor**	**Número de catálogo/denominación**	**Ensayo ELISA**
IL-33 humana	Axxora / Adipogen	AG-40B-0038	Fago / IgG
IL-33 humana	Axxora / Alexis	ALX-522-098	Fago
IL-33 humana Flag®His	Propia	PS-295	Fago / IgG
IL-33 humana	Peprotech	200-33	Fago
IL-33 de ratón	Peprotech	210-33	Fago
IL-33 de ratón	Axxora / Alexis	ALX-522-101	Fago
IL-33 de ratón Flag®His	Propia	PS-296	Fago / IgG

IL-33 de cinomolgo Flag®His	Propia	PS-368	Fago / IgG
IL-4Rα Flag®His	Propia	020629080	Fago / IgG
Insulina bovina - biotina	Sigma	I2258	Fago / IgG

En resumen, las partículas de scFv-fago se incubaron con IL-33 recombinante biotinilada en solución (biotinilada a través de las cisteínas libres usando Biotina-BMCC EZ link (Perbio/Pierce, producto n.° 21900)). Las partículas se incubaron con IL-33 recombinante biotinilada 100 nM durante 2 horas. Los scFv unidos a antígeno se capturaron posteriormente sobre perlas paramagnéticas recubiertas de estreptavidina (Dynabeads®, M-280) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El fago no unido se eliminó por lavado en una serie de ciclos de lavado usando PBS-Tween. Se eluyeron las partículas de fago retenidas sobre el antígeno, se utilizaron para infectar bacterias y se recuperaron para la siguiente ronda de selección. Normalmente, se llevaron a cabo de este modo dos o tres rondas de selección.

Identificación de moléculas de unión específicas para IL-33 mediante ELISA de fago

Se cultivó en placas de 96 pocillos un número representativo de clones individuales procedentes de los resultados de la selección después de las dos o tres rondas de selección descritas anteriormente. Los fragmentos de Fv monocatenarios se presentaron en partículas de fago y se probaron en un ensayo de unión para determinar la

reactividad cruzada y la especificidad frente a un panel de antígenos de IL-33 humana, de ratón y de cinomolgo recombinante. Se generaron muestras de sobrenadante de scFv presentados en fagos en placas de 96 pocillos profundos del modo siguiente. Se transfirieron 5 µl de cultivo de cada pocillo de una placa maestra de 96 pocillos a una placa de cultivo de pocillos profundos Greiner que contenía 500 µl de medio 2TYAG (2TY + 100 µg/ml ampicilina + glucosa al 2 %) y se incubaron durante 5 horas a 37°C, 280 rpm. Después se añadió fago auxiliar K07 M13 (diluido a 1.5 x 10^{11} ufp/ml en 2TYAG) a 100 µl/pocillo y se incubó la placa a 37°C, 150 rpm para permitir la infección. La placa se centrifugó a 3200 rpm durante 10 minutos y se retiró el sobrenadante. Se resuspendieron los sedimentos bacterianos en 500 µl / pocillo de 2TYAK (2TY + 100 µg / ml ampicilina + 50 µg / ml kanamicina) y se incubó la placa durante una noche a 25°C, 280 rpm. Por la mañana, se añadieron 500 µl de leche en polvo desnatada al 6 % (p/v) en PBS 2x a cada pocillo y se incubó la placa durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, se centrifugó la placa a 3200 rpm durante 10 minutos y los scFv presentados en fago bloqueados se usaron directamente en experimentos ELISA.

Para las determinaciones de CE50, normalmente se diluyeron las IgG purificadas 3 veces en leche seca en polvo al 3 % (p/v) en PBS (PBS-M), para dar 11 puntos de concentración. Se usaron placas de polipropileno Greiner de 96 pocillos (Greiner, 650201) para la preparación de la dilución. En general, cada dilución se preparó por duplicado. Se dejaron bloquear las diluciones de IgG en

PBS-M durante 1 hora a temperatura ambiente antes de usarlas directamente en experimentos ELISA.

Los ensayos de unión de IL-33 fueron ELISA basados en placas llevados a cabo esencialmente como se describe a continuación. La **Tabla 3** anterior muestra los antígenos usados para estos experimentos. No se usaron todos los antígenos en cada experimento, pero en todos los casos se ensayó un antígeno de IL-33 humano, uno de ratón y uno de cinomolgo. También se usaron antígenos de control relevantes (insulina bovina más IL-4Rα FLAG®His, en caso necesario) para probar respecto de la unión no específica. Con la excepción de la insulina bovina, todos los antígenos estaban biotinilados (véase la subsección 1.1 anterior) y todos se generaron usando expresión bacteriana. El método para la generación de IL-4Rα FLAG®His, que se usó como antígeno de control, se describe en el documento WO/2010/070346.

Se recubrieron placas de estreptavidina (Thermo Scientific, AB-1226) con antígeno biotinilado a 0.5µg/ml en PBS y se incubaron durante una noche a 4˚C. Las placas se lavaron 3x con PBS y se bloquearon con 300 µl/pocillo de tampón de bloqueo (PBS-M) durante 1 hora. Las placas se lavaron 1x con PBS y se añadieron muestras bloqueadas, 50 µl / pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3x con PBS-T (PBS + Tween-20 al 1 % (v/v)) y se añadieron reactivos de detección [IgG HRP anti-humano (Sigma, A0170) o anticuerpo anti-M13-HRP (Amersham, 27-9421-01) para la detección de IgG o scFv presentado en fagos, respectivamente] a diluciones 1:5000 a 50 µl/pocillo en PBS-M durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3x con PBS-T y se revelaron con TMB, 50

µl/pocillo (Sigma, T0440). La reacción se inactivó con 50 µl/pocillo de H_2SO_4 0.1M antes de leerla en un lector de placas EnVision™ o un equipo similar a 450 nm.

Se representaron curvas de respuesta a la dosis usando el programa de ajuste de curvas Prism (Graphpad) para titulaciones de IgG. Se consideró que los scFv presentados en fagos se unían al antígeno IL-33 en caso de que la absorbancia a 450 nm fuese > 0.5 y < 0.2 para la misma muestra en los controles (insulina e IL-4Rα Flag®His).

Clonación, expresión y purificación de ECD de ST2 de humano y ratón

Se sintetizaron moléculas de ADNc que codificaban los dominios extracelulares (ECD) de ST2 de ser humano y ratón mediante clonación por PCR de extensión de cebador y se clonaron en pDONR221 (Invitrogen, 12536-017). Se usaron secuencias de base de datos para ST2 humano y de ratón (véase la **Tabla 4**). Los clones de ADNc de ECD de ST2 en pDONR221 se transfirieron al vector de expresión en mamífero pDEST12.2 usando la enzima LR Gateway Clonasa II según las instrucciones del fabricante. El vector pDEST12.2 se había modificado para que contuviese la región codificante de Fc de IgG1 humana, marcador de polihistidina (His6) en fase con el gen insertado de interés y también mediante la inserción del origen de replicación oriP del vector pCEP4, permitiendo la replicación episómica del plásmido tras su transfección en líneas celulares que expresan el producto génico de EBNA-1 (tales como células HEK293-EBNA).

Tabla 4. Aminoácidos y números de referencia para el dominio extracelular de ST2 humano y de ratón

Especie	Aminoácidos	Número de acceso	Secuencias

		(Swiss-Prot)	**de ECD-Fc-His6**
Ser humano	1-328	Q01638	SEQ ID NO: 630
Ratón	1-332	P14719	SEQ ID NO: 631

Las proteínas ST2.Fc expresadas en sobrenadantes de HEK293-EBNA se purificaron usando cromatografía de afinidad de proteína A (columna de proteína A HiTrap (GE Healthcare, 17-0402-01)) seguida de cromatografía de exclusión por tamaños (columna Superdex 200 (GE Healthcare, 17-1069-01)).

Inhibición de la unión de IL-33 a ST2 mediante scFv no purificado

Se cultivó en placas de 96 pocillos un número representativo de clones individuales procedentes de los resultados de la selección después de las dos o tres rondas de selección descritas anteriormente. Se expresaron scFv en el periplasma bacteriano (Kipriyanov, *et al*. *J Immunol Methods 200*(1-2): 69-77 (1997)) y se exploraron respecto de su actividad inhibidora en un ensayo de unión de IL-33:ST2 basado en FRET homogéneo (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia) HTRF® (fluorescencia resuelta en tiempo homogénea, Cisbio International). En este ensayo, las muestras competían con ST2.Fc de humano o de ratón por la unión a IL-33 humana, de cinomolgo o de ratón marcada con FLAG®His.

Un ensayo HTRF® es una tecnología de ensayo homogéneo que utiliza transferencia de energía de resonancia de fluorescencia entre un fluoróforo donante y uno aceptor que se encuentran muy próximos entre sí (Mathis, et al. *Clin Chem 41*(9):1391-7 (1995)). Este tipo de ensayo se usó para

medir interacciones macromoleculares mediante el acoplamiento directo o indirecto de una de las moléculas de interés a un fluoróforo donante, criptato de europio (Eu3+), y el acoplamiento de la otra molécula de interés a un fluoróforo aceptor XL665, (una aloficocianina reticulada estable). La excitación de la molécula de criptato (a 337 nm) dio como resultado una emisión de fluorescencia a 620 nm. La energía de esta emisión se transfirió a XL665 muy cercano al criptato, dando como resultado la emisión de una fluorescencia específica de duración prolongada (a 665 nm) desde XL665. Se midieron las señales específicas del donante (a 620 nm) y del aceptor (a 665 nm), permitiendo el cálculo de la relación 665/620 nm que compensa la presencia de compuestos con color en el ensayo.

Las muestras de scFv anti-IL-33 no purificadas se ensayaron respecto de la inhibición de la unión de IL-33 marcada con FLAG®-His a ST2-Fc añadiendo 10 microlitros de cada muestra de ensayo de dilución de anticuerpo a una placa de ensayo de bajo volumen de 384 pocillos (Costar, 3676). A continuación, se preparó una solución que contenía ST2-Fc humano o de ratón 2 nM y detección de criptato de Fc anti-humano 3 nM (Cisbio International, 61HFCKLB) y se añadieron 5 microlitros de la mezcla a la placa de ensayo. Esto fue seguido de la adición de 5 microlitros de una solución que contenía IL-33 humana, de cinomolgo o de ratón marcada con FLAG®-His 1.2 nM combinada con detección de anti-FLAG® XL665 20 nM (Cisbio International, 61FG2XLB). Todas las diluciones se efectuaron en tampón de ensayo que contenía fluoruro de potasio 0.8 M (BDH 103444T) y seroalbúmina bovina al 0.1% (BSA, Sigma A9576) en PBS de Dulbecco (Invitrogen, 14190185). Las placas de ensayo se

incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de 16 horas a 4°C antes de leer la fluorescencia resuelta en tiempo a longitudes de onda de emisión de 620 nm y 665 nm usando un lector de placas EnVision (Perkin Elmer).

Los datos se analizaron calculando la relación 665/620 nm seguido de los valores de % de Delta F para cada muestra. La relación 665/620 nm se usó para corregir respecto de la interferencia de la muestra usando la ecuación 1:

$$\text{relación 665/620 nm} = \left(\frac{\text{Señal a 665 nm}}{\text{Señal a 620 nm}}\right) \text{ X 10,000}$$

El % de Delta F para cada muestra se calculó entonces usando la ecuación 2:

$$\text{Delta F (\%)} = \left(\frac{\text{relación a } \frac{665}{620}\text{nm de muestra} - \text{relación a } \frac{665}{620}\text{nm control negativo}}{\text{relación a } \frac{665}{620}\text{nm control negativo}}\right) X\ 100$$

El control negativo (unión no específica) se definió reemplazando la muestra de ensayo con IL-33 humana o de ratón no marcada 150 nM (Axxora, ALX522-098 humano, ALX-522-101 de ratón) preparada en un tampón de dilución formado por PBS de Dulbecco (Invitrogen, 14190185) que contenía seroalbúmina bovina al 0.1% (BSA, Sigma A9576).

Posteriormente, se utilizaron los valores del % de Delta F para calcular el % de unión específica tal y como se describe en la ecuación 3:

$$\text{\% de unión específica} = \left(\frac{\text{\% de Delta F de muestra} - \text{\% de Delta F de NSB}}{\text{\% de Delta F de unión total} - \text{\% de delta F de NSB}}\right) X\ 100$$

Los valores CI_{50} se determinaron usando el software GraphPad Prism mediante el ajuste de curva usando una ecuación logística de cuatro parámetros (ecuación 4).

Ecuación 4:

Y=Fondo + (Tope-Fondo)/(1+10^((LogEC50-X)*pendiente))

X es el logaritmo de la concentración.

Y es la unión específica

Y comienza en la parte inferior y va hasta la parte superior con una forma sigmoidal.

La figura 1 muestra la inhibición de la señal de FRET, producida por la unión de IL-33 humana a ST2 humano, mediante extractos periplásmicos de scFv no purificados en una exploración de un solo punto. La concentración final del extracto periplásmico fue del 50% v/v. El pocillo B04 (scFv IL330004 no purificado) muestra una "coincidencia" de ejemplo y la columna 12 contiene los pocillos de control, según se indica.

Inhibición de la unión de IL-33 a ST2 mediante scFv purificado

Los clones de Fv monocatenario que mostraron un efecto inhibidor en la interacción IL-33:ST2 en forma de extractos periplásmicos no purificados o que demostraron una reactividad cruzada entre especies y un perfil de especificidad deseable mediante los experimentos de unión a fago anteriores, se sometieron a secuenciación de ADN (Osbourn, *et al*. *Immunotechnology* *2*(3):181-96 (1996); Vaughan, *et al*. *Nat Biotechnol* *14*(3):309-14 (1996).). Los scFv únicos se expresaron nuevamente en bacterias y se purificaron por cromatografía de afinidad (como se describe en el documento WO01/66754). Las potencias de estas muestras se determinaron haciendo competir una dilución en serie de la preparación purificada contra la unión de ST2.Fc humano o de ratón a IL-33 humana, de cinomolgo o de ratón marcada con FLAG®His como se ha descrito anteriormente. Las preparaciones de scFv purificadas que eran capaces de inhibir la interacción IL-33:ST2 en mayor medida que el control negativo se seleccionaron para su

conversión a formato IgG (por ejemplo, los anticuerpos scFv IL330002, IL330004, IL330020 e IL330071).

La figura 2A: muestra la inhibición de la señal de FRET, producida por la unión de IL-33 humana a ST2 humano con concentraciones crecientes de los anticuerpos scFv para IL-33 IL330002, IL330004, IL330020 e IL330071, en donde el eje x es la concentración de anticuerpo en concentración molar y el eje y es el porcentaje de unión específica.

La figura 2B: muestra la inhibición de la señal de FRET, producida por la unión de IL-33 de mono cinomolgo a ST2 humano con concentraciones crecientes de los anticuerpos scFv para IL-33 IL330002, IL330004, IL330020 e IL330071, en donde el eje x es la concentración de anticuerpo en concentración molar y el eje y es el porcentaje de unión específica.

Identificación de anticuerpos compañeros para IL330004

Los extractos periplásmicos de scFv de aquellos clones que demostraron unión positiva a IL-33 humana mediante ELISA de fago se exploraron mediante el ensayo Octet (sistema Octet RED 384) para identificar un anticuerpo que se uniese simultáneamente a IL-33 con IL330004. Se capturaron muestras periprep en bruto sobre un biosensor NTA de níquel y se llevó a cabo la unión secuencial de IL-33 (200 nM) seguida de IL330004 (200 nM). Los biosensores se regeneraron para minimizar el uso. Los sensores se regeneraron en glicina (10 mM, pH 1.7), se neutralizaron en tampón (PBS + 1 mg/ml (0.1%) de BSA + 0.02% de Tween20) y se volvieron a cargar con NiS04 (10 mM) para reponer el níquel sobre la superficie del biosensor. Se identificaron IL330425 e IL330428 y se convirtieron al formato de anticuerpo de inmunoglobulina G1 (IgG1) completo.

Cambio de formato de scFv a IgG1

Los clones de Fv monocatenarios con propiedades deseables de los ensayos de unión IL-33:ST2, más un panel de scFv presentados en fagos con especificidades deseables mediante experimentos de unión se convirtieron al formato de anticuerpo de inmunoglobulina G1 (IgG1) completa esencialmente como se describe por Persic *et al.* (*Gene 187*(1):9-18 (1997)) con las modificaciones siguientes. Se incluyó un fragmento de OriP en los vectores de expresión para facilitar el uso con células transitorias CHO y para permitir la replicación episómica. Se clonó el dominio pesado variable (VH) en un vector (pEU1.3) que contenía los dominios constantes de cadena pesada humana y elementos reguladores para expresar la cadena pesada de IgG1 completa en células de mamífero. De manera similar, se clonó el dominio ligero variable (VL) en un vector (pEU4.4) para la expresión de los dominios constantes de cadena ligera humana (lambda) y elementos reguladores para expresar la cadena ligera de IgG completa en células de mamífero. Para obtener IgG, se transfectaron los vectores que expresan IgG de cadena pesada y ligera en células de mamífero transitorias CHO (*Daramola et al. Biotechnol Prog 30(1):132-41 (2014)*). Se expresaron las IgG y se secretaron al medio. Se filtraron las cosechas antes de la purificación, luego se purificó IgG usando cromatografía de proteína A. Se añadieron los sobrenadantes del cultivo a una columna del tamaño adecuado con proteína A cerámica (BioSepra) y se lavaron con Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 y NaCl 250 mM. Se eluyó la IgG unida de la columna utilizando citrato de sodio 0.1 M (pH 3.0) y se neutralizó mediante la adición de Tris-HCl (pH 9.0). El material eluido fue

intercambiado con buffer en PBS usando columnas Nap10 (Amersham, n.° 17-0854-02) y la concentración de IgG como se determinó espectrofotométricamente usando un coeficiente de extinción basado en la secuencia de aminoácidos de IgG (Mach *et al.*, *Anal. Biochem. 200*(1):74-80 (1992)). Se analizaron las IgG purificadas para determinar la agregación y pureza de degradación utilizando SEC-HPLC y por SDS-PAGE. Las SEQ ID NO correspondientes a las diversas regiones de los anticuerpos IL330002, IL330004, IL330020, IL330071, IL330125 e IL330126 se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Secuencias de Anticuerpos anti-IL-33

IgG1	**Secuencia VH**	**Secuencia VL**	**CDR 1, 2, 3 de VH**	**CDR 1, 2, 3 de VL**
IL330002	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 3 SEQ ID NO: 4 SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 8 SEQ ID NO: 9 SEQ ID NO: 10
IL330004	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 13 SEQ ID NO: 14 SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 18 SEQ ID NO: 19 SEQ ID NO: 20
IL330020	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 23 SEQ ID NO: 24 SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 28 SEQ ID NO: 29 SEQ ID NO: 30

IL330071	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 33 SEQ ID NO: 34 SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 38 SEQ ID NO: 39 SEQ ID NO: 40
IL330125	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 43 SEQ ID NO: 44 SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 48 SEQ ID NO: 49 SEQ ID NO: 50
IL330126	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 53 SEQ ID NO: 54 SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 58 SEQ ID NO: 59 SEQ ID NO: 60
IL330425	SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 67	SEQ ID NO: 63 SEQ ID NO: 64 SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 68 SEQ ID NO: 69 SEQ ID NO: 70
IL330428	SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 77	SEQ ID NO: 73 SEQ ID NO: 74 SEQ ID NO: 75	SEQ ID NO: 78 SEQ ID NO: 79 SEQ ID NO: 80

Inhibición de la unión de IL-33 a ST2 mediante IgG purificada

Se evaluó la capacidad de los anticuerpos anti-IL-33 para inhibir la unión de IL-33 marcada con FLAG®-His al receptor ST2 en un ensayo bioquímico de competición HTRF® (fluorescencia homogénea resuelta en tiempo, Cisbio International) cuyo principio se ha descrito anteriormente.

La actividad de las preparaciones de IgG purificada se determinaron haciendo competir una dilución en serie de la IgG purificada frente a ST2.Fc biotinilado humano o de ratón respecto de la unión a IL-33 humana, de cinomolgo o de ratón marcada con FLAG®His.

Las muestras de anticuerpo anti-IL-33 purificadas o no purificadas se ensayaron respecto de la inhibición de la unión de IL-33 marcada con FLAG®-His a ST2-Fc añadiendo 10 microlitros de cada muestra de ensayo de dilución de anticuerpo a una placa de ensayo de bajo volumen de 384 pocillos (Costar, 3676). A continuación, se preparó una solución que contenía ST2-Fc humano o de ratón biotinilado 4 nM y detección de estreptavidina XL665 20 nM (Cisbio International, 611SAXLB) y se añadieron 5 microlitros de la mezcla a la placa de ensayo. Esto fue seguido de la adición de 5 microlitros de una solución que contenía IL-33 humana, de cinomolgo o de ratón marcada con FLAG®-His 1.2 nM combinada con detección de criptato anti-FLAG® 1.72 nM (Cisbio International, 61FG2KLB). Todas las diluciones se efectuaron en tampón de ensayo formado por PBS de Dulbecco (Invitrogen, 14190185) que contenía fluoruro de potasio 0.8 M (BDH 103444T) y BSA al 0.1% (Sigma A9576). Las placas de ensayo se incubaron durante 2 hora a temperatura ambiente, seguido de 16 horas a 4°C antes de leer la fluorescencia

resuelta en tiempo a longitudes de onda de emisión de 620 nm y 665 nm usando un lector de placas EnVision (Perkin Elmer).

Los datos se analizaron del modo descrito anteriormente usando las ecuaciones 1 a 3.

El control negativo (unión no específica) se definió reemplazando la muestra de ensayo con 100 nM de ST2 no biotinilado preparado en un tampón de dilución formado por PBS de Dulbecco (Invitrogen, 14190185) que contenía seroalbúmina bovina al 0.1% (BSA, Sigma A9576).

Las potencias representativas (CI_{50}) para los anticuerpos IgG purificados IL330002, IL330004, IL330020, IL330071, IL330125 e IL330126 se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6: Resultados de CI_{50} en el ensayo de competición de IL-33 FLAG®-His/ST2-Fc

IgG	IL-33 FLAG® humana + ST2-Fc humano	IL-33 FLAG® de cinomolgo + ST2-Fc humano
IL330002	27nM	42nM
IL330004	9nM	170nM
IL330020	40nM	Sin inhibición
IL330071	59nM	375nM
IL330125	210nM	Sin inhibición
IL330126	226nM	Sin inhibición

Se demostró que todas las preparaciones de IgG purificada (es decir, IL330002, IL330004, IL330020, IL330071, IL330125 e IL330126) inhibían la interacción de IL-33 humana:ST2 humano. **La figura 3A**: muestra la inhibición de la señal de FRET, producida por la unión de IL-33 humana a ST2 humano con concentraciones crecientes de los anticuerpos IgG1 para IL-33 IL330002, IL330004,

IL330020, IL330071, IL330125 e IL330126, en donde el eje x es la concentración de anticuerpo en concentración molar y el eje y es el porcentaje de unión específica.

Las preparaciones de IgG IL330002, IL330004 e IL330071 también demostraron inhibición de la interacción IL-33 de cinomolgo:ST2 humano. **La figura 3B**: muestra la inhibición de la señal de FRET, producida por la unión de IL-33 de mono cinomolgo a ST2 humano con concentraciones crecientes de los anticuerpos IgG1 para IL-33 IL330002, IL330004, IL330020 e IL330071, IL330125 e IL330126, en donde el eje x es la concentración de anticuerpo en concentración molar y el eje y es el porcentaje de unión específica. No se detectó inhibición en el ensayo de competición de IL-33 FLAG®-His de ratón + ST2-Fc de ratón por parte de cualquiera de los anticuerpos anteriormente ensayados.

Inhibición de la señalización de NFκB en células indicadoras HeLa-ST2 mediante IgG

Se usó un ensayo indicador para evaluar la inhibición de la señalización de NFκB inducida por IL-33 mediante los anticuerpos anti-IL-33 IL330002, IL330004, IL330020, IL330071, IL330125 e IL330126, usando células HeLa co-transfectadas con ST2 y una construcción indicadora de NFκB sensible a la luciferasa. Las células se expusieron a IL-33 e presencia o ausencia de anticuerpo de ensayo y se detectó la señalización de NFκB midiendo la actividad de la luciferasa posteriormente producida. Las células HeLa que contenían la construcción indicadora de luciferasa se obtuvieron de Panomics. La secuencia de ST2 humano se clonó en un vector lentivírico de System Biosciences. Las partículas lentivíricas se generaron en células Ad293

(Stratagene) y se usaron para transducir las células indicadoras HeLa-luciferasa.

En el ensayo indicador, la estimulación del receptor ST2 con IL-33 dio como resultado la activación de la vía de señalización de NFκB y a través del promotor de NFκB, se inició la expresión de la enzima luciferasa. Después de lisar las células, se añadió un sustrato de luciferasa, que sufrió una reacción química en presencia de luciferasa para producir un producto luminiscente. Se cuantificó la cantidad de luz detectada del lisado celular usando un lector de placas Envision (PerkinElmer) y se usó como una medida directa de la señalización de NFκB mediada por IL-33.

Las células HeLa transfectadas se mantuvieron en medo que contenía higromicina B para mantener la expresión estable del receptor. Las células se expusieron a IL-33 e presencia o ausencia de anticuerpo de ensayo y se detectó la señalización de NFκB midiendo la actividad de la luciferasa posteriormente producida.

Las células HeLa transfectadas se sembraron a razón de $1x10^4$ células/pocillo (50 microlitros por pocillo) en medio de cultivo DMEM (Invitrogen, 41966) que contenía suero fetal bovino (inactivado por calor) al 10% v/v y 100 microgramos por ml de higromicina B (Invitrogen, 10687-010) en placas de 384 pocillos de paredes negras, recubiertas de poli-D-lisina (Greiner, 781946). Las placas se incubaron a 37 grados centígrados, CO_2 al 5% durante 18-24 horas y después se aspiró cuidadosamente el medio celular de los pocillos antes de añadir las muestras de ensayo.

Se prepararon diluciones en serie de las muestras mediante dilución en medio de cultivo DMEM (Invitrogen,

41966) que contenía FBS (inactivado por calor) al 10% v/v y 100 microgramos por ml de higromicina B (Invitrogen, 10687-010). Se añadieron quince microlitros de muestra de ensayo a las células por duplicado. Se diluyó IL-33 FLAG®-His a 0.6 nM en medio de cultivo DMEM (Invitrogen, 41966) que contenía FBS (inactivado por calor) al 10% v/v y 100 microgramos por ml de higromicina B (Invitrogen 10687-010) y se añadieron 15 microlitros a las células y las muestras de ensayo. Esta concentración representó el valor de CE_{50} de la respuesta de las células indicadoras a IL-33 FLAG®-His (media geométrica 0.32nM, intervalos de confianza al 95% 0.25-0.40nM, n=5). La respuesta de fondo se definió mediante la adición de 30 microlitros de medio de cultivo DMEM (Invitrogen, 41966) que contenía FBS (inactivado por calor) al 10% v/v y 100 microgramos por ml de higromicina B (Invitrogen, 10687-010). Las placas se incubaron a 37 grados centígrados, CO_2 al 5%, durante 4 horas y a temperatura ambiente durante 1 hora.

Para medir la producción de luciferasa en respuesta a la señalización de NFκB, se añadieron a la placa 30 microlitros de tampón de lisis Bright Glo® combinado con sustrato de luciferasa (Promega, E2620) y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. La luminiscencia producida como resultado de la oxidación del sustrato por la luciferasa se lee usando un lector de placas EnVision (PerkinElmer).

Posteriormente, se usaron los valores de unidades relativas de luz (URL) para calcular el % de respuesta específica, tal como se describe en la ecuación 5:

$$\text{de respuesta específica} = \left[\frac{(\text{URL de muestra} - \text{URL de fondo})}{(\text{URL totales} - \text{URL de fondo})}\right] x\ 100$$

Los valores CI_{50} se determinaron usando el software GraphPad Prism mediante el ajuste de curva usando una ecuación logística de cuatro parámetros (ecuación 4):

Se demostró que las preparaciones de IgG purificadas de los anticuerpos IL330002, IL330004, IL330020, IL330071, IL330125 e IL330126 inhiben la actividad de luciferasa impulsada por NFκB, mostrándose las potencias relativas (CI50) en la **Tabla 7.**

Tabla 7: Resultados de CI_{50} en el ensayo indicador de NFκB de HeLa transfectadas con ST2

IgG	**IL-33 humana FLAG®-His**
IL330002	226nM
IL330004	23nM
IL330020	147nM
IL330125	332nM
IL330126	245nM
IL330071	226nM

La figura 4A muestra la inhibición de la actividad de NFκB en el ensayo indicador de NFκB por los anticuerpos para IL-33 IL330002, IL330004 IL330020, IL330071, IL330125 e IL330126 en comparación con la IgG de control negativo.

Inhibición de la señalización de NFκB en HUVEC por IgG

Se evaluó la señalización de NFκB en células endoteliales de la vena umbilical (HUVEC) en respuesta a IL-33 mediante translocación nuclear de la subunidad p65/RelA de NFκB, detectada por tinción de inmunofluorescencia. La obtención de imágenes y la cuantificación de la intensidad de tinción nuclear se llevó a cabo en un lector ArrayScan VTi HCS (Cellomics).

Las HUVEC se obtuvieron de Cambrex y se mantuvieron en medio EBM-2 completo (Lonza) según el protocolo recomendado. Las HUVEC se recogieron de los matraces con acutasa (PAA, n.º L11-007) y se sembraron a razón de $1x10^4$/100µl/pocillo en medio de cultivo [EBM-2 (Lonza, n.º CC-3156) con el kit complementario EGM-2 SingleQuot y factores de crecimiento (Lonza, n.º CC-4176)] en placas de 96 pocillos de paredes negras y fondo plano transparente recubiertas con colágeno I (Greiner) y se incubaron a 37ºC, CO_2 al 5% durante 18-24 horas. Pasado este tiempo, se aspiró el medio dejando intacta la monocapa de células y se reemplazó con muestras de prueba de los ensayos preparadas anteriormente.

Las muestras de ensayo de IgG purificada (por duplicado) se diluyeron hasta la concentración deseada en medio de cultivo completo en placas de polipropileno de fondo en U de 96 pocillos (Greiner, 650201). La IL-33 (Adipogen) se preparó en medio de cultivo completo mezclada con el anticuerpo de ensayo adecuado para dar una concentración final de IL-33 de 1ng/ml en un volumen total de 120µl/pocillo. Todas las muestras se incubaron durante 30 min a 37ºC, antes de transferir 100µl de mezcla de IL-33 / anticuerpo a la placa de ensayo. Después de una incubación de 30 minutos a 37ºC, se aspiraron los medios, dejando intacta la monocapa de células y se fijaron las células durante 15 minutos con solución de formaldehído al 3.7% que se había precalentado a 37ºC. El fijativo se aspiró y se lavaron las células dos veces con 100µL/pocillo de PBS.

Las células se tiñeron para NFκB usando un kit de ensayo para NFκB Cellomics (Thermo Scientific, n.º 8400492)

según las instrucciones del fabricante. En resumen, se permeabilizaron las células durante 15 minutos a temperatura ambiente, se bloquearon durante 15 minutos y se tiñeron durante 1 hora con solución de anticuerpo primario en un volumen de 50µl. Las placas se lavaron 2 x en tampón de bloqueo y se tiñeron durante 1 hora a temperatura ambiente con solución de anticuerpo secundario, que incluía tinción nuclear de Hoechst así como anticuerpo secundario. Las células se lavaron 2 x en PBS. Las células se almacenaron en un volumen final de 150µl/pocillo de PBS y se cubrieron con un sello ligero de bloqueo negro (Perkin Elmer, n.° 6005189) antes de leerlas en un lector ArrayScan VTi HCS. La intensidad de la tinción nuclear se calculó usando un algoritmo adecuado. Los datos se analizaron usando el programa informático Graphpad Prism. Los valores de CI_{50} se determinaron ajustando la curva usando una ecuación logística de cuatro parámetros (ecuación 4).

La figura 4B muestra la inhibición de la actividad de NFκB en el ensayo de translocación de NFκB en HUVEC mediante el anticuerpo para IL-33 IL330004 en comparación con el anticuerpo de control de IgG1 Anti-NIP, NIP228. La translocación nuclear de p65/RelA NFκB se inhibió mediante el anticuerpo IL330004. Cuando se ensayó en formato de IgG purificada, se calculó que la CI50 para el anticuerpo IL330004 era de 12 nM.

Cálculo de la afinidad de unión para anticuerpos para IL-33 usando BIAcore

Se determinó la afinidad de unión de las muestras de IgG purificadas de los miembros de unión ejemplares a IL-33 humana y de cinomolgo mediante resonancia de plasmón superficial usando un biosensor BIAcore 2000 (BIAcore AB)

esencialmente como se describe por Karlsson *et al.*, *J Immunol Methods 145*(1-2):229-40 (1991). En resumen, se acopló covalentemente proteína G' (Sigma Aldrich, P4689) a la superficie de una microplaca sensora CM5 usando reactivos de acoplamiento de amina convencionales según las instrucciones del fabricante (BIAcore). La superficie de proteína G' se usó para capturar los anticuerpos anti-IL-33 purificados a través del dominio Fc para proporcionar una densidad de superficie de aproximadamente 290UR por ciclo. La IL-33 humana o de cinomolgo preparada en tampón HBS-EP (BIAcore AB), a un intervalo de concentraciones de entre 600 nM y 18.75nM, se hizo pasar sobre la superficie de la microplaca sensora. La superficie se regeneró usando dos lavados con glicina 10mM a pH 1.7 y pH 1.5 entre cada inyección de anticuerpo. Los sensogramas resultantes se evaluaron usando el programa informático BIA Evaluation 3.1 y se ajustaron a un modelo de unión de Langmuir 1:1, para proporcionar datos de unión relativa. Los resultados de unión (KD, Ka y Kd) para la unión de los anticuerpos IL330002 e IL330004 a IL-33 humana o de cinomolgo se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8: Afinidad de unión BIAcore de miembros de unión ejemplares

Anticuerpo	**Antígeno**	**KD (nM)**	**Ka (1/Ms)**	**Kd (1/s)**
IL330002	IL-33 humana FLAG®-His	35	6.16E+04	2.18E-03
IL330002	IL-33 de cinomolgo FLAG®-His	189	2.34E+04	4.42E-03
IL330004	IL-33 humana	6	1.96E+05	1.10E-

	FLAG®-His			03
IL330004	IL-33 de cinomolgo FLAG®-His	365	1.25E+04	4.58E-03

Unión de anticuerpos para IL-33 a IL-33 intracelular

Los estudios de selección y actividad descritos anteriormente usaron fuentes recombinantes o comerciales de IL-33 madura (aminoácidos 112-270). Los estudios sugieren que la IL-33 de longitud completa también puede ser activa (Cayrol *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A 106*(22):9021-6 (2009); Hayakawa *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun 387*(1):218-22 (2009); Talabot-Ayer *et al.*, *J Biol Chem. 284*(29):19420-6 (2009)). La unión de los anticuerpos a IL-33 de longitud completa ("nativa") se determinó mediante tinción de inmunofluorescencia de células musculares lisas bronquiales primarias (BSMC).

Las BSMC se obtuvieron de Cambrex y se mantuvieron en medio de crecimiento completo de músculo liso (SmBM®, Lonza) según las instrucciones del fabricante. Las células se recogieron de los matraces con acutasa (PAA, n.° L11-007) y se sembraron a razón de $2x10^4$/100µl/pocillo en medio de cultivo [SMBM (Lonza, n.° CC-3181) con el kit complementario SMGM SingleQuot y factores de crecimiento (Lonza, n.° CC-4149)] en placas de 96 pocillos de paredes negras y fondo plano transparente recubiertas con colágeno I (Greiner) y se incubaron a 37°C, CO_2 al 5% durante 18-24 horas. Pasado este tiempo, se aspiró el medio, dejando intacta la monocapa de células y las células se fijaron durante 15 minutos con solución de formaldehído al 3.7% que se había precalentado a 37°C. El fijativo se aspiró y se lavaron las células dos veces con 100µL/pocillo de PBS. Las

células se permeabilizaron durante 15 minutos a temperatura ambiente usando tampón de permeabilización (Thermo Scientific, n.º 8400492), se lavaron 2 x en PBS y se bloquearon con 100µL/pocillo de PBS/BSA al 1% (Sigma, n.º A9576) durante 30-60 minutos a temperatura ambiente. Se sacudió el tampón de bloqueo y se reemplazó por una titulación de anticuerpos anti-IL-33 o control de isotipo adecuado, que se había diluido en tampón de bloqueo, durante 1 hora a temperatura ambiente.

Las placas se lavaron 2 x en PBS y se tiñeron durante 1 hora a temperatura ambiente con solución de anticuerpo secundario, que incluía colorante Hoechst (10mg/ml; Thermo Scientific) diluido a razón de 1:10000 así como anticuerpo secundario (IgG (H+L) anti-humano, conjugada a Alexa Fluor® 488, 2 mg/ml; Invitrogen, n.º A11013) diluido a razón de 1:1000. Las células se lavaron tres veces en PBS. Las células se almacenaron en un volumen final de 150µl/pocillo de PBS y se cubrieron con un sello ligero de bloqueo negro (Perkin Elmer, n.º 6005189) antes de obtener las imágenes en un lector ArrayScan VTi HCS.

Se confirmó la producción de IL-33 por BSMC cultivadas con un anticuerpo policlonal (R&D Systems, n.º AF3625), detectado con IgG (H+L) anti-cabra, conjugada a Alexa Fluor® 488, 2 mg/ml; Invitrogen, n.º A11055). **La figura 5** muestra la detección de IL-33 endógena en células de músculo liso bronquial mediante tinción de inmunofluorescencia mediante el anticuerpo para IL-33 IL330004 (panel derecho) en comparación con el control negativo de CAT-002 (panel izquierdo). El anticuerpo IL330004 mostró una clara tinción nuclear de BSMC, correspondiente a la localización esperada de IL-33 de

longitud completa y con aquella detectada por el pAb comercial.

Ejemplo 2 Aislamiento e identificación de los anticuerpos scFv anti-IL-33

Identificación de moléculas de unión específicas para IL-33 mediante ELISA de fago

Los reactivos y las selecciones fueron como se describen en el ejemplo 1. Se presentaron fragmentos Fv monocatenarios sobre partículas de fago y se ensayaron en forma de preparaciones no purificadas en una exploración ELISA de un solo punto. Se consideró que los scFv presentados en fagos se unían al antígeno IL-33 en caso de que la absorbancia a 450 nm fuese > 0.5 y < 0.1-0.2 para la misma muestra en los controles (insulina e IL-4Rα Flag®His).

La figura 6 muestra los datos de una sola placa explorada frente a IL-33 humana, IL-33 de cinomolgo e insulina. Se muestra una molécula de unión a IL-33 específica con reactividad cruzada para humano/cinomolgo en el pocillo C4 y los pocillos A12 y B12 contienen clon de unión a IL-33 de control.

Identificación de moléculas de unión a IL-33 mediante competición Axxora IL33305B

El ensayo de competición Axxora IL33305B es un ensayo homogéneo que utiliza tecnología de ensayo de microvolumen de fluorescencia (FMAT). El ensayo evaluó la inhibición de la unión del mAb Axxora IL33305B (Axxora/Adipogen, n.° AG-20A-0041-C050) a IL-33 humana Flag®His biotinilada recombinante en presencia de muestras de sobrenadante de scFv en bruto o de scFv e IgG en un formato de 384 pocillos.

Los scFv se expresaron en el periplasma bacteriano y se exploraron respecto de su actividad inhibidora en un ensayo de competición de epítopos FMAT frente a un mAb conocido biológicamente activo, IL33305B. La IL-33 biotinilada se inmovilizó sobre perlas recubiertas de estreptavidina (Spherotec, n.º SVP-60-5) y se detectó la interacción con el Ab Axxora IL33305B usando un anticuerpo de cabra anti-ratón marcado con Alexafluor®-647 (Molecular Probes A21236). El sistema FMAT es un dispositivo para obtención de imágenes macro confocales que mide la fluorescencia roja asociada a las perlas.

Las placas se leyeron en el lector Cellular Detection System 8200 de Applied Biosystems. El láser de excitación de helio-neón enfoca con una profundidad de 100 μm del fondo del pocillo, barriendo un área de 1mm^2. Las perlas se asientan en el fondo del pocillo y tras la excitación con el láser a 633 nm, las perlas con fluoróforo unido (donde la concentración local de fluoróforo es relativamente alta en comparación con el fluoróforo no unido) emiten una señal a 650-685 nm que se mide usando PMT1. El fluoróforo en solución no unido se encuentra fuera de la profundidad de excitación o a una concentración local relativamente baja y por lo tanto, no emite una señal significativa. Las muestras de scFv o de IgG que bloquean de manera eficaz la unión de IL33305B a IL-33 provocarán una reducción en la cantidad de complejos perla:IL-33:IL33305B:anticuerpo anti-ratón marcado con Alexafluor®-647 en el fondo del pocillo, lo que da como resultado una reducción en la fluorescencia medida.

Para la preparación del ensayo, se preparó lo siguiente:

(1) Mezcla de IL33305B y AF647 anti-ratón, IL33305B se diluyó a 2.25nM en tampón de ensayo [PBS (Gibco, 14190-094) que contenía BSA al 0.1% (Sigma, n.° A9576) y Tween-20 al 0.1% (Sigma, P2287)] y se mezcló con AF647 anti-ratón diluido a 2µg/ml (400ng/ml finales) en tampón de ensayo.

(2) Mezcla de IL-33 y perlas, se añadió IL-33 humana FLAG®His biotinilada 2.5nM a perlas de estreptavidina al 0.0095% p/v en tampón de ensayo y se incubó con rotación a temperatura ambiente durante 1 hora; antes de su uso, estas partículas se centrifugaron a 2000 rpm durante 15 minutos y se resuspendieron en el volumen original de tampón de ensayo.

(3) Preparación de la muestra, se generaron muestras de sobrenadante de scFv en bruto en placas de 96 pocillos profundos. Se transfirieron 5 µl de cultivo de cada pocillo de una placa maestra de 96 pocillos a una placa de cultivo de pocillos profundos Greiner que contenía 900 µl de medio 2TY + 100 µg/ml ampicilina + glucosa al 0.1% y se incubaron durante 5 horas a 37°C, 280 rpm. Después se añadió IPTG 10mM en TY a razón de 100 ul/pocillo y la placa se incubó durante una noche a 30°C, 280 rpm. A la mañana siguiente, se centrifugó la placa a 3200 rpm durante 15 minutos. Para la exploración de alto rendimiento, se transfirieron los sobrenadantes de scFv de la placa de pocillos profundos directamente a la placa de ensayo para lograr una concentración final del 20%.

Para las determinaciones de la CI50, los scFv purificados o las IgG se diluyeron típicamente 3 veces en tampón de ensayo, por duplicado, para dar 11 puntos de concentración. Se usaron placas de polipropileno Greiner de

96 pocillos (Greiner, 650201) para la preparación de la dilución.

En las columnas 1-22 de una placa de superficie negra no adherente de fondo transparente de 384 pocillos (Costar, n.º 3655) se añadió lo siguiente: 10 µl de muestra, 20 µl de mezcla de IL33305B / anti-ratón AF647 y 20 µl de mezcla de IL-33 / perlas. En todos los casos, el volumen total de los pocillos fue de 40 µl. Los controles usados normalmente en estos experimentos incluyeron: se añadió mezcla de IL-33 / perlas más anti-ratón AF647 (unión no específica); mezcla de IL330305B / anti-ratón AF647 más mezcla de IL-33 / perlas (unión total). Las placas se sellaron e incubaron durante cuatro horas a temperatura ambiente en la oscuridad y después se leyeron en el lector Cellular Detection System 8200 de Applied Biosystems. Los datos se analizaron con el algoritmo de velocidad, con una ventana lógica ajustada como relación de color < 0.4, tamaño < 15 y cuenta de minuto de 20. Las coincidencias de las muestras de sobrenadante de scFv en bruto se definieron por mostrar un 50 % o más de inhibición de la señal en comparación con los pocillos de control de unión total. Se representaron curvas de respuesta a la dosis usando el programa de ajuste de curvas Prism (Graphpad) para titulaciones de scFv e IgG purificadas.

Cambio de formato de scFv a IgG1

Los scFv que mostraron un perfil de reactividad cruzada entre especies y de especificidad deseable determinado mediante experimentos de unión de scFv presentados en fagos o que mostraron un efecto inhibidor en el ensayo de competición de epítopos frente a Axxora Il33305B (como se ha descrito anteriormente), se sometieron

a secuenciación de ADN (Osbourn *et al.*, *Immunotechnology 2*(3):181-96 (1996); Vaughan *et al.*, *Nat. Biotechnol. 14*(3):309-14 (1996)). En primer lugar, los scFv con propiedades deseadas se convirtieron en inmunoglobulinas G1 (IgG1) completas o al formato de anticuerpo de isotipo IgG1 TM nulas para efector (secuencia de Fc de IgG1 que incorpora las mutaciones L234F, L235E y P331S), como se describe en el ejemplo 1. Las SEQ ID NO correspondientes a las diversas regiones de los anticuerpos IL330065, IL330099, IL330101, IL330107, IL33149 e IL330180 se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Secuencias de Anticuerpos anti-IL-33

IgG1	**Secuencia VH**	**Secuencia VL**	**CDR 1, 2, 3 de VH**	**CDR 1, 2, 3 de VL**
IL330065	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 83 SEQ ID NO: 84 SEQ ID NO: 85	SEQ ID NO: 88 SEQ ID NO: 89 SEQ ID NO: 90
IL330099	SEQ ID NO: 92	SEQ ID NO: 97	SEQ ID NO: 93 SEQ ID NO: 94 SEQ ID NO: 95	SEQ ID NO: 98 SEQ ID NO: 99 SEQ ID NO: 100
IL330101	SEQ ID NO: 102	SEQ ID NO: 107	SEQ ID NO: 103 SEQ ID NO: 104 SEQ ID NO:	SEQ ID NO: 108 SEQ ID NO: 109 SEQ ID NO:

			105	110
IL330107	SEQ ID NO: 122	SEQ ID NO: 127	SEQ ID NO: 123 SEQ ID NO: 124 SEQ ID NO: 125	SEQ ID NO: 128 SEQ ID NO: 129 SEQ ID NO: 130
IL330149	SEQ ID NO: 132	SEQ ID NO: 137	SEQ ID NO: 133 SEQ ID NO: 134 SEQ ID NO: 135	SEQ ID NO: 138 SEQ ID NO: 139 SEQ ID NO: 140
IL330180	SEQ ID NO: 142	SEQ ID NO: 147	SEQ ID NO: 143 SEQ ID NO: 144 SEQ ID NO: 145	SEQ ID NO: 148 SEQ ID NO: 149 SEQ ID NO: 150

Ensayo de unión para IgG

La reactividad cruzada entre especies de los anticuerpos anti-IL-33 se determinó usando un ELISA basado en placa. Se recubrieron placas de estreptavidina (Thermo Scientific, AB-1226) con antígeno biotinilado a razón de 0.5µg/ml en PBS. La unión de las preparaciones de IgG biotinilada se detectó con anti-IgG humana HRP (Sigma, A0170). Los datos de CE50 para las curvas de unión se muestran en la **Tabla 10.**

Tabla 10: Unión de anticuerpos para IL-33 a IL-33 humana, de cinomolgo o de ratón marcada con Flag®His

Anticuerpo	**CE50 (nM)**		
	IL-33 humana Flag®-His	**IL-33 de cinomolgo Flag®His**	**IL-33 de ratón Flag®His**
IL330065	0.65	0.66	Sin unión
IL330099	0.40	0.35	0.38
IL330101	1.19	1.20	0.85
IL330107	0.86	1.09	0.83
IL330149	0.23	0.35	0.17
IL330180	No determinada*	No determinada*	No determinada*

Se determinó que IL330180 se unía a IL-33 humana pero no a IL-33 de cinomolgo o de ratón en formato scFv presentado en fagos.

Inhibición de respuestas funcionales de IL-33 por anticuerpos anti-IL-33

Inhibición de la proliferación de células TF-1 por IgG

Se usó un ensayo de viabilidad celular para evaluar la inhibición de la proliferación / supervivencia de células TF-1 inducida por IL-33 mediante anticuerpos anti-IL-33. El ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (Promega) es un método homogéneo para determinar el número de células viables en cultivo basándose en la cuantificación del ATP presente, que es señal de la presencia de células metabólicamente activas. Las células se expusieron a IL-33 en presencia o ausencia de anticuerpo de ensayo. La viabilidad celular se midió mediante

CellTiter-Glo después de 72 horas de estimulación con IL-33.

En particular, se usó el ensayo de proliferación para evaluar la inhibición de la proliferación de células TF-1 inducida por IL-33 mediante anticuerpos anti-IL-33. Las células TF-1 fueron cedidas gratuitamente por R&D Systems y se mantuvieron según las instrucciones del fabricante. El medio de ensayo comprendía RPMI-1640 con GLUTAMAX I (Invitrogen, 61870) que contenía suero bovino fetal (inactivado por calor, irradiado con gamma) al 5%, piruvato de sodio al 1% (Sigma, S8636), penicilina / estreptomicina al 1-2% (Invitrogen, 15140-122). Antes de cada ensayo, se sedimentaron las células TF-1 mediante centrifugación a 300xg durante 5 minutos, se retiró el medio por aspiración y después se resuspendieron las células en medio de ensayo. Este proceso se repitió dos veces con células resuspendidas a una concentración final de $2x10^5$ células/ml en medio de ensayo. Las soluciones de IgG (por duplicado) se titularon hasta el intervalo de concentración deseado en medio de ensayo en placas de polipropileno de fondo en U de 96 pocillos (Greiner, 650201) y se transfirieron 50µl a placas de tratadas para cultivo tisular de fondo plano de 96 pocillos (Costar, n.° 3598). Se añadió IL-33 humana recombinante (Alexis, ALX-522-098-3010) a las titulaciones adecuadas de ensayo de anticuerpo para dar un volumen total de 100µl/pocillo. Después se añadieron 100µl de suspensión de células a 100µl de IL-33 o de mezcla de IL-33 y anticuerpo para dar un volumen total de ensayo de 200µl/pocillo y un número total de 20,000 células por pocillo. Se usó una concentración final de ensayo de 100ng/ml de IL-33 en el ensayo, que se seleccionó como la

dosis que proporcionaba aproximadamente un 80% de la respuesta proliferativa máxima. Las placas se incubaron durante 72 horas a 37ºC y CO_2 al 5%. Se retiraron cuidadosamente 100µl de sobrenadante de las placas de ensayo. Se añadieron a cada pocillo 100µl de CellTiter-Glo (Promega, G7571), reconstituido de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las placas se agitaron en un agitador de placas a 500rpm durante 5 minutos y se leyó la luminiscencia en un lector de placas EnVision (PerkinElmer). Los datos se analizaron usando el programa informático Graphpad Prism. Los valores de CI50 se determinaron ajustando la curva usando una ecuación logística de cuatro parámetros.

Para aquellos anticuerpos que lograban curvas de inhibición completa, se calcularon los valores de CI50 y se resumen en la **Tabla 11** a continuación. Las preparaciones de IgG purificada fueron capaces de inhibir la proliferación de TF-1 en respuesta a IL-33. **La figura 7A** muestra el porcentaje de inhibición para IL330065 e IL330101 (en comparación con mAb de control y hST2/Fc) para el ensayo de proliferación de TF-1, en donde el eje x es la concentración de anticuerpo en concentración molar y el eje y es un porcentaje de la respuesta máxima.

Inhibición de la liberación de IL-6 en HUVEC por anticuerpos para IL-33

Se usó un ensayo de liberación de citocinas para evaluar la inhibición de la producción de IL-6 inducida por IL-33 por células endoteliales de la vea umbilical humana (HIVEC) por anticuerpos anti-IL-33. Las células se expusieron a IL-33 en presencia o ausencia de anticuerpo de ensayo.

Las HUVEC se obtuvieron de Cambrex y se mantuvieron en medio EBM-2 completo (Lonza) según el protocolo del fabricante. Las células se recogieron de los matraces con acutasa (PAA, n.º L11-007) y se sembraron a razón de $1x10^4$/100µl/pocillo en medio de cultivo (EBM-2 (Lonza, n.º CC-3156) con el kit complementario EGM-2 SingleQuot y factores de crecimiento (Lonza, n.º CC-4176)) en placas tratadas para cultivo tisular de fondo plano de 96 pocillos (Costar, n.º 3598) y se incubaron a 37ºC, CO_2 al 5% durante 18-24 horas. Pasado este tiempo, se aspiró el medio dejando intacta la monocapa de células y se reemplazó con muestras de prueba de los ensayos descritos anteriormente.

Las soluciones de ensayo de IgG purificada (por duplicado) se diluyeron hasta la concentración deseada en medio de cultivo completo en placas de polipropileno de fondo en U de 96 pocillos (Greiner, 650201). La IL-33 (Adipogen) se preparó en medio de cultivo completo mezclada con el anticuerpo de ensayo adecuado para dar una concentración final de IL-33 de 30ng/ml. Todas las muestras se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente, antes de transferir 120µl de mezcla de IL-33 / anticuerpo a la placa de ensayo. Después de 18-24 horas de incubación, se midió la IL-6 en los sobrenadantes celulares mediante ELISA (R&D Systems, DY206) adaptado para lectura de europio. Se recubrieron placas negras Fluro-Nunc Maxisorp (VWR, n.º 437111) con 50µl de anticuerpo de captura, se lavaron tres veces con PBS-Tween (0.01%) usando un lavador de placas automatizado (Biotek) y se bloquearon con 250µl/pocillo de PBS/BSA al 1% (Sigma, n.º A9576) durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron como antes y se incubaron con 50uL de sobrenadantes de ensayo celular de

mastocitos durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Después de lavado 3X con PBS-Tween, las placas se incubaron con anticuerpo de detección (50ul/pocillo) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las placas de ELISA se lavaron tres veces en PBS-Tween y se diluyó estreptavidina-europio (PerkinElmer, 1244-360) a razón de 1:1000 en tampón de ensayo DELFIA® (PerkinElmer, 4002-0010) y se añadieron a razón de 50µl/pocillo durante 45-60 minutos a temperatura ambiente. Después, se lavaron las placas 7 veces en tampón de lavado DELFIA antes de la adición de 50µl/pocillo de solución potenciadora (PerkinElmer, 4001-0010) y se analizaron usando fluorometría resuelta en tiempo (Excitación 340nM, Emisión 615nM). Los datos se analizaron usando el programa informático Graphpad Prism. Los valores de CI50 se determinaron ajustando la curva usando una ecuación logística de cuatro parámetros. Para aquellos anticuerpos que lograban curvas de inhibición completa, se calcularon los valores de CI50 y se resumen en la **Tabla 11** a continuación. Las preparaciones de IgG purificadas (IgG1 o IgG1-TM) de los anticuerpos IL330065, IL330099, IL330101, IL330107, IL330149 e IL330180 inhibieron la producción de IL-6 en comparación con los anticuerpos de control. La potencia de los miembros de unión ejemplares se vio esencialmente no afectada por la presencia de mutaciones de secuencia de Fc de IgG1-TM (L234F, L235E y P331S) y los datos mostrados combinan información para ambos formatos. **La figura 7B** muestra el porcentaje de liberación máxima de IL-6 para IL330065 e IL330101 (en comparación con ST2 humano-Fc, pAb anti-IL33 AF3625 (R&D Systems) y mAb de control), en donde el eje x es la concentración de

anticuerpo en concentración molar y el eje y es el porcentaje de la respuesta máxima.

Inhibición de la liberación de citocinas por mastocitos humanos

Se usó un ensayo de liberación de citocinas para evaluar la inhibición de la producción de IL-6 inducida por IL-33 mediante anticuerpos anti-IL-33 por mastocitos humanos. Además de IL-6, se midieron otras citocinas (IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, GM-CSF y TNFα) en sobrenadantes de cultivos usando ELISA duoset alternativos o análisis multiplexado Mesoscale Discovery.

Los mastocitos humanos se produjeron mediante diferenciación *in vitro* de células progenitoras CD133+ de sangre del cordón umbilical (Lonza, n.° 2C-108) esencialmente como se describe en Andersen *et al. (J Immunol Methods 336:*166-174 (2008)). Las células progenitoras se descongelaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se cultivaron *in vitro* en medio de expansión asérico (StemSpan, n.° 09650) complementado con penicilina / estreptomicina al 1% (Invitrogen, 15140-122) y los factores de crecimiento: 100 ng/ml de factor de células madre (Peprotech, n.° AF-300-07) y 50 ng/ml de IL-6 (Peprotech, n.° AF-200-6) durante 8 semanas. Además, se incluyó 1ng/ml de IL-3 (R&D Systems, n.° 203-IL) en el medio de cultivo durante las primeras tres semanas. Las células se mantuvieron continuamente a $<5x10^5$/ml.

Los mastocitos se cultivaron durante una noche en medio de ensayo (StemSpan, n.° 09650; penicilina/estreptomicina al 1% (Invitrogen, 15140-122) y 100ng/ml de factor de células madre (Peprotech, n.° AF-300-

07)) antes de la exposición de la IL-33 en presencia o ausencia del anticuerpo de ensayo.

Para los ensayos de liberación de citocinas, se retiraron las células, se sedimentaron (150g durante 10 minutos) y se resuspendieron en medio de ensayo(StemSpan, n.º 09650, penicilina / estreptomicina al 1% (Invitrogen, 15140-122) y 100ng/ml de factor de células madre (Peprotech, n.º AF-300-07)). Las células se retornaron a un matraz y se cultivaron durante 18-24 horas antes de comenzar el ensayo. Para la evaluación de las muestras, las soluciones de IgG (por duplicado) se titularon hasta el intervalo de concentración deseado en medio de ensayo en placas de polipropileno de fondo en U de 96 pocillos (Greiner, 650201) y se transfirieron 50µl de soluciones de ensayo a placas de tratadas para cultivo tisular de fondo plano de 96 pocillos (Costar, n.º 3598). Se añadieron 50µl de IL-33 humana recombinante (Adipogen, n.º 522-098-3010) diluida en medio de ensayo a 90ng/ml, a las titulaciones adecuadas de ensayo de anticuerpo para dar un volumen total de 100µl/pocillo. Después se añadieron 50µl de suspensión de células ($1.5x10^5$) a 100µl de IL-33 o de mezcla de IL-33 y anticuerpo para dar un volumen total de ensayo de 150µl/pocillo y un número total de $5x10^4$ células por pocillo. Se usó una concentración final de ensayo de 30ng/ml de IL-33 en el ensayo, seleccionada como la dosis que proporcionaba aproximadamente un 50-80% de la respuesta de citocinas máxima. Las placas se incubaron durante 18-24 horas a 37ºC y CO_2 al 5%.

Se midió la IL-6 en los sobrenadantes celulares mediante ELISA (R&D Systems, DY206) adaptado para lectura de europio. Se recubrieron placas negras Fluro-Nunc

Maxisorp (VWR, n.° 437111) con 50µl de anticuerpo de captura, se lavaron tres veces con PBS-Tween (0.01%) usando un lavador de placas automatizado (Biotek) y se bloquearon con 250µl/pocillo de PBS/BSA al 1% (Sigma, n.° A9576) durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron como antes y se incubaron con 50µL de sobrenadantes de ensayo celular de mastocitos durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Después de lavado 3X con PBS-Tween, las placas se incubaron con anticuerpo de detección (50µl/pocillo) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las placas de ELISA se lavaron tres veces en PBS-Tween y se diluyó estreptavidina-europio (PerkinElmer, 1244-360) a razón de 1:1000 en tampón de ensayo DELFIA (PerkinElmer, 4002-0010) y se añadieron a razón de 50µl/pocillo durante 45-60 minutos a temperatura ambiente. Después, se lavaron las placas 7 veces en tampón de lavado DELFIA antes de la adición de 50µl/pocillo de solución potenciadora (PerkinElmer, 4001-0010) y se analizaron usando fluorometría resuelta en tiempo (Excitación 340nM, Emisión 615nM). Los datos se analizaron usando el programa informático Graphpad Prism. Los valores de CI50 se determinaron ajustando la curva usando una ecuación logística de cuatro parámetros.

La figura 8A muestra la reducción de la producción de IL-6 por concentraciones crecientes de los anticuerpos IL330065, IL330099, IL330101, IL330107, IL33149 e IL330180, en donde el eje x es la concentración de anticuerpo en concentración molar y el eje y es el % de respuesta máxima. Las preparaciones de IgG purificada de los anticuerpos de ensayo fueron capaces de inhibir la actividad de IL-6 en comparación con los anticuerpos de control. La potencia de

los miembros de unión ejemplares se vio esencialmente no afectada por la presencia de mutaciones de secuencia de Fc de IgG1-TM (L234F, L235E y P331S) y los datos combinan información para ambos formatos. Los resultados de CI50 para el ensayo de proliferación de TF-1, la producción de IL-6 por HUVEC y la producción de IL-6 por mastocitos se muestran en la **Tabla 11.**

Tabla 11. Potencias ejemplares de clones identificados a partir de bibliotecas de presentación en fagos de scFv de humanos no expuestos previamente

Anticuerpo	**Media geométrica (IC del 95%) de la CI50 (nM) de IgG1**		
	Proliferación de TF-1	**Producción de IL-6 por HUVEC**	**Producción de IL-6 por mastocitos**
IL330065	81 (19-345)	87 (60-129)	12 (4-40)
IL330099	Curva incompleta	Curva incompleta	1221 (n=1)
IL330101	149 (n=1)	497 (167-1474)	49 (31-75)
IL330107	94 (n=1)	Curva incompleta	283 (154-522)
IL330149	Curva incompleta	Curva incompleta	298 (n=2)
IL330180	No determinado	No determinado	22 (n=1)

Se detectaron citocinas adicionales (IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13 y GM-CSF) en sobrenadantes celulares usando el ensayo de citocinas humanas Diagnostics Demonstration 10-plex de Meso-Scale (n.° K15002B-1) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las citocinas se midieron en sobrenadantes celulares mediante ELISA adaptado a la

lectura de europio usando un protocolo similar al ELISA de IL-6 descrito anteriormente.

Se demostró que los mastocitos producen una variedad de citocinas después de su estimulación con IL-33 (ensayo de citocinas humanas Diagnostics Demonstration 10-plex de Meso-Scale n.º K15002B-1; R&D Systems, n.º DY213). **Las figuras 8B-F** muestran la inhibición de la producción de GM-CSF, IL10, IL-8, IL-13 e IL-5, respectivamente, inducida por IL-33. Estos resultados demuestran que los anticuerpos IL330065, IL330101, IL330107 e IL330149 fueron capaces de inhibir la producción de todas las citocinas medidas inducida por IL-33.

Unión y neutralización de IL-33 nativa de longitud completa

Los estudios de selección y actividad descritos anteriormente usaron fuentes recombinantes propias o comerciales de IL-33 madura (aminoácidos 112-270). La IL-33 de longitud completa también puede ser activa (Cayrol *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A 106*(22):9021-6 (2009); Hayakawa *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun 387*(1):218-22 (2009); Talabot-Ayer *et al.*, *J Biol Chem. 284*(29):19420-6 (2009)). Para evaluar la unión de anticuerpos a IL-33 de longitud completa, se clonó y expresó IL-33 de longitud completa en células HEK293-EBNA. Como se describe más adelante, se demostró que los anticuerpos seleccionados se unían a IL-33 de longitud completa, según se determinó por transferencia de Western.

Clonación y expresión de IL-33 humana de longitud completa

La molécula de ADNc que codifica la IL-33 de longitud completa (FL) de ser humano (número de referencia de Swiss

Prot O95760, aminoácidos 1-270) se sintetizó mediante clonación por PCR de extensión de cebador y se clonó en pDONR221 (Invitrogen, 12536-017) y se transfirió al vector de expresión en mamíferos pDEST12.2 (Invitrogen) usando la enzima LR Gateway Clonasa II según las instrucciones del fabricante (Invitrogen, 12538-120). El vector pDEST12.2 se había modificado para que contuviese el origen de replicación oriP del vector pCEP4 (Invitrogen) que permite la replicación de plásmidos episómicos tras su transfección en líneas celulares que expresan el producto génico EBNA-1 (tales como las células HEK293-EBNA). Las células HEK293-EBNA se transfectaron con Lipofectamine 2000 (Invitrogen, 11668-019). Las células que expresaban FL HuIL-33 (y los controles con transfección simulada) se lisaron usando sonicación en presencia de inhibidores de proteasa (Roche, 05892791001).

Análisis de transferencia de Western de lisados celulares que expresan IL-33 humana de longitud completa

Se desnaturalizaron las proteínas de lisados celulares y se redujeron con tampón de muestra SDS y DTT antes de su separación por electroforesis de SDS-PAGE y su transferencia a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con leche desgrasada en polvo al 5% en PBS-T durante 1h, se incubaron con anticuerpo primario (0.5µg por ml) durante 1h, se lavaron tres veces en PBS-T, después se incubaron durante 1h con anticuerpo secundario conjugado a HRP (dilución de 1 en 10,000 de IgG de cara anti-humano (Sigma, A0170)) y se lavaron tres veces en PBS-T. La HRP se detectó con el reactivo de detección Amersham ECL plus (GE Healthcare, RPN2132). Los tamaños se estimaron comparando la migración con la de Magic Mark XP (Invitrogen, LC5602).

La figura 9 muestra la unión de anticuerpos para IL-33 (IL330065, IL330101, IL330107 e IL330149) a IL-33 humana de longitud completa mediante transferencia de Western.

Neutralización de las respuestas de citocinas de mastocitos al lisado celular de IL-33 de longitud completa

Se recogieron células HEK293-EBNA que expresaban HuIL-33 de longitud completa (FL) (y los controles con transfección simulada) 24 horas después de su transfección con acutasa (PAA, n.° L11-007). Las células se diluyeron a $5x10^7$/ml con PBS y se homogeneizaron durante 30 segundos usando un homogeneizador de tejidos. Los restos celulares se retiraron por centrifugación. Los mastocitos se estimularon con lisados celulares a diversas concentraciones. La estimulación de la producción de citocinas se observó únicamente con lisado de células transfectadas con IL-33 de longitud completa y no con el lisado de células con transfección simulada. Se seleccionó una concentración de lisado que estimuló una liberación submáxima de citocinas (aproximadamente la CE50) para los estudios de neutralización de anticuerpos.

Para los ensayos de liberación de citocinas, los mastocitos se cultivaron durante una noche en medio de ensayo (StemSpan, n.° 09650; penicilina/estreptomicina al 1% (Invitrogen, 15140-122) y 100ng/ml de factor de células madre (Peprotech, n.° AF-300-07)) antes de la exposición a FL HuIL-33 en presencia o ausencia del anticuerpo de ensayo. La producción de IL-6 e IL-13 se detectó por ELISA de los sobrenadantes de ensayo tras 18-24 horas. Se ha descrito anteriormente una descripción detallada del protocolo (ejemplo 2-0007).

La figura 10 muestra el efecto de los anticuerpos anti-IL-33 IL330065 e IL330101 en la producción de IL-6 e IL-13 de mastocitos estimulada por lisados celulares de células transfectadas con IL-33 de longitud completa. Las preparaciones de IgG purificadas fueron capaces de inhibir la producción de IL-6 (**Figura 10A**) e IL-13 (**Figura 10B**) inducida por lisados celulares de IL-33 de longitud completa.

Modo de acción no competitivo de los anticuerpos para IL-33

Inhibición de la unión de IL-33 a ST2 mediante IgG purificada

Se evaluó la capacidad de los anticuerpos anti-IL-33 para inhibir la unión de IL-33 marcada con Flag®-His al receptor ST2 en un ensayo bioquímico de competición HTRF® (fluorescencia homogénea resuelta en tiempo, Cisbio International) cuyo método íntegro se ha descrito en el ejemplo 1.

La figura 11A muestra los resultados de unión específica para el ensayo de competición de receptor-ligando HTRF® con concentraciones crecientes de los anticuerpos IL330065, IL330099, IL330101, IL330107, IL33149 e IL330180. Estos resultados demuestran que los anticuerpos IL330065, IL330099, IL330101, IL330107, IL33149 e IL330180 no son inhibidores competitivos de la interacción IL-33:ST2.

Inhibición de la señalización de NFκB en HUVEC por IgG

Se evaluó la señalización de NFκB en HUVEC en respuesta a IL-33 mediante translocación nuclear de la subunidad p65/RelA de NFκB, detectada por tinción de inmunofluorescencia como se ha descrito en el ejemplo 1.

La figura 11B muestra la translocación de NFκB en HUVEC con concentraciones crecientes de los anticuerpos IL330065, IL330099, IL330101, IL330107 e IL330149. Estos resultados demuestran que IL330065, IL330099, IL330101, IL330107 e IL330149 no inhibieron la translocación nuclear de p65/RelA NFκB en HUVEC estimuladas con IL-33 30 minutos después de la estimulación. Los resultados son coherentes con la incapacidad de los anticuerpos IL330065, IL330099, IL330101, IL330107, IL33149 e IL330180 para inhibir la unión de IL-33 a ST2.

Agrupamiento de epítopos de anticuerpos para IL-33 en ensayos de competición de epítopos HTRF®

Se evaluó la capacidad de los anticuerpos para competir con el mAb IL330101 o el mAb IL330180 por la unión a IL-33 humana biotinilada en un ensayo bioquímico de competición de epítopos HTRF® (fluorescencia homogénea resuelta en tempo).

Los ensayos de competición de epítopos HTRF® descritos más adelante, se usaron para medir la unión de un anticuerpo principal en formato IgG a IL-33 biotinilada. Las muestras de ensayo de scFv que reconozcan un epítopo similar al del anticuerpo principal competirán con el anticuerpo principal por la unión a IL-33, dando lugar a una reducción en la señal de ensayo.

Se probaron muestras de anticuerpo scFv anti-IL-33 purificado respecto de su inhibición de la unión de IL-33 humana biotinilada al anticuerpo principal añadiendo 5 microlitros de cada dilución de muestra de ensayo de anticuerpo a una placa de ensayo de bajo volumen de 384 pocillos (Costar, 3673). A continuación, se preparó una solución que contenía IgG1 IL330180 8 nM o IgG1 IL330101 12

nM y detección de anti-Fc humano 40 nM (Cisbio International, 61HFXLB) y se añadieron 2.5 microlitros a la placa de ensayo. Esto fue seguido de la adición de 2.5 microlitros de una solución que contenía IL-33 humana biotinilada (Axxora, AG-40B-0038) 4 nM (para el ensayo de competición de epítopos de IL330180) o 18 nM (para el ensayo de competición de epítopos de IL330101) y detección de criptato de estreptavidina 4.65 nM (Cisbio International, 610SAKLB). Todas las diluciones se efectuaron en tampón de ensayo formado por PBS de Dulbecco (Invitrogen, 14190185) que contenía fluoruro de potasio 0.8 M (BDH 103444T) y seroalbúmina bovina al 0.1% (BSA, Sigma A9576). Las placas de ensayo se incubaron durante 2 hora a temperatura ambiente, seguido de 16 horas a 4°C antes de leer la fluorescencia resuelta en tiempo a longitudes de onda de emisión de 620 nm y 665 nm usando un lector de placas EnVision (Perkin Elmer). Los datos se analizaron usando las ecuaciones 1 a 3 como se ha descrito anteriormente. El control negativo (unión no específica) se define reemplazando la combinación de IL-33 biotinilada/criptato de estreptavidina por detección únicamente de criptato de estreptavidina.

Los resultados para el ensayo de competición de epítopos de IL330101 e IL330180 se muestran en las figuras 8A y 8B, respectivamente. **La figura 12A** muestra la unión competitiva de scFv IL330101, scFv IL330107, scFv IL330149, scFv IL330065, scFv irrelevante y scFv IL330180 con el mAb IL330101 por la unión a IL-33 humana biotinilada. Estos resultados demuestran que scFv IL330101, scFv IL330107 y scFv IL330149 inhibieron de manera competitiva la unión de IL330101 a IL-33 humana biotinilada.

La figura 12B muestra la unión competitiva de IL330180, IL330101, IL330149, IL330065 y scFv irrelevante con el mAb IL330180 por la unión a IL-33 humana biotinilada evaluada en un HTRF® bioquímico. Estos resultados demuestran que IL330101, IL330149 e IL330065 no inhibieron de manera competitiva la unión de IL330180 a IL-33 humana biotinilada.

El agrupamiento de epítopos usando este método muestra tres paneles de anticuerpos que comprenden IL330101, IL330107 e IL330149 en el panel 1, IL330065 en el panel 2 e IL330180 en el panel 3, tal como se detalla en la **Tabla 12.**

Tabla 12. Paneles de agrupación de epítopos

	Inhibición en el ensayo de competición de epítopos de IL330101	Inhibición en el ensayo de competición de epítopos de IL330180
IL330101	√	X
IL330107	√	X
IL330149	√	X
IL330065	X	X
IL330180	X	√

Ejemplo 3 Optimización del Ab IL330101 anti-IL-33

Maduración por afinidad

IL330101 se optimizó usando una estrategia de mutagénesis dirigida y de selecciones de presentación en fagos basadas en la afinidad. Se crearon bibliotecas de scFv-fagos grandes derivadas del clon líder mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótidos de las regiones determinantes de complementariedad 2 y 3 (CDR2 y CDR3) de cadena pesada variable y CDR3 de cadena ligera (VL) usando

técnicas de biología molecular convencionales tal como se describe (*Clackson, T. y Lowman, H.B. Phage Display – A Practical Approach, 2004. Oxford University Press*). Se sometieron las bibliotecas a selecciones de presentación en fago basadas en afinidad con el fin de seleccionar variantes con afinidad superior por IL-33 humana y de ratón. Las selecciones se realizaron esencialmente como se ha descrito previamente (*Thompson, J et al. J Mol Biol, 1996. 256: p. 77-88*) usando reactivos como los descritos en los ejemplos 1 y 2. En resumen, las partículas de scFv-fago se incubaron con IL-33 humana biotinilada en solución (Adipogen; biotinilada como se describe en las Modificaciones de proteínas en el ejemplo 1). Después, se capturaron los scFv-fago unidos al antígeno sobre perlas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina (Dynabeads® M-280) siguiendo las recomendaciones del fabricante). Las partículas de scFv-fago se rescataron posteriormente como se ha descrito previamente (*Osbourn, J.K., et al. Immunotechnology, 1996. 2(3): p. 181-96*) y se repitió el proceso de selección en presencia de concentraciones alternas y decrecientes de IL-33 biotinilada humana o de ratón, normalmente de 500 nM a 500 pM frente a cuatro rondas de selección.

Inhibición de la unión de IL-33 a mAb mediante scFv no purificado

Se cultivó un número representativo de clones individuales de los resultados de la selección en placas de 96 pocillos. Se expresaron scFv en el periplasma bacteriano (*Kipriyanov, et al. J Immunol Methods 200(1-2): 69-77 (1997)*) y se exploraron respecto de su actividad inhibidora en un ensayo de unión de IL-33:mAb basado en FRET homogéneo

(transferencia de energía de resonancia de fluorescencia) HTRF® (fluorescencia resuelta en tiempo homogénea, Cisbio International). En este ensayo, las muestras compitieron con la IgG IL330101 por la unión a IL-33 humana biotinilada o IL-33 FLAG®His de ratón. Dichos ensayos de competición de epítopos están basados en el principio de que una muestra de anticuerpo de ensayo, que reconoce un epítopo similar a la IgG anti-IL-33, competirá con la IgG por la unión a IL-33 biotinilada, dando como resultado una reducción en la señal del ensayo.

Se probaron muestras de scFv anti-IL-33 no purificado respecto de la inhibición de la unión a IL-33 FLAG®His humana o de ratón biotinilada a IL330101 añadiendo 5 microlitros de muestra a una placa de ensayo de bajo volumen de 384 pocillos (Costar, 3673). A continuación, se preparó una solución que contenía IL330101 12 nM combinado con detección de anti-Fc humano XL665 40 nM (Cisbio International, 61HFCXLB) para el ensayo de IL-33 humana y se preparó IL330101 2 nM combinado con detección de anti-Fc humano XL665 40 nM (Cisbio International, 61HFCXLB) para el ensayo de ratón. Se añadieron 2.5 microlitros a las placas de ensayo. Esto fue seguido de la adición de 2.5 microlitros de una solución que contenía IL-33 humana biotinilada 18 nM (Adipogen, AG-40B-0038) combinada con detección de criptato de estreptavidina 4.6 nM (Cisbio International, 610SAKLB) para el ensayo humano o una solución que contenía IL-33 FLAG®His de ratón biotinilada 2 nM combinada con detección de criptato de estreptavidina 4.6 nM (Cisbio International, 610SAKLB) para el ensayo de cinomolgo. Todas las diluciones se efectuaron en tampón de ensayo que contenía fluoruro de potasio 0.8 M (VWR,

26820.236) y seroalbúmina bovina al 0.1% (BSA, PAA, K05-013) en PBS de Dulbecco (Invitrogen, 14190185). Las placas de ensayo se incubaron durante 4 hora a temperatura ambiente, seguido de 16 horas a 4 grados centígrados y la fluorescencia resuelta en tiempo se leyó a longitudes de onda de emisión de 620 nm y 665 nm usando un lector de placas EnVision (Perkin Elmer). Los datos se analizaron calculando la relación 665/620 nm seguido de los valores de % de Delta F para cada muestra. La relación 665/620 nm se usó para corregir respecto de la interferencia de la muestra usando la ecuación 1. El % de Delta F para cada muestra se calculó entonces usando la ecuación 2. El control negativo (unión no específica) se definió reemplazando la IL-33 biotinilada combinada con detección de criptato de estreptavidina solamente por detección de criptato de estreptavidina. Posteriormente, se utilizaron los valores del % de Delta F para calcular el % de unión específica tal y como se describe en la ecuación 3.

A medida que el ensayo de competición de epítopos alcanzó su límite de sensibilidad, se usó un ensayo que usa un mAb intermedio optimizado, IL330259 para probar las muestras de scFv no purificados. Las muestras de anticuerpo anti-IL-33 no purificadas se ensayaron respecto de la inhibición de la unión de IL-33 humana biotinilada o de IL-33 de ratón FLAG®His a IL330259 marcada con DyLight añadiendo 5 microlitros de cada muestra a cada placa de ensayo de bajo volumen de 384 pocillos (Costar, 3673). A continuación, se preparó una solución que contenía IL330259 marcada con DyLight 20 nM para el ensayo de IL-33 humana y se preparó IL330259 marcada con DyLight 4 nM para el ensayo de ratón y se añadieron 2.5 microlitros a las placas de

ensayo (IgG marcada usando el kit (Thermo Scientific, 53051) según las instrucciones del fabricante). Esto fue seguido de la adición de 2.5 microlitros de una solución que contenía IL-33 humana biotinilada 20 nM (Adipogen, AG-40B-0038) o IL-33 FLAG®His de ratón biotinilada 1.6 nM combinada con detección de criptato de estreptavidina 6 nM (Cisbio International, 610SAKLB). Todas las diluciones se efectuaron en tampón de ensayo que contenía fluoruro de potasio 0.8 M (VWR, 26820.236) y seroalbúmina bovina al 0.1% (BSA, PAA, K05-013) en PBS de Dulbecco (Invitrogen, 14190185). Las placas de ensayo se incubaron durante 4 hora a temperatura ambiente, seguido de 16 horas a 4 grados centígrados y la fluorescencia resuelta en tiempo se leyó a longitudes de onda de emisión de 620 nm y 665 nm usando un lector de placas EnVision (Perkin Elmer). Los datos se analizaron calculando la relación 665/620 nm seguido de los valores de % de Delta F para cada muestra. La relación 665/620 nm se usó para corregir respecto de la interferencia de la muestra usando la ecuación 1. El % de Delta F para cada muestra se calculó entonces usando la ecuación 2. El control negativo (unión no específica) se definió reemplazando la IL-33 biotinilada combinada con detección de criptato de estreptavidina solamente por detección de criptato de estreptavidina. Posteriormente, se utilizaron los valores del % de Delta F para calcular el % de unión específica tal y como se describe en la ecuación 3.

Inhibición de la unión de IL-33 a mAb mediante scFv purificado

Los clones de Fv monocatenarios que mostraron un mayor efecto inhibidor en la interacción IL-33:mAb en forma de

extractos periplásmicos no purificados en comparación con IL330101 se sometieron a secuenciación de ADN (*Osbourn, et al. Immunotechnology 2(3):181-96 (1996); Vaughan, et al. Nat Biotechnol 14(3):309-14 (1996)*). Los scFv únicos se expresaron nuevamente en bacterias y se purificaron por cromatografía de afinidad (como se describe en el documento WO01/66754). Las potencias de estas muestras se determinaron haciendo competir una dilución en serie de la preparación purificada contra la IgG IL330101 por la unión a IL-33 humana biotinilada, IL-33 FLAG®His de ratón biotinilada o IL-33 FLAG®His de cinomolgo biotinilada como se ha descrito anteriormente con la adición del ensayo de IL-33 FLAG®His de cinomolgo biotinilada (la IL-33 FLAG®His de cinomolgo biotinilada se añadió a una concentración 12 nM).

Figura 13: muestra la inhibición de la señal de FRET, producida por la unión de IL-33 humana biotinilada a IL330101 con concentraciones crecientes de los anticuerpos scFv para IL-33 IL330101, IL330259, en donde el eje x es la concentración del anticuerpo en concentración molar y el eje y es el porcentaje de unión específica.

Las preparaciones de scFv purificado que fueron capaces de inhibir la interacción IL-33:mAb en mayor medida que IL330101 se seleccionaron para su conversión al formato IgG. El método para la expresión y purificación de IgG se ha descrito en el ejemplo 1.

A medida que el ensayo de competición de epítopos alcanzó su límite de sensibilidad, se usó un ensayo que usa un mAb intermedio optimizado (IL330259) para probar las muestras de scFv purificados. Las muestras de anticuerpo anti-IL-33 purificado se ensayaron respecto de la

inhibición de la unión de IL-33 humana biotinilada, IL-33 FLAG®His de ratón biotinilada IL-33 FLAG®His de cinomolgo biotinilada a IL330259 como se ha descrito anteriormente con la adición de ensayo de IL-33 FLAG®His de cinomolgo biotinilada (la IL-33 FLAG®His de cinomolgo biotinilada se añadió a una concentración 12 nM).

Basándose en los datos de secuencia y de competición de epítopos, se recombinaron los resultados de VH y VL mediante técnicas de biología molecular convencionales para formar bibliotecas en las que los clones contenían secuencias de VH y VL emparejadas aleatoriamente (por ejemplo, bibliotecas de CDR2 de VH/CDR3 de VL y CDR3 de VH/CDR3 de VL). Como alternativa, se emparejaron aleatoriamente las secuencias de CDR3 de VH y CDR3 de VL y se recombinaron con secuencias de CDR2 de VH específicas a partir de un grupo de variantes mejoradas, para generar bibliotecas en las que las tres CDR no eran parentales. Normalmente, se efectuaron cinco rondas de selección por afinidad usando concentraciones decrecientes y alternas de IL-33 humana y de ratón biotinilada, de 10 nM a 10 pM, en todas las bibliotecas de recombinación para identificar secuencias de scFv con cinética mejorada. Como alternativa, se seleccionaron bibliotecas de recombinación usando una concentración fija de IL-33 biotinilada (por ejemplo, 1 nM, 100 pM o 300 pM) en presencia de IL-33 no biotinilada 1000x durante espacios de tiempo crecientes (por ejemplo, 30 minutos, 1 hora, 2 horas o 4 horas) a lo largo de cuatro rondas de selección, un proceso conocido en la técnica como selección por "velocidad de disociación" o "competición", para identificar scFv con cinética mejorada.

Nuevamente, se exploraron las muestras en un ensayo de competición de epítopos HTRF® respecto de la capacidad de inhibir la unión de huIL-33 marcada al anticuerpo parental IL330101 o al anticuerpo IL330259 optimizado para la CDR2 de VH, como se ha descrito anteriormente. Los scFv que mostraron un efecto inhibidor significativamente mejorado cuando se compararon con IL330101 se sometieron a secuenciación de ADN y se produjeron variantes únicas en forma de scFv purificados para su caracterización adicional. Los scFv inhibidores se convirtieron al formato de anticuerpo de inmunoglobulina G1 (IgG1) completa del modo descrito en el ejemplo 1.

Como alternativa, se recombinaron de manera específica y racional las secuencias de CDR2 de VH, la CDR3 de VH y la CDR3 de VL y se produjeron directamente en forma de IgG. En este ejemplo, se ensayaron las IgG respecto de una cinética mejorada sin selección por afinidad adicional.

Los anticuerpos con cinética mejorada se identificaron a partir de todas las estrategias y se ejemplifican por IL330259, IL330377, IL330388, IL330396, IL330398 y H338L293.

Las secuencias de aminoácidos de los dominios V_H y V_L del IL330101 parental y los anticuerpos anti-IL-33 optimizados se alinearon con las secuencias de línea germinal humana conocidas en la base de datos IMGT (*Lefranc, M. P. et al. Nucl. Acids Res. 2009. 37(Edición de la base de datos): D1006-D1012*) y se identificó la línea germinal más cercana mediante similitud de secuencia. Para el dominio V_H del linaje de anticuerpo IL330101 este fue IGHV3-21/IGHJ2. Para el dominio V_L este fue IGLV3-25/IGLJ3. Sin tomar en consideración los restos de Vernier (*Foote,*

J., et al. J Mol Biol, 1992. 224: p. 487), que se dejaron sin cambiar, no fueron necesarios cambios en las regiones marco conservadas de los dominios V_H y 4 cambios en las regiones marco conservadas de V_L (V3E, T5M, A45V y V104L; numeración de Kabat). Estas posiciones se cambiaron del modo indicado usando técnicas de mutagénesis de sitio dirigido convencional con cebadores de mutagénesis adecuados. Los anticuerpos que se convirtieron a la línea germinal de este modo aparecen en los listados de secuencias con el sufijo "fgl". Las SEQ ID NO correspondientes a las diversas regiones de los anticuerpos IL330259, H338L293, IL330377, IL330388, IL330396 e IL330398 se muestran en la **Tabla 13.**

Tabla 13. Secuencias de Anticuerpos anti-IL-33

IgG1	**VH SEQ ID NO:**	**VL SEQ ID NO:**	**CDR 1, 2, 3 de VH**	**CDR 1, 2, 3 de VL**
IL330101_fgl	112	117	SEQ ID NO: 113 SEQ ID NO: 114 SEQ ID NO: 115	SEQ ID NO: 118 SEQ ID NO: 119 SEQ ID NO: 120
IL330259	152	157	SEQ ID NO: 153 SEQ ID NO: 154 SEQ ID NO: 155	SEQ ID NO: 158 SEQ ID NO: 159 SEQ ID NO: 160
IL330259_fgl	162	167	SEQ ID NO: 163	SEQ ID NO: 168

			SEQ ID NO: 164 SEQ ID NO: 165	SEQ ID NO: 169 SEQ ID NO: 170
H338L293	172	177	SEQ ID NO: 173 SEQ ID NO: 174 SEQ ID NO: 175	SEQ ID NO: 178 SEQ ID NO: 179 SEQ ID NO: 180
H338L293_fgl	182	187	SEQ ID NO: 183 SEQ ID NO: 184 SEQ ID NO: 185	SEQ ID NO: 188 SEQ ID NO: 189 SEQ ID NO: 190
IL330377	192	197	SEQ ID NO: 193 SEQ ID NO: 194 SEQ ID NO: 195	SEQ ID NO: 198 SEQ ID NO: 199 SEQ ID NO: 200
IL330377_fgl	202	207	SEQ ID NO: 203 SEQ ID NO: 204 SEQ ID NO: 205	SEQ ID NO: 208 SEQ ID NO: 209 SEQ ID NO: 210
IL330388	212	217	SEQ ID NO: 213 SEQ ID NO:	SEQ ID NO: 218 SEQ ID NO:

			214 SEQ ID NO: 215	219 SEQ ID NO: 220
IL330388_fgl	222	227	SEQ ID NO: 223 SEQ ID NO: 224 SEQ ID NO: 225	SEQ ID NO: 228 SEQ ID NO: 229 SEQ ID NO: 230
IL330396	232	237	SEQ ID NO: 233 SEQ ID NO: 234 SEQ ID NO: 235	SEQ ID NO: 238 SEQ ID NO: 239 SEQ ID NO: 240
IL330396_fgl	242	247	SEQ ID NO: 243 SEQ ID NO: 244 SEQ ID NO: 245	SEQ ID NO: 248 SEQ ID NO: 249 SEQ ID NO: 250
IL330398	252	257	SEQ ID NO: 253 SEQ ID NO: 254 SEQ ID NO: 255	SEQ ID NO: 258 SEQ ID NO: 259 SEQ ID NO: 260
IL330398_fgl	262	267	SEQ ID NO: 263 SEQ ID NO: 264	SEQ ID NO: 268 SEQ ID NO: 269

			SEQ ID NO: 265	SEQ ID NO: 270

Inhibición de la unión de IL-33 a mAb mediante IgG purificada

Se evaluó la capacidad de los anticuerpos anti-IL-33 para inhibir la unión de IL-33 humana biotinilada, IL-33 FLAG®His de ratón biotinilada o IL-33 FLAG®His de cinomolgo biotinilada a la IgG IL330101 marcada don DyLight en un ensayo de competición bioquímico HTRF® (fluorescencia homogénea resuelta en tiempo, Cisbio International).

Las muestras de anticuerpo anti-IL-33 purificado se ensayaron respecto de la inhibición de la unión de IL-33 humana biotinilada, IL-33 FLAG®His de ratón biotinilada o IL-33 FLAG®His de cinomolgo biotinilada a IL330101 marcada con DyLight añadiendo 5 microlitros de cada concentración de muestra a una placa de ensayo de bajo volumen de 384 pocillos (Costar, 3673). A continuación, se preparó una solución que contenía IL330101 marcada con DyLight 40 nM y se añadieron 2.5 microlitros a las placas de ensayo (marcado usando el kit (Thermo Scientific, 53051) según las instrucciones del fabricante). Esto fue seguido de la adición de 2.5 microlitros de una solución que contenía IL-33 humana biotinilada 40 nM (Adipogen, AG-40B-0038), IL-33 FLAG®His de ratón biotinilada 2.5 nM o IL-33 FLAG®His de ratón biotinilada 12 nM combinada con detección de criptato de estreptavidina 4.6 nM (Cisbio International, 610SAKLB). Todas las diluciones se efectuaron en tampón de ensayo que contenía fluoruro de potasio 0.8 M (VWR, 26820.236) y seroalbúmina bovina al 0.1% (BSA, PAA, K05-013) en PBS de Dulbecco (Invitrogen, 14190185). Las placas de ensayo se incubaron durante 4 hora a temperatura ambiente, seguido de

16 horas a 4 grados centígrados y la fluorescencia resuelta en tiempo se leyó a longitudes de onda de emisión de 620 nm y 665 nm usando un lector de placas EnVision (Perkin Elmer). Los datos se analizaron calculando la relación 665/620 nm seguido de los valores de % de Delta F para cada muestra. La relación 665/620 nm se usó para corregir respecto de la interferencia de la muestra usando la ecuación 1. El % de Delta F para cada muestra se calculó entonces usando la ecuación 2. El control negativo (unión no específica) se definió reemplazando la IL-33 biotinilada combinada con detección de criptato de estreptavidina solamente por detección de criptato de estreptavidina. Posteriormente, se utilizaron los valores del % de Delta F para calcular el % de unión específica tal y como se describe en la ecuación 3.

Figura 14A: muestra la inhibición de la señal de FRET, producida por la unión de IL-33 humana biotinilada a IL330101 con concentraciones crecientes de los anticuerpos IgG1 para IL-33 IL330101, IL330259, en donde el eje x es la concentración del anticuerpo en concentración molar y el eje y es el porcentaje de unión específica.

A medida que el ensayo de competición de epítopos alcanzó su límite de sensibilidad, se usó un ensayo que usa un mAb intermedio optimizado, IL330259 para probar las muestras de IgG purificadas. Esto es como se describe para los ensayos de scFv purificado.

A medida que el ensayo de competición de epítopos de IL330259 alcanzó su límite de sensibilidad, se usó un tercer ensayo usando un mAb optimizado (H338L293) para probar muestras de IgG purificadas. Las muestras de anticuerpo anti-IL-33 purificado se ensayaron respecto de

la inhibición de la unión de IL-33 humana biotinilada, IL-33 FLAG®His de cinomolgo biotinilada o IL-33 FLAG®His de ratón biotinilada a H338L293 marcada con DyLight añadiendo 5 microlitros de cada muestra a una placa de ensayo de bajo volumen de 384 pocillos (Costar, 3673). A continuación, se preparó una solución que contenía H338L293 marcada con DyLight 20 nM y se añadieron 2.5 microlitros a las placas de ensayo (marcado usando el kit (Thermo Scientific, 53051) según las instrucciones del fabricante). Esto fue seguido de la adición de 2.5 microlitros de una solución que contenía IL-33 humana biotinilada 4 nM (Adipogen, AG-40B-0038), IL-33 FLAG®His de ratón biotinilada 0.8 nM o IL-33 FLAG®His de ratón biotinilada 1.6 nM combinada con detección de criptato de estreptavidina 4.6 nM (Cisbio International, 610SAKLB). Todas las diluciones se efectuaron en tampón de ensayo que contenía fluoruro de potasio 0.8 M (VWR, 26820.236) y seroalbúmina bovina al 0.1% (BSA, PAA, K05-013) en PBS de Dulbecco (Invitrogen, 14190185). Las placas de ensayo se incubaron durante 4 hora a temperatura ambiente, seguido de 16 horas a 4°C y la fluorescencia resuelta en tiempo se leyó a longitudes de onda de emisión de 620 nm y 665 nm usando un lector de placas EnVision (Perkin Elmer). Los datos se analizaron calculando la relación 665/620 nm seguido de los valores de % de Delta F para cada muestra. La relación 665/620 nm se usó para corregir respecto de la interferencia de la muestra usando la ecuación 1. El % de Delta F para cada muestra se calculó entonces usando la ecuación 2. El control negativo (unión no específica) se definió reemplazando la IL-33 biotinilada combinada con detección de criptato de estreptavidina solamente por detección de

criptato de estreptavidina. Posteriormente, se utilizaron los valores del % de Delta F para calcular el % de unión específica tal y como se describe en la ecuación 3.

Figura 14B: muestra la inhibición de la señal de FRET, producida por la unión de IL-33 humana biotinilada a H338L293 con concentraciones crecientes de los anticuerpos IgG1 H338L293, IL330396 e IL330388 en donde el eje x es la concentración del anticuerpo en concentración molar y el eje y es el porcentaje de unión específica.

Inhibición de la producción de IL-6 en HUVEC por anticuerpos para IL-33

Se evaluó la capacidad de los anticuerpos para inhibir la producción de IL-6 estimulada por IL-33 en HUVEC, como se ha descrito en el ejemplo 2.

La figura 15A muestra la reducción de la producción de IL-6 por concentraciones crecientes de los anticuerpos (IL330101, IL330377, H338L293, IL330388, IL330396, IL330398), en donde el eje x es la concentración de anticuerpo en concentración molar y el eje y es el % de respuesta máxima. Las preparaciones de IgG purificadas de los anticuerpos inhibieron la actividad de IL-6 en un máximo de ~70% en comparación con un anticuerpo policlonal comercial que inhibió el 100%.

Inhibición de la producción de IL-6 en mastocitos por anticuerpos para IL-33

Se evaluó la capacidad de los anticuerpos para inhibir la producción de IL-6 estimulada por IL-33 en mastocitos procedentes de sangre de cordón umbilical humano, como se ha descrito en el ejemplo 2.

La figura 15B muestra la reducción de la producción de IL-6 por concentraciones crecientes de los anticuerpos

(IL330101, H338L293, IL330388, IL330396), en donde el eje x es la concentración de anticuerpo en concentración molar y el eje y es el % de respuesta máxima. Las preparaciones de IgG purificadas de anticuerpos inhibieron la actividad de IL-6 en un 100%, en comparación con el anticuerpo de control negativo.

Los resultados de CI50 para la producción de IL-6 por HUVEC y la producción de IL-6 por mastocitos se muestran en la **Tabla 14.**

Tabla 14. Ejemplo de potencias de anticuerpos optimizados

Clon	**Media geométrica (IC del 95%) de la CI50 (nM) de IgG1**	
	Producción de IL-6 por HUVEC	**Producción de IL-6 por mastocitos**
IL330101	193	93
IL330377_FGL	6.6	1.3
H338L293	1.9	1.7
IL330388_FGL	2.1	1.2
IL330396_FGL	2.8	1.5
IL330398_FGL	1.5	0.9

Farmacología de anticuerpos

La producción de IL-6 por mastocitos obtenidos de sangre de cordón umbilical se indujo aumentando las concentraciones de IL-33 (Adipogen) usando el método descrito en el ejemplo 2. Esta respuesta a la dosis se llevó a cabo en presencia de concentraciones crecientes de H338L293 o IL330388 para producir un cambio hacia la derecha de la curva de respuesta a la dosis de IL-33. Los valores de CE_{50} para IL-33 en ausencia y presencia de anticuerpo se calcularon usando el programa informático

GraphPad PRISM (La Jolla, CA, EE.UU.) y se calculó la relación de dosis (DR). Los datos se representaron como el log [Anticuerpo] M (eje x) frente al log [DR-1] (eje y). Esto demuestra claramente un perfil no competitivo (gráfica curvada), característica de un modulador alostérico. Para investigar esto, se normalizaron los datos de cada experimento y se combinaron en un solo conjunto de datos. Se ajustó un modelo alostérico usando el programa informático Graphpad Prism y se determinó la K_b y el valor de alfa. Los valores de alfa fueron similares para ambos principales examinados, indicando un valor para alfa de ~0.02 (es decir, la reducción máxima de la afinidad/potencia de IL-33 cuando está unido al anticuerpo es ~50 veces). Puede estimarse la afinidad funcional (K_b) para H338L293 (~4.2nM) e IL330388 (~1.7nM).

La figura 16 muestra un análisis de Schild de IL330388 y H338L293 en un ensayo de producción de IL-6 de mastocitos. Ambos anticuerpos muestran el perfil de un modulador alostérico.

Cálculo de la afinidad de unión para anticuerpos para IL-33 usando BIAcore

Se determinó la afinidad de unión de muestras de IgG purificadas de miembros de unión ejemplares a IL-33 humana, de cinomolgo o de ratón mediante solución de afinidad usando un dispositivo BIAcore 2000 (GE Healthcare). Se inmovilizó una superficie de IL33 biotinilada sobre una microplaca sensora recubierta de estreptavidina (GE Healthcare, n.° de cat. BR-1000-32). Se incubaron anticuerpos anti-IL-33 con diversas concentraciones de IL-33 no marcada y se equilibraron a 25°C durante 48 horas. Se determinó la cantidad de anticuerpo libre haciendo fluir

las muestras sobre la microplaca de IL33 y midiendo la respuesta en comparación con una curva patrón de anticuerpo. Las afinidades se determinaron usando el ajuste de afinidad de solución en el programa informático BIAevaluation. Las afinidades para la unión de los anticuerpos IL330101, H338L293, IL330388, IL330396 a IL-33 humana, de cinomolgo o de ratón se muestran en la **Tabla 15.**

Tabla 15: Afinidad en solución BIAcore de miembros de unión ejemplares

Anticuerpo	**Antígeno**	**KD (nM)**
IL3300101	IL-33 humana FLAG®-His	3.20E-06
H338L293	IL-33 humana FLAG®-His	5.90E-10
H338L293	IL-33 de cinomolgo FLAG®-His	5.45E-10
H338L293	IL-33 de ratón FLAG®-His	4.52E-10
IL3300388	IL-33 humana FLAG®-His	3.00E-10
IL3300388	IL-33 de cinomolgo FLAG®-His	2.92E-10
IL3300388	IL-33 de ratón FLAG®-His	8.82E-11
IL3300396	IL-33 humana FLAG®-His	5.93E-10

Ejemplo 4 Regulación redox de IL-33

Reactivos

Se sintetizó el ADNc que codifica el componente maduro de IL-33 humana (aminoácidos 112-270; número de referencia (Swiss-Prot) O95760) mediante PCR de extensión de cebadores y se clonaron en pJexpress404 (DNA 2.0). Se modificó la secuencia codificante para que contuviese 10xhis, marcador Avi y sitio de escisión de proteasa de Factor-Xa (MHHHHHHHHHHAAGLNDIFEAQKIEWHEAAIEGR) en el extremo N-

terminal de la proteína. La IL33-01 marcada con His10/marcador Avi en N-terminal (TS, SEQ ID NO: 632) se generó transformando células de *E. coli* BL21(DE3). Las células transformadas se cultivaron en medio de auto-inducción (Sistema 1 de autoinducción Overnight Express™, Merck Millipore, 71300-4) a 37°C durante 18 horas antes de recogerlas por centrifugación y se almacenaron a -20°C. Las células se resuspendieron en BugBuster (Merck Millipore, 70921-5), que contiene comprimidos de cóctel completo de inhibidor de proteasas (Roche, 11697498001), 2.5u/ml de nucleasa benzonasa (Merck Millipore, 70746-3) y 1 mg/ml de lisozima recombinante. El lisado celular se clarificó por centrifugación a 75,000 xg durante 2 horas a 4°C. Las proteínas IL-33 se purificaron a partir del sobrenadante mediante cromatografía de afinidad de níquel en fosfato sódico 50mM, pH 8.0, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, eluyendo en fosfato de sodio 50mM, pH 8.0, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM. La IL-33 se purificó adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaños usando una columna Superdex 75 10/300 GL en suero salino tamponado con fosfato a pH 7.4. Las fracciones de los picos se analizaron mediante SDS-PAGE. Las fracciones que contenían IL-33 pura se agruparon y se midió la concentración mediante medición en un Nanodrop A280. Las muestras finales se analizaron mediante SDS-PAGE.

Para generar la IL-33 desmarcada (BK349), se incubó IL33-01 marcada en N-terminal con His10/marcador Avi con 10 unidades de factor XA (GE Healthcare, 27-0849-01) por mg de proteína en tampón 2xDPBS a TA durante 1 hora. La IL33 no marcada se purificó usando cromatografía SEC en 2xDPBS en

una columna S75 (GE Healthcare, 28-9893-33) con un caudal de 1 ml/min.

Se generaron otros reactivos indicados de manera general en la **Tabla 16** como se describe en el ejemplo 1.

Tabla 16. Reactivos de IL-33

Reactivo	**Proveedor**	**Número de catálogo/denominación**	**SEQ ID**
IL-33 humana Flag®His	Propia		SEQ ID NO. 627
IL-33 de ratón Flag®His	Propia		SEQ ID NO. 628
IL33-01 humana His10/marcador Avi	Propia		SEQ ID NO. 632
IL33-01 humana desmarcada	Propia	BK349	
IL-33 humana	Axxora / Alexis	ALX-522-098	
IL-33 de ratón	Peprotech	210-33	
IL-33 de ratón	R&D Systems	3626/ML	

Modificaciones de proteínas

Las IgG y las proteínas receptoras modificadas usadas en el presente documento se biotinilaron a través de las aminas libres usando Sulfo-NHS-LC-Biotina EZ Link (Thermo/Pierce 21335) como se describe en el ejemplo 1. Las proteínas IL-33 usadas en el presente documento se biotinilaron a través de las cisteínas libres usando Biotina-BMCC EZ link (Perbio/Pierce, producto n.° 21900).

IL-33 pierde su actividad rápidamente *in vitro*

Se midió la actividad de IL-33 en ensayos de señalización e HUVEC (30 minutos) y el ensayo de producción de IL-6 (18-24 horas), cuyos métodos se describen en los ejemplos 1 y 2, respectivamente.

La figura 17 muestra la actividad de IL-33 humana, IL-33 biotinilada en cisteína o IL-33 pretratada en medio de cultivo celular, medida en ensayos de señalización de HUVEC (30 minutos) y el ensayo de producción de IL-6 (18-24 horas). **La figura 17A** muestra la comparación de la actividad de IL-33 humana (Adipogen) medida mediante los ensayos de NFκB o IL-6, en donde el eje x es la concentración de IL-33 humana en concentración molar y el eje y es el porcentaje de respuesta máxima. La IL-33 fue significativamente menos potente durante una noche en comparación con los ensayos cortos (30 minutos). La IL-33 Flag®His humana biotinilada a través de los restos de cisteína no perdió actividad entre los ensayos cortos (30 minutos) y más largos (una noche) (**Figura 17B**). Para investigar este fenómeno, se pretrató IL-33 (BK349) durante 18 horas en medio de cultivo celular (EBM-2 (Lonza, n.° CC-3156) con el kit complementario EGM-2 SingleQuot y factores de crecimiento (Lonza, n.° CC-4176)) y después se comparó con IL-33 no tratada respecto de su capacidad para inhibir la señalización de NFκB. La IL-33 que se había pretratado con medio de cultivo mostró una pérdida significativa de actividad (**Figura 17C**).

Análisis SDS-PAGE de IL-33

Para investigar cambios potenciales en la proteína IL-33, se analizó IL-33 humana (BK349 o IL-33 Flag®His humana) e IL-33 Flag®His de ratón tratadas en PBS/seroalbúmina

bovina (BSA) al 0.1% o medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM), mediante electroforesis de SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras. Las muestras se prepararon en tampón de carga de gel NuPAGE 1x (Invitrogen) y se desnaturalizaron a 90°C durante 3 min. Las muestras reducidas contenían beta-mercaptoetanol al 2%. Las muestras se ejecutaron en minigeles NuPAGE Novex con Bis-Tris al 12% (Invitrogen) con tampón de ejecución MOPS (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras reducidas y no reducidas se ejecutaron en geles separados. Se cargaron 500 ng de IL-33 por carril. Los geles se lavaron 3 x 5 min en una plataforma de agitación en ddH2O y después se tiñeron durante 1 hora usando EzBlue (reactivo de tinción de gel a base de azul brillante de Coomassie G-250, Sigma G1041). Se destiñeron los geles en dH2O y se escanearon usando un escáner Epsom.

La figura 18 muestra la SDS-PAGE de IL-33 humana o de ratón en condiciones reductoras o no reductoras, antes o después del tratamiento con medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM). Se observaron diferencias en el peso molecular aparente de la IL-33 después del tratamiento con IMDM únicamente en condiciones no reductoras, lo que implica la presencia de modificaciones relacionadas con la reducción-oxidación para IL-33 tanto humana como de ratón. **La figura 18A** muestra la diferencia en el peso molecular aparente de la IL-33 humana (BK349) después del tratamiento con IMDM que se observó únicamente en condiciones no reductoras. **La figura 18B** muestra IL-33 Flag®His, no biotinilada frente a biotinilada en condiciones no reductoras. Se observó una diferencia en el peso molecular aparente para IL-33 Flag®His, pero no a IL-33 Flag®His

biotinilada en las cisteínas después del tratamiento con IMDM. **La figura 18C** muestra la diferencia en el peso molecular aparente de la IL-33 Flag®His de ratón después del tratamiento con IMDM que se observó únicamente en condiciones no reductoras.

Análisis por espectrometría de masas y mapeo de disulfuros

La forma tratada con medio de IL-33 humana se purificó para su análisis posterior. Se incubó IL-33 humana (BK349) con medio IMDM al 60% o en PBS a una concentración final de proteína de 300 ug/ml durante 18 horas a 37°C. Después de 18 horas, la IL-33 tratada con medio se purificó a partir de los componentes del medio usando cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) en una columna Superdex S75 16:600 (GE Healthcare 28-9893-33) en 2xDPBS usando un sistema FPLC AKTAxpress (GE Healthcare). Las fracciones de pico se analizaron mediante SDS-PAGE y las fracciones puras no agregadas se agruparon y analizaron mediante LC-MS.

La figura 19 muestra la purificación de IL-33 humana tratada con IMDM mediante SEC. Se recogió la fracción de monómero para su análisis adicional.

LC-MS

Se llevó a cabo el análisis por LC-MS en fase reversa (RP) usando una UPLC Acquity acoplada a un espectrómetro de masas cuadrupolar de tiempo de vuelo (QToF) Synapt G1 (Waters, Milford, EE.UU.). Se inyectó 1 µg de proteína purificada en Tris HCl 10 mM, pH 8 a 1 mg/ml en una columna analítica BEH300 C4 de 50 mm x 2.1 mm, con un tamaño de partícula de 1.7 µm, mantenida a 65 °C (Waters, Milford, EE.UU.). La proteína se eluyó a un caudal constante de 0.15 ml/min usando un gradiente binario de 5 min; el disolvente

B se aumentó inicialmente del 5 al 95% durante 1 minuto, se redujo al 20% durante 2 minutos y volvió al 5% durante 2 minutos adicionales. La columna se lavó antes de la inyección siguiente oscilando entre disolvente B alto (95%) y bajo (5%) durante 5 minutos. El disolvente A (agua) y B (acetonitrilo) se complementaron con ácido trifluoroacético al 0.01% (v/v) y ácido fórmico al 0.1% (v/v). Los espectros se registraron entre 500-4500 m/z. Los parámetros clave del instrumento incluyeron modo de ionización +ve, tensión de la fuente: 3.4 kV, tensión del cono de muestra: 50 V, temperatura de la fuente: 140°C, temperatura de desolvatación: 400°C. Se usó BioPharmaLynx (Waters, Milford, EE.UU.) para desconvolucionar las envolturas de carga.

La figura 20 muestra la masa intacta de IL-33 tratada con PBS frente a IMDM, determinada por LC-MS. La IL-33 tratada con IMDM mostró una pérdida de 4 Da en comparación con la IL-33 tratada con PBS, lo que es compatible con la formación de dos enlaces disulfuro.

Mapeo de enlaces disulfuro

Para cada muestra, se prepararon 50 µg de proteína a 3 mg/ml en tampón de fosfato de sodio 100 mM, N-etilmaleimida 1 mM, pH 7.0 y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las muestras secas se resuspendieron en guanidina HCl 7 M, NaCl 100 mM, fosfato de sodio 10 mM y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. La proteína desnaturalizada se diluyó a 0.3 mg/ml y se digirió con Glu-C a una relación E:S de 1:50 en guanidina 2 M, fosfato de sodio 100 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.0 a 37 °C. Después de 2 horas, se añadió una alícuota igual de Lys-C. Después de 2 horas adicionales se separó lo digerido; para el análisis

reducido, se incubó l digerido con ditiotreitol 50 mM durante 15 min a temperatura ambiente. Las muestras reducidas y no reducidas se analizaron mediante RP LC-MS usando un UPLC Acquity acoplado a un espectrómetro de masas QToF Synapt G2 (Waters, Milford, EE.UU.). Para cada muestra, se inyectaron 5 ug de digerido de Lys-C en una columna analítica C18 BEH300 de 150 mm x 2.1 mm, con un tamaño de partícula de 1.7 µm, mantenida a 55 °C (Waters, Milford, EE.UU.). Los péptidos se eluyeron a un caudal constante de 0.2 ml/min usando un gradiente binario de 75 minutos; el disolvente B se aumentó del 0% al 35%. La columna se lavó antes de la inyección siguiente oscilando entre disolvente B alto (95%) y bajo (5%) durante 5 minutos. El disolvente A (agua) y B (acetonitrilo) se complementaron con ácido trifluoroacético al 0.02% (v/v). Los espectros se registraron entre 50-2000 m/z usando un modo de adquisición independiente de los datos. Los espectros de baja y alta energía se procesaron usando BioPharmaLynx (Waters, Milford, EE.UU.).

La figura 21 Muestra el mapeo de disulfuros de IL-33 humana tratada con IMDM. **La figura 21A** muestra los espectros de masas combinados desconvolucionados del análisis de mapeo de péptidos Lys-C en forma reducida y no reducida de DSB IL-33. **La figura 21B** muestra espectros aislados para péptidos que contienen cisteína. Los péptidos únicos para las muestras reducidas y no reducidas se resaltan en verde y azul, respectivamente. Los datos fueron coherentes con la formación de dos puentes disulfuro. Una especie identificada tenía puentes entre las cisteínas C208-C249 y C227-C232, respectivamente. Sin embargo, no se resolvió el pico predominante y pueden existir otras

especies. **La figura 21C** muestra secuencias de péptidos unidos por disulfuro identificados mediante análisis de mapeo peptídico Lys-C en forma reducida y no reducida de IL-33 unida por disulfuro. Los enlaces disulfuro se representan por dos guiones (--). Los fallos de escisión de Lys-C se representan por corchetes.

Análisis NMR de la IL-33 unida por disulfuro

Basándose en la estructura publicada de IL-33 *(Lingel, A. et al. Structure 17, 1398-1410 (2009); Liu, X. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, 14918-14923 (2013))*, nos restos de cisteína no se encuentran lo suficientemente próximos como para que se produzcan enlaces disulfuro sin que se produzca un cambio conformacional. Para investigar esto, se llevó a cabo un análisis de NMR de coherencia cuántica múltiple heteronuclear (HMQC).

Producción de proteínas ^{15}N-IL-33

El ADN que codifica IL-33 de tipo silvestre con un marcador 6His N-terminal y un sitio de escisión de proteasa TEV (SEQ ID. 633) se usó para transformar células *E. coli* BL21 Gold. Las células transformadas se cultivaron a 37°C en medio mínimo M9 complementado con 5 g/l de polvo ^{15}N - IsoGro™ hasta que alcanzaron una DO600nm de 0.6 a 0.8, momento en el cual se indujo la expresión de la proteína mediante la adición de IPTG 100 mM. Los cultivos se continuaron a 18°C durante 20 horas adicionales antes de recoger las células por centrifugación y se almacenaron a -80°C. Las células se resuspendieron en fosfato de sodio 50 mM, pH 8.0, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, beta-mercaptoetanol 5 mM que contenía comprimidos de inhibidor completo de proteasas (Roche, 11697498001), 2.5 U/ml de nucleasa benzonasa (Merck Millipore, 70746-3) y 1 mg/ml de

lisozima recombinante. Las células resuspendidas se lisaron usando un disruptor de células Constant Systems a 25 kpsi y se aclararon por centrifugación a 75,000 xg durante 2 horas a 4°C. La IL-33 se purificó del sobrenadante mediante cromatografía de afinidad de níquel en fosfato de sodio 50 mM, pH 8.0, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, beta-mercaptoetanol 5 mM, eluyendo en fosfato de sodio 50 mM, pH 8.0, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM, beta-mercaptoetanol 5 mM. La proteína eluida se incubó con proteasa TEV y se dializó en fosfato de sodio 50 mM, pH 8.0, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, beta-mercaptoetanol 5 mM a 4°C. La proteína desmarcada se separó de la IL-33 no escindida mediante cromatografía de afinidad de níquel en fosfato de sodio 50 mM, pH 8.0, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, beta-mercaptoetanol 5 mM. La IL-33 se purificó adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaños usando una columna HiLoad 16/60 Superdex 75 (GE Healthcare) en fosfato de sodio 20 mM, pH 6.5, NaCl 100 mM, beta-mercaptoetanol 5 mM, usando un sistema FPLC AKTAxpress (GE Healthcare). Las fracciones de los picos se analizaron mediante SDS-PAGE.

Las fracciones que contenían IL-33 pura se agruparon y se midió la concentración mediante medición en un Nanodrop A280. La proteína se concentró usando un concentrador centrífugo con un corte de peso molecular de 10,000 Amicon hasta una concentración final de 9.5 mg/ml para el análisis por NMR.

La proteína purificada marcada con ^{15}N en PBS a pH 7.4 se incubó con medio IMDM al 60% a una concentración final de proteína de 0.28 mg/ml durante 18 horas a 37°C. Después de 18 horas, la proteína se concentró usando un concentrador centrífugo con un corte de peso molecular de

10,000 Amicon hasta una concentración de 0.8 mg/ml. Después, se purificó la proteína mediante cromatografía de exclusión por tamaños usando una HiLoad 16/60 Superdex 75 en PBS a pH 7.4. Las fracciones de pico se analizaron mediante SDS-PAGE y las fracciones puras no agregadas se agruparon. Finalmente, la proteína se concentró usando un concentrador centrífugo con un corte de peso molecular de 10,000 Amicon hasta una concentración de 1.8 mg/ml (100µM) para el análisis por NMR.

Análisis por NMR

Los espectros de NMR se registraron a 298 K en un espectrómetro Bruker Advance a 600 MHz funcionando con Topspin 2.3 equipado con una criosonda TCI de 5 mm con gradientes de eje Z. La muestra de IL-33 de TS marcada con ^{15}N se preparó del modo descrito con la adición de óxido de deuterio al 5% para permitir el bloqueo de la muestra. Los espectros de correlación ^{1}H-^{15}N ejemplificados se adquirieron empleando la secuencia de pulso muy rápido de HMQC *(Schanda, P; Brutscher, B; Very fast two-dimensional NMR spectroscopy for real-time investigation of dynamic events in proteins on the time scale of seconds, J. Am. Chem. Soc. (2005)* ***127****, 8014-5)* con puntos complejos de 1024x64 (F2xF1) (en modo states-TPPI), anchura de barrido de 9615x1460 Hz, tiempos de adquisición de 53.4 ms x 43.8 ms.

La figura 22A muestra el análisis por SDS-PAGE de IL-33 TS tratada con IMDM. La SDS-PAGE muestra la IL-33 TS tratada con IMDM reducida y no reducida antes y después de la concentración para la NMR.

La figura 22B muestra el análisis de NMR de IL-33 TS. La superposición de los espectros de HMQC de ^{1}H-^{15}N para IL-

33 TS marcada con ^{15}N 0.1 mM antes y después del tratamiento con medio IMDM se representan en negro y rojo, respectivamente. La comparación de los dos espectros indica una estructura completamente diferente y menos ordenada después del tratamiento con IMDM.

Espectroscopía de dicroísmo circular (CD).

Para confirmar el cambio conformacional e investigar más, se llevó a cabo un análisis por espectroscopía de dicroísmo circular (CD).

Se llevó a cabo un análisis de CD de UV lejano y UV cercano en un instrumento Jasco-815 (Easton, Maryland). Para el CD de UV lejano, se registraron los espectros frente a un intervalo de longitud de onda de 180-260 nm en una cubeta con una longitud de paso de 1 mm a una concentración de muestra de 0.14 mg/ml y 0.12 mg/ml para, respectivamente, redIL-33 y DSB IL-33 a 20 °C en solución de tampón de fosfato 10mM, pH = 6.9. Para el CD de UV cercano, se registraron los espectros frente a un intervalo de longitud de onda de 260-350 nm en una cubeta con una longitud de paso de 10 mm a una concentración de muestra de 1.38 mg/ml y 0.89 mg/ml para, respectivamente, redIL-33 y DSB IL-33 a 20 °C en solución de tampón DPBS. Los espectros de CD de la solución de tampón se registraron y restaron de todos los espectros de muestra para corregir respecto de los efectos del instrumento, la cubeta y los basales. Se empleó el programa informático Pro para CD para la desconvolución de los espectros en elementos de estructura secundaria.

Figura 22C: Espectroscopía de dicroísmo circular (CD) de UV cercano. Los espectros se registraron frente a un intervalo de longitud de onda de 260-350 nm. Los espectros

finales fueron el promedio de 4 escaneos. Los aminoácidos aromáticos y las bandas de absorción de disulfuro se adaptaron de Kelly *(Kelly S. M. et al. How to study proteins by Circular Dichroism. Biochimica et Biophysica Acta, 1751, 119-139 (2005)).* La diferencia observada en la elipticidad alrededor de la absorción de Trp es coherente con el cambio en el ambiente del único triptófano (W193), lo que demuestra cambios en la estructura terciaria de esta región entre IL-33 reducida y DSB. La diferencia en la intensidad alrededor de 260nm es coherente con la introducción de cromóforos adicionales procedentes de la formación de enlaces disulfuro.

Figura 22D: Características clave de IL-33. Trp193, las cisteínas y el sitio de unión a ST2 *(Liu, X. et al. Structural insights into the interaction of IL-33 with its receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, 14918-14923 (2013)*) se indican dentro de la estructura resuelta de IL-33 (*Lingel 2009*)

Figura 22E: Espectroscopía de dicroísmo circular (CD) de UV lejano. Los espectros se registraron frente a un intervalo de longitud de onda de 190-260 nm. Los espectros finales fueron el promedio de 8 escaneos. Los espectros de UV lejano son coherentes con las estructuras secundarias predominantemente de β lámina, como se había observado previamente con esta familia de proteínas (*Chang B. S. et al, Formation of an active dimer during storage of interleukin-1 receptor antagonist in aqueous solution. Biophysical Journal. 71, 3399-3406 (1996); Craig S. et al. Conformation, Stability and folding of Interleukin1β. Biochemistry. 26, 3570-3576 (1987); Hailey K.L. et al. Pro-interleukin (IL)-1β shares a core region of stability as*

compared with mature IL-1β while maintaining a distinctly different configurational landscape. J. Biol. Chem. 284. 26137-26148 (2009); Hazudat D. et al. Purification and characterisation of Human Recombinant Precursor Interleukin 1β. J. Biol. Chem. 264, 1689-1693 (1989); Meyers C.A. et al, Purification and characterization of Human recombinant interleukin-1β. J. Biol. Chem. 262, 11176-11181 (1987)). Los espectros son significativamente diferentes, lo que demuestra un cambio en la estructura secundaria en DSB IL-33, en relación con IL-33 reducida.

Los espectros de CD indicaron un cambio conformacional significativo entre las formas de IL-33. Los espectros de redIL-33 fueron coherentes con los datos publicados. Los espectros de DSB-IL-33 fueron coherentes con una proteína estructurada que era diferente a la forma reducida. Para mapear las áreas que pueden verse más alteradas entre IL-33 reducida y DSB, los presentes inventores efectuaron una espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno/deuterio.

Espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno/deuterio (HDX-MS).

Las proteínas se diluyeron a 3.5 uM en suero salino tamponado con fosfato, pH 7.4. Esta solución madre se usó para iniciar los experimentos de marcado diluyéndola 10 veces con disolvente acuoso deuterado (fosfato de sodio 10 mM, pH 6.6). Se llevaron a cabo experimentos de mapeo iniciales para asignar especies de los espectros de masas a secuencias pépticas de péptido de IL-33. Esto se llevó a cabo en gran medida del modo descrito[21]. En resumen, la proteína diluida protonada se mezcló a razón de 1:1 con una solución de inactivación (fosfato potásico 100 mM, pH 2.55,

TCEP 0.1 M, 1°C) de tal forma que el pH de la mezcla final era de 2.55. La proteína inactivada se inyectó en un dispositivo Waters HDX Manager con una columna de pepsina inmovilizada (2.0x30 mm; Poroszyme, Life Technologies), una columna de atrapamiento C18 (VanGuard ACQUITY BEH 2.1x5 mm; Waters) y una columna analítica C18 (ACQUITY BEH 1.0x100 mm; Waters). Las fases móviles fueron ácido fórmico al 0.1% en H2O (A) y ácido fórmico al 0.1% en ACN (B), de tal forma que su pH era de 2.55. La proteína se aplicó a las columnas de pepsina y de atrapamiento en 100 µl/min de tampón A y se eluyó de la columna analítica en un gradiente lineal de 3-40 % de B a 40 µl/min. Las secuencias de péptido se asignaron a partir de los datos del fragmento MSE con Protein Lynx Global Server (Waters) 3.0.2 y DynamX 3.0 (Waters). Los datos de marcaje se adquirieron como para la secuenciación, salvo que el espectrómetro de masas se configuró solo para escaneos de MS. Los datos a nivel de péptido se analizaron en DynamX y MatLab (Mathworks).

La figura 23 muestra el análisis por espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno (HX-MS) de IL-33 reducida y DSB. **La figura 23A** es una comparación del intercambio fraccional de hidrógeno (para deuterio) en IL-33 reducida (panel izquierdo) y DSB IL-33 (panel derecho). Los datos se mapean sobre la estructura publicada de IL-33 (lingel 2009) en ambos casos por comparación. Los huecos en la cobertura de secuencia donde no pudieron obtenerse datos de HX-MS se resaltan en color azul teja. Las cadenas laterales de los restos de cisteína se presentan como barras. **La figura 23B** muestra un modelo estructural de os datos de HX-MS diferenciales superpuestos con el sitio de unión a ST2 (rojo y magenta).(Liu 2013) El color azul oscuro indica

regiones con aumento de intercambio de hidrógeno en DSB IL-33 en relación con IL-33 reducida. El sitio 1 de unión a ST2 se encuentra en la zona de mayor diferencia en el intercambio de H/D y probablemente se ha alterado en cuanto a su estructura.

Unión de IL-33 reducida frente a DSB a ST2 (BIAcore)

Probablemente, la IL-33 unida por disulfuro tiene una estructura muy diferente a la forma reducida de IL-33 de unión a ST2 (**Figura 22, 23**) y la conversón a la forma unida por disulfuro se asoció con una pérdida de actividad funcional (**Figura 17C**). Para investigar esto, se ensayó la forma de IL-33 unida por disulfuro respecto de su capacidad para unirse a ST2 mediante análisis BIAcore. La unión directa de IL-33 al dominio extracelular de ST2 se determinó mediante resonancia de plasmó superficial usando un instrumento BIAcore 2000 (GE Healthcare). Se inmovilizó ST2 mediante el marcador de Fc usando una captura de anti-Fc humano (GE Healthcare, BR-1003-39) sobre una microplaca sensora CM5 (GE Healthcare, BR-1003-99) para dar una superficie estable de aproximadamente 150 UR. Se hizo fluir IL-33 sobre la superficie a 30ul/min durante tres minutos para determinar las velocidades de asociación. La disociación se midió haciendo fluir tampón a 30 ul/min durante 15 minutos. Los sensogramas se interpretaron usando el programa informático BIAevaluation y la cinética se determinó usando sensogramas restados de doble referencia usando un modelo de unión 1:1 (Langmuir).

La figura 24A muestra la unión de redIL-33 a ST2. Se muestran sensogramas de 7.8 nM a 0.24 nM, dando una KD de 0.2 nM.

La figura 24B muestra la unión de IL-33 unida por disulfuro (IL-33-DSB) a ST2. Se muestran sensogramas de 500 nM a 0.24 nM, no observándose una unión evidente.

La pérdida de unión a ST2 y de actividad provocó que los presentes inventores barajasen la hipótesis de que la oxidación podría ser un mecanismo para terminar la actividad de IL-33 y limitar la duración de las respuestas inmunológicas dependientes de ST2 *in vivo*.

Detección de formas de IL-33

Para determinar si la forma unida por disulfuro de IL-33 existe de hecho *in vivo*, los presentes inventores usaron tres ensayos diferentes de detección de IL-33 (2 para IL-33 human y uno para IL-33 de ratón). Los ELISA Duoset para IL-33 humana y de ratón (R&D Systems) se convirtieron a formato MSD (Meso Scale Discovery, Rockville, MD). Las concentraciones de recubrimiento de los anticuerpos de captura fueron las siguientes: pAb anti-IL-33 de ratón 37.5 ug/ml; pAb anti-IL-33 humana 18 ug/ml. El anticuerpo de captura se diluyó en PBS con Triton X-100 al 0.03% y se recubrieron en puntos 5µl sobre placas de unión convencionales (Meso Scale Discovery, Rockville, MD) en el centro de cada pocillo y se dejaron secar durante una noche a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3x en PBS-Tween y se bloquearon con 25 µl de diluyente de ensayo sellando las placas e incubándolas durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación (450 rpm). Se transfirieron 25 µl de muestras o de calibrador diluidas en diluyente de ensayo a las placas de ensayo bloqueadas, que se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación (450 rpm). Las placas se lavaron 3x en PBS-Tween y 25 µl de reactivo de detección (anticuerpo de detección

más estreptavidina SulfoTag, ambos diluidos a 1 µg/ml en diluyente de anticuerpo). Las placas se sellaron e incubaron durante 1 hora a TA con agitación. Las placas se lavaron 3x en PBS-Tween. Se añadieron 150 µl de tampón T de lectura diluido a 2X en agua destilada. Las placas se leyeron en 15 minutos (Meso Scale Discovery, Rockville, MD).

Se llevó a cabo el ensayo de IL-33 humana de Millipore (n.° de cat. HTH17MAG-14K, lote 2159117) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se diluyeron los patrones y las muestras de IL-33 en tampón de ensayo y se incubaron con perlas durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación (500 rpm), resguardadas de la luz. Se retiró el contenido de los pocillos y se lavaron 2x con 200 ul de tampón de lavado. Se añadieron 25 ul de anticuerpo de detección por pocillo y se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadieron 25 ul de estreptavidina-PE (sin lavado) y se incubaron las placas durante 30 minutos adicionales, con agitación (850 rpm) y resguardadas de la luz. Se retiró el contenido de los pocillos y se lavaron 2x con 200 ul de tampón de lavado. Las muestras se resuspendieron en 125 ul de tampón de ensayo, se cubrieron y se agitaron a 850 rpm durante 30 segundos. Las muestras se analizaron en Bio-Plex 200 (BioRad). La placa se leyó a bajo RP1, contando 50 perlas por región (región 44) con ventanas lógicas de detección de dupletes ajustadas a 5000 (baja) y 25000 (alta).

La figura 25 muestra el análisis de tres ensayos ELISA para IL-33 comerciales para la detección de las formas de IL-33 reducida y unida por disulfuro. También se muestra el efecto de ST2 en la interferencia con la señal del ensayo

para las formas tanto reducidas como unidas por disulfuro. **La figura 25A y B** muestra que los dos ensayos comerciales para IL-33 humana detectan predominantemente la forma unida por disulfuro de IL-33 (IL-33-DSB), lo que sugiere que esta es la especie principal que los demás han medido hasta la fecha en muestras *ex vivo* humanas. La señal de ensayo de IL-33 "reducida" pero no la de oxidada/unida por disulfuro puede eliminarse mediante la adición de sST2. **La figura 25C** muestra el ensayo de IL-33 de ratón que detecta las formas tanto reducidas como oxidadas de IL-33 de ratón. La señal de ensayo de IL-33 "reducida" pero no la de oxidada puede eliminarse mediante la adición de sST2.

Debido a que los presentes inventores no pudieron identificar un ensayo comercial específico para la forma reducida, activa en ST2 de IL-33 humana, estos desarrollaron sus propios ensayos novedosos. El mAb IL330425 (SEQ ID NO: 62 y 67) o el mAb IL330004 (SEQ ID NO: 12 y 17) se usaron como anticuerpos de captura. La IL-33 capturada se detectó con sST2.Fc biotinilado (R&D Systems) o IL330425 biotinilado (SEQ ID NO: 62 y 67), respectivamente. El anticuerpo de captura se diluyó a 150 ug/ml en PBS con Triton X-100 al 0.03% y se recubrieron en puntos 5 µl sobre placas de unión convencionales (Meso Scale Discovery, Rockville, MD) en el centro de cada pocillo y se dejaron secar durante una noche a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3x en PBS-Tween y se bloquearon con 25µl de diluyente de ensayo sellando las placas e incubándolas durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación (450 rpm). Se transfirieron 25 µl de muestras o de calibrador diluidas en diluyente de ensayo a las placas de ensayo bloqueadas, que se incubaron durante 2

horas a temperatura ambiente con agitación (450 rpm). Las placas se lavaron 3X en PBS-Tween y 25 µl de reactivo de detección (anticuerpo de detección más estreptavidina SulfoTag, ambos diluidos a 1 µg/ml en diluyente de anticuerpo). Las placas se sellaron e incubaron durante 1 hora a TA con agitación. Las placas se lavaron 3x en PBS-Tween. Se añadieron 150 µl de tampón T de lectura diluido a 2X en agua destilada. Las placas se leyeron en 15 minutos (Meso Scale Discovery, Rockville, MD).

La figura 26A, B muestra ensayos ELISA que son específicos para la detección de IL-33 reducida. No se observó detección de la forma unida por disulfuro.

Transcurso de tiempo de la conversión en la forma unida por disulfuro de IL-33

Se usaron ensayos que detectan diferentes formas de IL-33 como se han descrito anteriormente para monitorizar un transcurso temporal de la conversión de redIL-33 en su forma unida por disulfuro. Se incubaron 10 ug/ml de redIL-33 desmarcada en suero humano al 100%, PBS/BSA al 1% o IMDM/BSA al 1% a 37°C. En los instantes t=0, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas y 24 horas se extrajo una alícuota de 10 ul y se añadió a 90 ul de PBS/BSA al 1% (dilución de 1 en 10 a 1 ug/ml), esta se dividió en alícuotas de 3 x 30 ul y se congeló inmediatamente sobre hielo seco a -80°C antes de su almacenamiento. También se preparó una muestra fresca en t=0 inmediatamente antes del análisis ELISA como control para el ciclo de congelación/descongelación. Las muestras se analizaron usando el MSD humano (R&D Systems) y los ensayos de IL33004/IL330425-biotina descritos anteriormente para medir la IL-33 unida por disulfuro y reducida,

respectivamente. En su conjunto, estos ensayos permitieron el control de la conversión de la forma reducida a la unida por disulfuro de IL-33.

Para confirmar el resultado de los ELISA, se analizó por transferencia de Western la IL-33 en las muestras del trascurso de tiempo. Las muestras se sometieron a SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras. Las muestras se prepararon en tampón de carga de gel NuPAGE 1x (Invitrogen) y se desnaturalizaron a 90ºC durante 3 minutos. Las muestras reducidas contenían beta-mercaptoetanol al 2%. Las muestras se ejecutaron en minigeles NuPAGE Novex con Bis-Tris al 12% (Invitrogen) con tampón de ejecución MOPS (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras reducidas y no reducidas se ejecutaron en geles separados. Se cargaron 100 pg de IL-33 por carril. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulsoa (Invitrogen, n.º de cat. IB3010-02) y se detectaron mediante transferencia de Western con pAb anti-IL-33 (R&D Systems).

La figura 27 muestra un transcurso temporal de IL-33 humana incubada en IMDM o suero humano. **Figura 27A:** Se usaron ELISA de IL-33 (ensayos MSD de IL33004/IL330425-biotina y de humana de R&D Systems) para detectar IL-33 reducida y unida por disulfuro, respectivamente. **Figura 27B:** Se usó análisis de transferencia de Western para detectar las formas de IL-33 reducidas y unidas por disulfuro. La conversión a la forma unida por disulfuro de IL-33 se produjo rápidamente, con una conversión del 50% en 1-2 horas. La desaparición de IL-33 reducida se correlacionó bien con la aparición de IL-33 oxidada en los análisis tanto ELISA como de transferencia de Western.

Generación de un ratón transgénico humanizado para IL-33

Para estudiar el comportamiento y el ciclo vital de la IL-33 endógena, los presentes inventores usaron un ratón transgénico con el gen para IL-33 de ratón reemplazado por el gen para IL-33 humana. Los ratones transgénicos humanizados para IL-33 se generaron como se describe más adelante. En resumen, se combinaron fragmentos genómicos de ratón (obtenidos de la biblioteca RPCIB-731 BAC de C57BL/6J), un fragmento genómico humano (obtenido de la biblioteca RPCIB-753 BAC humana) y características seleccionadas (tales como sitios de recombinación y marcadores de selección) para producir el vector de direccionamiento (datos no mostrados).

El vector de direccionamiento se linealizó con BstBI y se electroporó en la línea celular de ES de Balb/cJ de TaconicArtemis (Balb/c.2) y los clones de células ES se seleccionaron con puromicina (selección positiva) y ganciclovir (selección negativa). Los clones resultantes de células ES resistentes a la puromicina se exploraron mediante una combinación de análisis PCR y de Southern para identificar los clones de ES dirigidos de manera correcta. Estos se expandieron y congelaron en nitrógeno líquido.

Después de la administración de hormonas, se emparejó a hembras de C57BL/6 superovuladas con machos C57BL/6. Se aislaron los blastocistos del útero en el dpc 3.5. Para la microinyección, se colocaron los blastocistos en una gota de DMEM con FCS al 15% bajo aceite mineral. Se usó una pipeta para microinyección de activación piezoeléctica de punta plana, con un diámetro interno de 12 - 15 micrómetros para inyectar 10-15 células ES de BALB/c dirigidas en cada

blastocisto. Después de la recuperación, se transfirieron 8 blastocistos inyectados a cada cuerno uterino de ratas NMRI seudogestantes de 2.5 días después del coito. El quimerismo se midió en quimeras (G0) por la contribución al color del pelaje de las células ES al hospedador de C57BL/6 (blanco/negro). Se cruzaron los ratones altamente quiméricos con hembras de la raza BALB/cJBomTAC mutantes respecto de la presencia de un gen de recombinasa Flp (cepa eliminadora de Flp). Se identificó la transmisión a través de la línea germinal por el color del pelaje por la presencia de descendencia de color blanco re la raza BALB/c (G1). La transmisión real de la línea germinal se confirmó por genotipado PCR usando cebadores específicos para el alelo diana (datos no mostrados).

Existencia de formas redox de IL-33 *in vivo*.

Se han descrito con anterioridad modelos de inflamación de las vías respiratorias en ratones inducida por *Alternaria alternata* (*Kouzaki et al. J. Immunol. 2011, 186: 4375-4387; Bartemes et al J Immunol, 2012, 188: 1503-1513*). Se anestesió brevemente a ratones macho o hembra de tipo silvestre o humanizados para IL-33 (de 6-10 semanas) con isofluorano y se les administró 25 µg de extracto de *Alternaria alternata* (ALT) (Greer, Lenoir, NC) o vehículo por vía intranasal en un volumen total de 50 µl. En múltiples instantes después de la exposición a ALT, se sedó terminalmente a los ratones con pentobarbital sódico antes del lavado broncoalveolar (BAL). Se recogió fluido del lavado broncoalveolar (BALF) mediante lavado (0.3 ml, 0.3 ml y 0.4 ml) mediante una cánula traqueal. El BALF se centrifugó y se analizó el sobrenadante respecto de la presencia de formas redox de IL-33 usando los ensayos

descritos anteriormente. Todo el trabajo se llevó a cabo según las normas éticas y de cría del Ministerio del Interior del Reino Unido bajo la autoridad de una licencia de proyecto adecuada.

La figura 28 muestra el análisis de BALF de ratones humanizados para IL-33 recogido en varios instantes después de la exposición intranasal a ALT, usando una combinación de múltiples ensayos ELISA. Se usaron ensayos de (**A**) Millipore, (**B**) R&D Systems y (**C**) IL330425/sST2-biotina para medir IL-33 en presencia o ausencia de sST2 (gráficas a la izquierda). Las señales en presencia de sST2 (con eliminación de la señal de la fracción de IL-33 reducida) se compararon con un patrón de IL-33 unida por disulfuro para cuantificar los niveles de IL-33 unida por disulfuro. La señal de IL-33 reducida se calculó como la diferencia en la señal entre las mediciones de IL-33 en presencia y ausencia de ST2, cuantificadas frente a un patrón de IL-33 reducida. Las estimaciones para IL-33 reducida se muestran en las gráficas de la derecha. Todos los ensayos demuestran que la IL-33 liberada se encontraba predominantemente en su forma reducida, con un máximo entre los 5 y los 30 minutos, seguido de una rápida reducción que la convierte en indetectable a los 120 minutos. Por el contrario, IL-33-DSB aumentó gradualmente desde el instante 0, alcanzando un máximo a los 30-120 minutos y desapareciendo transcurridas 24 horas. Estos datos son coherentes con un modelo donde la IL-33 se libera en forma reducida y después se oxida rápidamente *in vivo* en IL-33-DSB.

La figura 29 muestra el análisis de BALF de ratones BALB/c de tipo silvestre recogido en diversos instantes de tiempo después de la exposición intranasal a ALT. **La figura**

29A muestra que se usó ELISA para IL-33 de ratón (R&D Systems) para medir IL-33 en presencia o ausencia de sST2 (IL-33 de ratón tratada con medio usada como curva patrón). **La figura 29B** muestra que las señales en presencia de sST2 (con eliminación de la señal de la fracción de IL-33 reducida) se compararon con un patrón de IL-33 de ratón tratada con medio para cuantificar los niveles de IL-33 oxidada. La señal de IL-33 reducida se calculó como la diferencia en la señal entre las mediciones de IL-33 en presencia y ausencia de ST2, cuantificadas frente a un patrón de IL-33 de ratón reducida. Los datos demuestran que la IL-33 liberada se encontraba predominantemente en su forma reducida, alcanzando un máximo a los 15 minutos, seguido de una rápida reducción que la convierte en indetectable a los 120 minutos. Por el contrario, IL-33-DSB aumentó gradualmente desde el instante 0, alcanzando un máximo a los 45-60 minutos y desapareciendo transcurridas 24 horas. Estos datos son coherentes con un modelo donde la IL-33 se libera en forma reducida y después se oxida rápidamente *in vivo* en IL-33-DSB.

Ejemplo 5 Caracterización de anticuerpos anti-IL-33

H338L293 provoca un cambio conformacional

El anticuerpo monoclonal H338L293 (SEQ ID NO: 182 y 187), cuya generación se describe en los ejemplos 2 y 3, es un modulador alostérico de la IL-33. La IL-33 puede cambiar de conformación de manera significativa en una forma unida por disulfuro (como se describe en el ejemplo 4). Los siguientes experimentos demuestran que el mAb H338L293 parece desestabilizar la molécula de IL-33, favoreciendo su desplegamiento y acelerado su conversión a la forma unida por disulfuro. Los reactivos y las modificaciones de

proteína usadas en el este caso fueron como se han descrito en ejemplos anteriores.

Ensayo de naranja Sypro

El naranja Sypro se une de manera no específica a superficies hidrófobas y el agua inactiva fuertemente la fluorescencia del naranja Sypro. Cuando se despliega una proteína, las superficies hidrófobas expuestas se unen al colorante, dando como resultado un aumento de la fluorescencia. Se incubaron 5uM de anticuerpo con 20uM de redIL-33 a 25°C en presencia de colorante naranja SYPRO 8x diluido a partir de una solución madre 5000x (Life Technologies S-6650) en 1xDPBS. La fluorescencia (excitación a 490nm y emisión a 575nm) se midió cada minuto usando un detector en tiempo real Chromo4 (Bio-Rad). Los presentes inventores observaron que incubando redIL-33 con el anticuerpo H338L293 y no redIL-33 o anticuerpo solos, se produjo un aumento en la señal de fluorescencia, indicativa de un desplegamiento de la proteína.

La figura 30A muestra las unidades relativas de fluorescencia a los 100 minutos después de la incubación de 5uM de anticuerpo con 20uM de redIL33 a 25°C en presencia de colorante naranja SYPRO 8x. En presencia de redIL-33, H338L293, pero no IL330004 o el mAb de control, aumentó la señal de fluorescencia, indicativa de desplegamiento de la proteína.

La figura 30B muestra las unidades relativas de fluorescencia con el paso del tiempo después de la incubación de diversas concentraciones de H338L293 con 20uM de redIL33 a 25°C en presencia de colorante naranja SYPRO 8x. La señal de fluorescencia aumentó con el aumento de la concentración de anticuerpo.

Electroforesis SDS-PAGE

Para determinar si H338L293 podría tener influencia en la formación de enlaces disulfuro de IL-33, se controló la IL-33 en presencia de H338L293 comparando el análisis de SDS-PAGE reducido y no reducido. Se incubaron 100 ug/ml de $IL\text{-}33^{112\text{-}270}$ (BK349) humana recombinante en PBS/BSA al 0.1% que contenía 1.5 mg/ml de mAb H338L293, de mAb NIP228 o sin adición de mAb. Las muestras se incubaron durante 20 h a 37°C en un incubador para cultivo tisular convencional. Las muestras que contenían 1ug de IL-33 se analizaron mediante SDS-PAGE en minigeles NuPAGE Novex con Bis-Tris al 12% (Invitrogen) en condiciones reductoras y no reductoras. Después, los geles de SDS-PAGE se lavaron 3 x 5 min en ddH2O, se incubaron en EzBlue (Sigma G1041, un tinte a base de proteínas de azul brillante de Coomassie G-250) durante 1 h y se destiñeron en ddH2O hasta que el fondo del gel era transparente. Todas las etapas de tinción del gel se llevaron a cabo a temperatura ambiente en una plataforma oscilante. Los geles se visualizaron usando un escáner digital Epsom.

La figura 30C muestra el análisis de SDS-PAGE de IL-33. La preincubación de IL-33 con H338L293, pero no con mAb de control o sin mAb, aumentó la presencia de la forma unida por disulfuro de migración más rápida de IL-33 en condiciones no reductoras.

Inhibición de la señalización de NFκB en HUVEC por IgG

Se evaluó la señalización de NFκB en células endoteliales de la vena umbilical humana en respuesta a IL-33 mediante translocación nuclear de la subunidad p65/RelA de NFκB, detectada por tinción de inmunofluorescencia como se ha descrito en el ejemplo 1. Las células se estimularon

con diversas concentraciones de IL-33 en presencia de múltiples concentraciones del anticuerpo de ensayo, H338L293, durante 30 minutos o 6 horas.

La figura 31 muestra el efecto de H338L293 en la translocación de NFκB estimulada por IL-33 en HUVEC. Estos resultados demuestran que, como se había observado previamente, H338L293 no inhibió la translocación nuclear de p65/RelA NFκB en HUVEC estimuladas con IL-33 30 minutos después de la estimulación. Sin embargo, tras 6 horas se observó la inhibición. Los resultados son coherentes con la incapacidad de H338L293 para inhibir la unión de IL-33 a ST2 de manera directa pero su capacidad para convertir la IL-33 en una forma no de unión a ST2 pasadas unas horas.

Inhibición de la unión de IL-33 a ST2 mediante IgG purificada

Se evaluó la capacidad de H338L293 para inhibir la unión de IL-33 marcada con FLAG®-His al receptor ST2 en un ensayo bioquímico de competición HTRF® (fluorescencia homogénea resuelta en tiempo, Cisbio International) como se ha descrito en el ejemplo 1. Se probaron dos condiciones. En primer lugar, se añadieron simultáneamente el anticuerpo y la IL-33 al ensayo exactamente como en el ejemplo 1. Como en el caso anterior, las preparaciones de IgG purificadas no fueron capaces de inhibir la interacción IL-33:ST2 a las concentraciones ensayadas. En segundo lugar, se incubó H338L293 con la IL-33 FLAG®His durante 18 horas antes de su adición al ensayo. En este caso, se observó una inhibición dependiente de la concentración de la unión de IL-33:ST2. Tomados conjuntamente, estos datos son coherentes con la conversión por H338L293 de IL-33 en una forma no de unión a ST2 con el paso del tiempo.

La figura 32 muestra la inhibición de la señal de FRET, producida por la unión de IL-33 humana a ST2 humano con concentraciones crecientes de H338L293, en donde el eje x es la concentración de anticuerpo en concentración molar y el eje y es el porcentaje de unión específica. Estos resultados demuestran que H338L293 inhibe la unión de IL-33 a ST2 únicamente tras una preincubación prolongada con el ligando.

Mapeo de epítopos

Se intentó mapear los epítopos de la IgG H338L293 para aclarar el modo de unión de la IL-33 a esta IgG. Se llevaron a cabo experimentos de cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) para observar la formación de complejos IL-33:IgG. Se equilibró una columna BioSep-SES-S 2000 (300 x 7.4 mm, s/n 550331-4) con PBS de Dulbecco a 0.5 ml min^{-1} en una HPLC Agilent HP1100. Los picos se detectaron usando la señal a 280 nM de un detector de matriz de diodos (DAD). Estos estudios confirmaron que la formación de complejos anticuerpo-antígeno era bastante lenta, tardando al menos varias horas. Una vez se había dejado transcurrir un tiempo suficiente para la completa formación de complejos, se añadió tripsina a los complejos de IL-33:IgG preformados, seguido de análisis SEC. Una digestión de 36 min con tripsina dio lugar a un aumento en el tiempo de retención del pico principal hasta 14.1 minutos (intermedio entre el tiempo de elución del pico de complejo no tratado (13.6 min) y la elución de la IgG intacta H338L292 (14.4 min)). Después, se usaron métodos de espectrometría de masas para identificar el epítopo mínimo de la IgG H338L293. Las masas observadas en la MS MALDI-TOF Shimadzu del pico capturado a los 14.1 min fueron de 3,209 y 4,485.3 Da. Las masas

observadas en la MS MALDI-TOF ABI4800 fueron un pico de 3,208.9 Da a alta intensidad con la presencia también de un pico secundario de 4,486.4 Da. La masa de ion precursor observada de 3206-3208 Da y el análisis de fragmentación por MS/MS ABI4800 de los iones precursores de 3,206 Da coincidieron con el fragmento tríptico de IL-33, MLMVTLSPTKDFWLHANNKEHSVELHK. Este se encuentra dentro de la secuencia primaria general de IL-33-Flag His10 humana recombinante (SEQ ID NO: 627) tal como se muestra a continuación:-

MSITGISPITEYLASLSTYNDQSITFALEDESYEIYVEDLKKDEKKDKVLLSYY ESQHPSNESGDGVDGKMLMVTLSPTKDFWLHANNKEHSVELHKCEKPLPDQAFFVLHNM HSNCVSFECKTDPGVFIGVKDNHLALIKVDSSENLCTENILFKLSETNPAFLYKVVGAA DYKDDDDKAAHHHHHHHHH

Después, se sintetizaron químicamente el péptido identificado junto con una variante truncada e (LSPTKDFWLHANNKEHSVELHK) y variantes desordenadas de ambos y se usaron en estudios de unión de confirmación en un BIAcore T100 (GE Healthcare). Se acopló covalentemente proteína G' (Sigma Aldrich, P4689) a la superficie de una microplaca sensora CM5 (GE Healthcare) usando reactivos de acoplamiento de amina convencionales según las instrucciones del fabricante. La superficie de proteína G' se usó para capturar H338L293 o ST2-Fc a través del dominio Fc para proporcionar una densidad de superficie de aproximadamente 290UR por ciclo. Se hicieron pasar los péptidos de IL-33 a un intervalo de concentraciones, preparados en tampón HBS-EP+, sobre la superficie de la microplaca sensora. La superficie se regeneró usando dos lavados con glicina 10mM a pH 1.7 y pH 1.5 entre cada inyección de anticuerpo. Los sensogramas resultantes se

evaluaron usando el programa informático de evaluación del BIAcore T100 2.0.3 (GE Healthcare) y se ajustaron a un modelo de unión de Langmuir 1:1 para proporcionar los datos de unión relativa.

El péptido de epítopo sintético de longitud completa se unión fuertemente a la IgG H338L293 pero no al receptor de IL-33 (ST2-Fc). Tanto el péptido de longitud completa como el sintético truncado se unieron fuertemente a H338L293, pero las versiones desordenadas de longitud completa y las truncadas no. Esto es una prueba sólida acerca de que el fragmento de IL-33 identificado mediante escisión del péptido no es un falso positivo y representa el núcleo del epítopo de H338L293. Se hizo fluir el péptido truncado a 0.625 - 20 nM sobre la IgG H338L293 para estimar la afinidad. Se obtuvieron ajustes 1:1 de buena calidad, proporcionando un valor de K_D de 2.36nM.

La figura 33 muestra el mapeo de epítopos de H338L293. El panel superior muestra el análisis SEC de complejos IL33:Igg con H338L293 y digestión posterior con tripsina. El panel inferior muestra el péptido truncado que se determinó que se unía fuertemente a H338L293, coloreado de negro dentro de la estructura de IL-33 descrita por Linger et al 2009.

Ejemplo 6 Mutantes de IL-33 de Cys→Ser

Para comprender el papel de las cuatro cisteínas libres de la IL-33 humana en su conversión a la forma unida por disulfuro, los presentes inventores generaron un panel completo de todos los posibles mutantes de Cys a Ser. La mayoría de estas moléculas de IL-33 mutantes mostraron una actividad inicial similar frente a ST2 en comparación con la IL-33 de tipo silvestre. Después de su incubación en

medio, los mutantes no mostraron una migración en gel más rápida, lo que es coherente con la incapacidad para formar 2 enlaces disulfuro. Sin embargo, la pérdida de potencia después del tratamiento con medio varió entre los mutantes.

Generación de panel de mutantes de cisteína a serina de IL-33

Se sintetizaron moléculas de ADNc que codifican el componente maduro de IL-33 humana (112-270); número de referencia (Swiss-Prot) O95760, y un serie de variantes con 1, 2, 3 o 4 restos de cisteína mutados a serina en todas las combinaciones (15 en total) mediante PCR de extensión de cebadores y se clonaron en pJexpress404 (DNA 2.0). Se modificaron las secuencias codificantes de IL-33 de tipo silvestre (TS) y mutantes para que contuviesen 10xhis, marcador Avi y sitio de escisión de proteasa de Factor-Xa (MHHHHHHHHHHAAGLNDIFEAQKIEWHEAAIEGR) en el extremo N-terminal de las proteínas.

El ADN que codificaba los mutantes de IL-33 se usó para transformar células de *E. coli* BL21 Gold. Las células transformadas se cultivaron a 37°C hasta que alcanzaron una DO600nm de 0.3 a 0.5. Después, se cultivaron los cultivos a 18°C hasta que alcanzaron una DO600nm de 0.6 a 0.8, momento en el cual se indujo la expresión de la proteína mediante la adición de IPTG 100mM. Los cultivos se continuaron a 18°C durante 20 horas adicionales antes de recoger las células por centrifugación y se almacenaron a -80°C.

Las células se resuspendieron en fosfato de sodio 50mM, pH 8.0, NaCl 300mM, imidazol 20mM, beta-mercaptoetanol 5mM que contenía comprimidos de inhibidor completo de proteasas (Roche, 11697498001), 2.5u/ml de nucleasa benzonasa (Merck Millipore, 70746-3) y 1mg/ml de

lisozima recombinante. Las células resuspendidas se lisaron usando un disruptor de células Constant Systems a 25kpsi y se aclararon por centrifugación a 75,000 xg durante 2 horas a 4°C. La IL-33 se purificó del sobrenadante mediante cromatografía de afinidad de níquel en fosfato de sodio 50mM, pH 8.0, NaCl 300mM, imidazol 20mM, beta-mercaptoetanol 5mM, eluyendo en fosfato de sodio 50mM, pH 8.0, NaCl 300mM, imidazol 250mM, beta-mercaptoetanol 5mM. La IL-33 se purificó adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaños usando una columna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) en suero salino tamponado con fosfato a pH 7.4. Las fracciones de los picos se analizaron mediante SDS-PAGE. Las fracciones que contenían IL-33 pura se agruparon y se midió la concentración mediante medición en un Nanodrop A280. Las muestras finales se analizaron mediante SDS-PAGE y espectrometría de masas intactas. La proteína se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido.

Tabla 17. Secuencias mutantes de IL-33

Mutante	**Posición 208**	**Posición 227**	**Posición 232**	**Posición 259**	**AA.112-270**
IL33-01	C	C	C	C	SEQ ID NO: 632
IL33-02	S	C	C	C	SEQ ID NO: 634
IL33-03	C	S	C	C	SEQ ID NO: 635
IL33-04	C	C	S	C	SEQ ID NO: 636

IL33-05	C	C	C	S	SEQ ID NO: 637
IL33-06	S	S	C	C	SEQ ID NO:638
IL33-07	C	C	S	S	SEQ ID NO: 639
IL33-08	S	C	S	C	SEQ ID NO: 640
IL33-09	C	S	C	S	SEQ ID NO: 641
IL33-10	C	S	S	C	SEQ ID NO: 642
IL33-11	S	C	C	S	SEQ ID NO: 643
IL33-12	S	S	S	C	SEQ ID NO: 644
IL33-13	S	S	C	S	SEQ ID NO: 645
IL33-14	S	C	S	S	SEQ ID NO: 646

IL33-15	C	S	S	S	SEQ ID NO: 647
IL33-16	S	S	S	S	SEQ ID NO: 648

Actividad de mutantes Cys→Ser de IL-33

Para comprobar la integridad, se midió la actividad de IL-33 de tipo silvestre no tratada (IL33-01) y delos mutantes de IL-33 en un ensayo de señalización dependiente de ST2. Se evaluó la señalización de NFκB en células endoteliales de la vena umbilical humana en respuesta a IL-33 mediante translocación nuclear de la subunidad p65/RelA de NFκB, detectada por tinción de inmunofluorescencia como se ha descrito en el ejemplo 1. Para investigar la pérdida de actividad después del tratamiento con medio de cultivo, se incubaron las proteínas 01-16 de IL-33 durante una noche en medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) y se evaluaron en comparación con las proteínas no tratadas.

Tabla 18. Actividad de mutantes de IL-33 en el ensayo de translocación de NFκB en HUVEC

Nombre	**Secuencia**	**CI_{50} (nM) No tratado**	**Pérdida de actividad después del tratamiento con IMDM**	**SECUENCIA**
IL33-01 (WT)	CCCC	0.13	+++	SEQ ID NO: 632
IL33-02	SCCC	0.19	++	SEQ ID NO: 634

IL33-03	CSCC	0.16	++	SEQ ID NO: 635
IL33-04	CCSC	0.17	+	SEQ ID NO: 636
IL33-05	CCCS	0.10	++	SEQ ID NO: 637
IL33-06	SSCC	0.28	+	SEQ ID NO:638
IL33-07	CCSS	0.22	+	SEQ ID NO: 639
IL33-08	SCSC	0.21	-	SEQ ID NO: 640
IL33-09	CSCS	0.20	++	SEQ ID NO: 641
IL33-10	CSSC	0.61	+	SEQ ID NO: 642
IL33-11	SCCS	0.49	+	SEQ ID NO: 643
IL33-12	SSSC	0.39	-	SEQ ID NO: 644

IL33-13	SSCS	0.08	+	SEQ ID NO: 645
IL33-14	SCSS	0.14	-	SEQ ID NO: 646
IL33-15	CSSS	0.12	-	SEQ ID NO: 647
IL33-16	SSSS	0.17	-	SEQ ID NO: 648

La figura 34 muestra la actividad de los mutantes de IL-33 antes y después del tratamiento durante 18 horas con IMDM. La IL-33 de tipo silvestre (IL33-01) que se había pretratado con medio de cultivo perdió completamente la actividad detectable. Todos los mutantes mostraron una menor pérdida de potencia que el TS. Algunos mutantes estaban completamente protegidos frente a la pérdida de potencia.

Liberación de citocinas por mastocitos humanos

Para ver si los mutantes eran más potentes a la hora de estimular las respuestas aguas abajo durante periodos de tiempo más prolongados *in vitro*, se usó un ensayo de producción de IL-6 en mastocitos durante una noche para medir la actividad de IL-33 humana de tipo silvestre y de los mutantes seleccionados. Los métodos de ensayo se describen en el ejemplo 2. Los datos se ejemplifican por la IL33-11.

La figura 35A muestra que IL33-11 tiene una mayor potencia que IL-33 TS para estimular la producción de IL-6 en mastocitos humanos. Se usaron IL33-01 (TS) e IL33-11 sin tratamiento previo para estimular la producción de IL-6 en mastocitos procedentes de sangre del cordón umbilical humano a diversas concentraciones, en donde el eje x es la concentración de IL-33 en concentración molar y el eje y es el nivel de IL-6 detectado en los sobrenadantes tras 18 horas.

Potencia *in vivo* de IL-33 mutante

Se anestesió a ratones BALB/c hembra (6-8 semanas) brevemente con isofluorano y se les administró 0.1-10ug de IL-33 humana de tipo silvestre(IL33-01, SEQ ID NO: 632), IL33-11 (SEQ ID NO: 643) o vehículo por vía intranasal en un volumen total de 50 µl. 24 horas después de la exposición, se sedó terminalmente a los ratones con pentobarbital sódico antes del lavado broncoalveolar (BAL). El BALF se recogió y analizó como se describe en el ejemplo 4.

La figura 35B muestra que la administración intranasal del doble mutante IL33-11 requirió únicamente una décima parte de la proteína para una respuesta de IL-5 dependiente de ST2 en comparación con IL-33 nativa. Esto es coherente con la actividad prolongada del mutante a diferencia de la inactivación más rápida de la IL-33 de tipo silvestre en el ambiente pulmonar del ratón.

Análisis NMR de IL33-11

Para investigar las diferencias conformacionales entre la proteína IL33-11 e IL-33 humana de tipo silvestre (IL33-01), se llevó a cabo un análisis NMR.

Producción de proteínas ^{15}N-IL-33

El ADN que codifica IL-33 de tipo silvestre con un marcador 6His N-terminal y un sitio de escisión de proteasa TEV (SEQ ID. 633) se usó para transformar células *E. coli* BL21 Gold. Las células transformadas se cultivaron a 37°C en medio mínimo M9 complementado con 5 g/l de polvo ^{15}N - IsoGro™ hasta que alcanzaron una DO600nm de 0.6 a 0.8, momento en el cual se indujo la expresión de la proteína mediante la adición de IPTG 100 mM. Los cultivos se continuaron a 18°C durante 20 horas adicionales antes de recoger las células por centrifugación y se almacenaron a -80°C. Las células se resuspendieron en fosfato de sodio 50 mM, pH 8.0, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, beta-mercaptoetanol 5 mM que contenía comprimidos de inhibidor completo de proteasas (Roche, 11697498001), 2.5 U/ml de nucleasa benzonasa (Merck Millipore, 70746-3) y 1 mg/ml de lisozima recombinante. Las células resuspendidas se lisaron usando un disruptor de células Constant Systems a 25 kpsi y se aclararon por centrifugación a 75,000 xg durante 2 horas a 4°C. La IL-33 se purificó del sobrenadante mediante cromatografía de afinidad de níquel en fosfato de sodio 50 mM, pH 8.0, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, beta-mercaptoetanol 5 mM, eluyendo en fosfato de sodio 50 mM, pH 8.0, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM, beta-mercaptoetanol 5 mM. La proteína eluida se incubó con proteasa TEV y se dializó en fosfato de sodio 50 mM, pH 8.0, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, beta-mercaptoetanol 5 mM a 4°C. La proteína desmarcada se separó de la IL-33 no escindida mediante cromatografía de afinidad de níquel en fosfato de sodio 50 mM, pH 8.0, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, beta-mercaptoetanol 5 mM. La IL-33 se purificó adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaños usando una

columna HiLoad 16/60 Superdex 75 (GE Healthcare) en fosfato de sodio 20 mM, pH 6.5, NaCl 100 mM, beta-mercaptoetanol 5 mM, usando un sistema FPLC AKTAxpress (GE Healthcare). Las fracciones de los picos se analizaron mediante SDS-PAGE. Las fracciones que contenían IL-33 pura se agruparon y se midió la concentración mediante medición en un Nanodrop A280. La proteína se concentró usando un concentrador centrífugo con un corte de peso molecular de 10,000 Amicon hasta una concentración final de 1.8 mg/ml (100µM) para el análisis por NMR.

Análisis por NMR

Los espectros de NMR se registraron a 298 K en un espectrómetro Bruker Advance a 600 MHz funcionando con Topspin 2.3 equipado con una criosonda TCI de 5 mm con gradientes de eje Z. La muestra de IL-33 de TS marcada con ^{15}N se preparó del modo descrito con la adición de óxido de deuterio al 5% para permitir el bloqueo de la muestra. Los espectros de correlación ^{1}H-^{15}N ejemplificados se adquirieron empleando la secuencia de pulso muy rápido de HMQC *(Schanda, P; Brutscher, B; Very fast two-dimensional NMR spectroscopy for real-time investigation of dynamic events in proteins on the time scale of seconds, J. Am. Chem. Soc. (2005)* ***127****, 8014-5)* con puntos complejos de 1024x64 (F2xF1) (en modo states-TPPI), anchura de barrido de 9615x1460 Hz, tiempos de adquisición de 53.4 ms x 43.8 ms.

La figura 36 muestra una superposición de los espectros HMQC de ^{1}H-^{15}N para IL33-01 e IL33-11 0.1 mM marcadas con ^{15}N representadas en negro y rojo, respectivamente. Se indica la asignación para restos relevantes. Los datos muestran cambios de pico

aproximadamente en C208 y C259, según se esperaba. Sin embargo, hay más cambios de picos de los esperados de T185 a A196, lo que podría indicar un cambio de conformación.

Ejemplo 7 Aislamiento e identificación de anticuerpos anti-IL-33 usando IL33-11

Las proteínas IL-33 mutantes de Cys→Ser estabilizan a la IL-33 en su forma reducida y tienen conformaciones diferentes a la de tipo silvestre (como se describe en el ejemplo 6). Las proteínas mutantes pueden proporcionar disponibilidad de diferentes epítopos para anticuerpos o una mayor longevidad/estabilidad de los epítopos y por lo tanto, pueden ser útiles para aislar anticuerpos neutralizantes para IL-33, en particular, para la forma reducida de IL-33. Este ejemplo usa la proteína mutante resistente a la oxidación, IL33-11, para aislar anticuerpos para IL-33 mediante presentación en fagos.

Proteínas recombinantes

La IL33-01 marcada en N-terminal con His10/marcador Avi (TS, SEQ ID NO: 632), la IL33-11 marcada en N-terminal con His10/marcador Avi (C208S, C259S, SEQ ID 643) y la IL-33 de cinomolgo marcada en N-terminal con His10/marcador Avi (SEQ ID 649), se generaron transformando células de *E. coli* BL21(DE3). Las células transformadas se cultivaron en medio de auto-inducción (Sistema 1 de autoinducción Overnight Express™, Merck Millipore, 71300-4) a 37°C durante 18 horas antes de recogerlas por centrifugación y se almacenaron a -20°C. Las células se resuspendieron en BugBuster (Merck Millipore, 70921-5), que contiene comprimidos de cóctel completo de inhibidor de proteasas (Roche, 11697498001), 2.5u/ml de nucleasa benzonasa (Merck Millipore, 70746-3) y 1mg/ml de lisozima recombinante. El

lisado celular se clarificó por centrifugación a 75,000 xg durante 2 horas a 4°C. Las proteínas IL-33 se purificaron a partir del sobrenadante mediante cromatografía de afinidad de níquel en fosfato sódico 50mM, pH 8.0, NaCl 300mM, imidazol 20mM, eluyendo en fosfato de sodio 50mM, pH 8.0, NaCl 300mM, imidazol 250mM. La IL-33 se purificó adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaños usando una columna Superdex 75 10/300 GL en suero salino tamponado con fosfato a pH 7.4. Las fracciones de los picos se analizaron mediante SDS-PAGE. Las fracciones que contenían IL-33 pura se agruparon y se midió la concentración mediante medición en un Nanodrop A280. Las muestras finales se analizaron mediante SDS-PAGE.

Se modificó el vector para ST2 humano descrito en el ejemplo 1 para que contuviese el ECD de ST2 humano con un marcador Flag-His C-terminal (SEQ ID NO: 650).

Tabla 19. Reactivos

Reactivo	**Proveedor**	**Número de catálogo/denominación**	**SEQ**
IL33-01 His10/Avi humana	Propia	PS-937	SEQ ID NO. 632
IL33-11 His10/Avi humana	Propia	PS-938	SEQ ID NO. 643
IL-33 His10/Avi de cinomolgo	Propia	CCH 3 de abril de 2014	SEQ ID NO. 649
IL-4Rα Flag®His	Propia	020629080	
Insulina bovina - biotina	Sigma	I2258	
ST2 Flag His	Propia	BK282	SEQ ID

humano			NO. 650
ST2.Fc humano	R&D Systems		

Modificaciones de proteínas

Las proteínas que contenían el motivo de secuencia de marcador Avi (GLNDIFEAQKIEWHE) se biotinilaron usando la enzima biotina ligasa (BirA) (Avidty, Bulk BirA) siguiendo el protocolo del fabricante. Todas las IgG y las proteínas modificadas sin marcador Avi usadas en el presente documento se biotinilaron a través de las aminas libres usando Sulfo-NHS-LC-Biotina EZ Link (Thermo/Pierce 21335) como se describe en el ejemplo 1.

Selecciones

Las selecciones se efectuaron esencialmente como se ha descrito en el ejemplo 1, pero usando la proteína mutante IL33-11 C208S, C259S. En resumen, se incubaron las partículas de scFv-fago con IL-33-11 recombinante biotinilada (biotinilada a través del marcador Avi). Las partículas se incubaron con IL33-11 recombinante biotinilada 100 nM durante 2 horas. Los scFv unidos a antígeno se capturaron posteriormente sobre perlas paramagnéticas recubiertas de estreptavidina (Dynabeads®, M-280) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El fago no unido se eliminó por lavado en una serie de ciclos de lavado usando PBS-Tween. Se eluyeron las partículas de fago retenidas sobre el antígeno, se utilizaron para infectar bacterias y se recuperaron para la siguiente ronda de selección. Se llevaron a cabo dos rondas más de selección en presencia de concentraciones decrecientes de IL33-11 biotinilada (50 nM y 25 nM).

Inhibición de la unión de IL-33 a ST2 mediante scFv no purificado

Se cultivó en placas de 96 pocillos un número representativo de clones individuales procedentes de los resultados de la selección después de las dos o tres rondas de selección descritas anteriormente. Se expresaron scFv en el periplasma bacteriano (Kipriyanov, *et al*. *J Immunol Methods 200*(1-2): 69-77 (1997)) y se exploraron respecto de su actividad inhibidora en un ensayo de unión de IL-33:ST2 basado en FRET homogéneo (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia) HTRF® (fluorescencia resuelta en tiempo homogénea, Cisbio International). Los métodos fueron esencialmente similares a los descritos en el ejemplo 1. En este ensayo, las muestras compitieron con ST2 humano marcado con FLAG®His por la unión a IL33-01 humana biotinilada (IL33-01, SEQ ID NO: 632) (tipo silvestre) o IL33-11 humana biotinilada (IL33-11, SEQ ID NO: 643).

Se probaron muestras de anticuerpo anti-IL-33 no purificadas respecto de la inhibición de la unión de IL-33 biotinilada a ST2 marcado con FLAG®His añadiendo 5 microlitros de cada dilución de muestra de ensayo de anticuerpo a una placa de ensayo de bajo volumen de 384 pocillos (Costar, 3673). A continuación, se preparó una solución que contenía ST2 marcado con FLAG®His humano 4 nM y detección de XL665 anti-FLAG® 5 nM (Cisbio International, 61FG2XLB) y se añadieron 2.5 microlitros de la muestra a la placa de ensayo. Esto fue seguido de la adición de 2.5 microlitros de una solución que contenía IL33-01 o IL33-11 humana biotinilada 2.4 nM combinada con detección de criptato de estreptavidina 1.5 nM (Cisbio International, 610SAKLB). Todas las diluciones se efectuaron en tampón de

ensayo que contenía fluoruro de potasio 0.8 M (VWR, 26820.236) y seroalbúmina bovina al 0.1% (BSA, PAA, K05-013) en PBS de Dulbecco (Invitrogen, 14190185). Las placas de ensayo se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y la fluorescencia resuelta en tiempo se leyó a longitudes de onda de emisión de 620 nm y 665 nm usando un lector de placas EnVision (Perkin Elmer). Las placas se incubaron durante 16 horas más (una noche) a 4 grados centígrados y se leyó nuevamente la fluorescencia resuelta en tiempo. El control negativo (unión no específica) se definió reemplazando la IL33-01 o IL33-11 humana biotinilada combinada con detección de criptato de estreptavidina solamente por detección de criptato de estreptavidina. Los datos se analizaron como se describe en el ejemplo 1.

Inhibición de la unión de IL-33 a ST2 mediante scFv purificado

Los clones de Fv monocatenarios que mostraron un efecto inhibidor en la interacción IL-33:ST2 en forma de extractos periplásmicos no purificados en ambos instantes de tiempo se sometieron a secuenciación de ADN (*Osbourn, et al. Immunotechnology 2(3):181-96 (1996); Vaughan, et al. Nat Biotechnol 14(3):309-14 (1996)*). Los scFv únicos se expresaron nuevamente en bacterias y se purificaron por cromatografía de afinidad (como se describe en el documento WO01/66754). Las potencias de estas muestras se determinaron haciendo competir una dilución en serie de la preparación purificada frente a ST2 humano marcado con FLAG®His por la unión aIL33-01 biotinilada o IL33-11 biotinilada como se ha descrito anteriormente. Las placas de ensayo se incubaron durante 1 hora a temperatura

ambiente (1 hora de incubación) o se incubaron las placas de ensayo durante 1 hora a temperatura ambiente seguido de 16 horas a 4 grados centígrados (incubación durante la noche). Las preparaciones de scFv que fueron capaces de inhibir la interacción IL-33:ST2 en ambos instantes de tiempo se seleccionaron para su conversión a formato IgG.

La figura 37A: muestra la inhibición de la señal de FRET después de 1 hora de incubación, producida por la unión de IL-33-01 humana a ST2 humano con concentraciones crecientes del anticuerpo scFv para IL-33 33v20064, en donde el eje x es la concentración del anticuerpo en concentración molar y el eje y es el porcentaje de unión específica.

La figura 37B: muestra la inhibición de la señal de FRET después de 1 hora de incubación, producida por la unión de IL33-11 a ST2 humano con concentraciones crecientes del anticuerpo scFv para IL-33 33v20064, en donde el eje x es la concentración del anticuerpo en concentración molar y el eje y es el porcentaje de unión específica.

La figura 37C: muestra la inhibición de la señal de FRET después de incubación durante una noche, producida por la unión de IL-33-01 humana a ST2 humano con concentraciones crecientes del anticuerpo scFv para IL-33 33v20064, en donde el eje x es la concentración del anticuerpo en concentración molar y el eje y es el porcentaje de unión específica.

La figura 37D: muestra la inhibición de la señal de FRET después de incubación durante una noche, producida por la unión de IL33-11 a ST2 humano con concentraciones crecientes del anticuerpo scFv para IL-33 33v20064, en

donde el eje x es la concentración del anticuerpo en concentración molar y el eje y es el porcentaje de unión específica.

Cambio de formato de scFv a IgG1

Las preparaciones de scFv purificado que fueron capaces de inhibir la interacción de IL-33:ST2 se convirtieron al formato de anticuerpo de inmunoglobulina G1 (IgG1) completa, tal como se ha descrito en el ejemplo 1. Los anticuerpos que mostraron una inhibición de un grado similar o mayor que IL330004 (ejemplo 1, SEQ ID NO: 12 y 17) siguieron adelante para su análisis adicional. Dichos anticuerpos se ejemplifican por 33v20064. Las SEQ ID NO correspondientes a las diversas regiones del anticuerpo 33v20064 se muestran en la **Tabla 20.**

Tabla 20. Secuencias de Anticuerpos anti-IL-33

IgG1	**Secuencia VH**	**Secuencia VL**	**CDR 1, 2, 3 de VH**	**CDR 1, 2, 3 de VL**
33v20064	SEQ ID NO: 272	SEQ ID NO: 277	SEQ ID NO: 273 SEQ ID NO: 274 SEQ ID NO: 275	SEQ ID NO: 278 SEQ ID NO: 279 SEQ ID NO: 280

Inhibición de la unión de IL-33 a ST2 mediante IgG purificada

Se evaluó la capacidad de los anticuerpos anti-IL-33 para inhibir la unión de IL-33-01 al receptor ST2 marcado con FLAG®-His en un ensayo bioquímico de competición HTRF® (fluorescencia homogénea resuelta en tiempo, Cisbio International) cuyo principio se ha descrito anteriormente. La actividad de las preparaciones de IgG purificadas se

determinó haciendo competir una dilución en serie de la IgG purificada frente a ST2 humano marcado con FLAG®-His por la unión a IL-33-01 humana biotinilada (SEQ ID NO: 632).

La figura 38A: muestra la inhibición de la señal de FRET después de 1 hora de incubación, producida por la unión de IL-33 humana a ST2 humano con concentraciones crecientes del anticuerpo IgG1 33v20064, en donde el eje x es la concentración del anticuerpo en concentración molar y el eje y es el porcentaje de unión específica.

La figura 38B: muestra la inhibición de la señal de FRET después de incubación durante una noche, producida por la unión de IL-33 humana a ST2 humano con concentraciones crecientes del anticuerpo IgG1 33v20064, en donde el eje x es la concentración del anticuerpo en concentración molar y el eje y es el porcentaje de unión específica.

Inhibición de la producción de IL-6 en HUVEC por IgG

33v20064 se evaluó respecto de la inhibición de la producción de IL-6 estimulada por IL-33 en HUVEC, habiéndose descrito los métodos para esto en ejemplo 2. Se usaron IL-33 His-Avi humana de tipo silvestre (IL33-01, SEQ ID NO: 632) (30ng/ml) o IL-33 His-Avi mutante (IL33-11, SEQ ID NO: 643) (30ng/ml) para estimular a las HUVEC en presencia de diversas concentraciones de anticuerpos de ensayo.

La figura 39A: muestra la inhibición de la producción de IL-6 por HUVEC estimuladas con IL33-01 (TS) mediante el anticuerpo 33v20064 en comparación con IL330004 y el anticuerpo IgG1 de control negativo anti-NIP, NIP228, en donde el eje x es la concentración del anticuerpo en concentración molar y el eje y es el porcentaje de respuesta máxima. 33v20064 mostró una inhibición parcial de

la respuesta a IL-33 de TS a altas concentraciones de anticuerpo, mientras que IL330004 no mostró ningún efecto.

La figura 39B: muestra la inhibición de la producción de IL-6 por HUVEC estimuladas con IL33-11 mediante el anticuerpo 33v20064 en comparación con IL330004 y el anticuerpo IgG1 de control negativo anti-NIP, NIP228, en donde el eje x es la concentración del anticuerpo en concentración molar y el eje y es el porcentaje de respuesta máxima. 33v20064 mostró una inhibición más completa de la producción de IL-6 estimulada por el mutante IL33-11 en comparación con IL330004.

Reactividad cruzada de anticuerpos anti-IL-33

Se determinó la reactividad cruzada del anticuerpo anti-IL-33 33v20064 usando un ensayo de unión de IL-33:mAb basado en FRET homogéneo (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia) HTRF® (fluorescencia resuelta en tiempo homogénea, Cisbio International). En este ensayo, las muestras compitieron con IL-33-01 humana biotinilada (SEQ ID NO: 632) por la unión a la IgG 33v20064 marcada con DyLight.

Tabla 21: Reactivos del ensayo FRET

Reactivo	**Proveedor**	**Número de catálogo/denominación**	**SECUENCIA**
IL-33 humana Flag®His	Propia	PS-582	SEQ ID No. 627
IL-33 de ratón Flag®His	Propia	BK-265	SEQ ID No. 628
IL-33 de cinomolgo Flag®His	Propia	PS-368	SEQ ID No. 629
B7H3 Avi-His	Propia	DBPur125	

IL-1 alfa humana	R&D Systems	201-LB/CF	
IL-1 beta humana	R&D Systems	200-LA/CF	

Se ensayaron IL-33 FLAG®His humana, de cinomolgo y de ratón (descritas en el ejemplo 1) respecto de la inhibición de la unión de IL-33 humana a 33v20064 marcada con DyLight añadiendo 5 microlitros de cada dilución de muestra de IL-33 a una placa de ensayo de bajo volumen de 384 pocillos (Costar, 3673). A continuación, se preparó una solución que contenía 33v20064 marcada con DyLight 20 nM y se añadieron 2.5 microlitros a la placa de ensayo (marcado usando el kit (Innova Biosciences, 326-0010) según las instrucciones del fabricante). Esto fue seguido de la adición de 2.5 microlitros de una solución que contenía IL-33-01 humana biotinilada 1.2 nM combinada con detección de criptato de estreptavidina 1.5 nM (Cisbio International, 610SAKLB). Todas las diluciones se efectuaron en tampón de ensayo que contenía fluoruro de potasio 0.8 M (VWR, 26820.236) y seroalbúmina bovina al 0.1% (BSA, PAA, K05-013) en PBS de Dulbecco (Invitrogen, 14190185). Las placas de ensayo se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y la fluorescencia resuelta en tiempo se leyó a longitudes de onda de emisión de 620 nm y 665 nm usando un lector de placas EnVision (Perkin Elmer). Los datos se analizaron calculando la relación 665/620 nm seguido de los valores de % de Delta F para cada muestra. La relación 665/620 nm se usó para corregir respecto de la interferencia de la muestra usando la ecuación 1. El % de Delta F para cada muestra se calculó entonces usando la ecuación 2. El control negativo (unión no específica) se definió

reemplazando la IL-33 humana biotinilada combinada con detección de criptato de estreptavidina solamente por detección de criptato de estreptavidina. Posteriormente, se utilizaron los valores del % de Delta F para calcular el % de unión específica tal y como se describe en la ecuación 3. Los valores CI_{50} se determinaron usando el software GraphPad Prism mediante el ajuste de curva usando una ecuación logística de cuatro parámetros (ecuación 4). Estos resultados demuestran que 33v20064 reacciona de manera cruzada con IL-33 de cinomolgo. Sin embargo, 33v20064 no mostró competición con IL-33 de ratón.

La figura 40A: muestra la inhibición de la señal de FRET, producida por la unión de IL-33-01 humana biotinilada a 33v20064 marcada con DyLight, con concentraciones crecientes de proteína de ensayo, en donde el eje x es la concentración de muestra de ensayo en concentración molar y el eje y es el porcentaje de unión específica. Se observó inhibición de la señal de FRET con IL-33 humana y de cinomolgo, pero no con la de ratón.

Selectividad de anticuerpos anti-IL-33

Se determinó la selectividad del anticuerpo anti-IL-33 33v20064 usando un ensayo de unión de IL-33:mAb basado en FRET homogéneo (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia) HTRF® (fluorescencia resuelta en tiempo homogénea, Cisbio International). En este ensayo, las muestras compitieron con IL-33 His-Avi humana biotinilada (IL33-01 SEQ ID NO: 632) por la unión a la IgG 33v20064 de tipo silvestre marcada con DyLight. Se ensayaron IL-1 alfa humana e IL-1 beta humana respecto de la inhibición de la unión de IL-33-01 biotinilada a 33v20064 marcada con DyLight como se ha descrito anteriormente. Estos resultados

demostraron que 33v20064 no mostró competición con IL-1 alfa o IL-1 beta humanas.

La figura 40B: muestra la inhibición de la señal de FRET, producida por la unión de IL-33-01 humana biotinilada a 33v20064 marcada con DyLight, con concentraciones crecientes de proteína de ensayo, en donde el eje x es la concentración de muestra de ensayo en concentración molar y el eje y es el porcentaje de unión específica. La inhibición de la señal de FRET no se observó con IL-1 alfa o IL-1 beta humanas.

Ejemplo 8 Optimización del Ab 33v20064 anti-IL-33

Conversión a la línea germinal de las regiones marco conservadas de 33v20064

Las secuencias de aminoácidos de los dominios V_H y V_L del anticuerpo parental 33v20064 se alinearon con las secuencias de línea germinal humana conocidas en la base de datos IMGT (*Lefranc, M. P. et al. Nucl. Acids Res. 2009. 37(Edición de la base de datos): D1006-D1012*) y se identificó la línea germinal más cercana mediante similitud de secuencia. Para los dominios V_H del linaje de anticuerpo 33v20064, este fue IGHV3-23*01. Para los dominios V_L, este fue IGLV3-1. La conversión a la línea germinal se llevó a cabo en 33v20064 antes del proceso de maduración por afinidad. Sin tomar en consideración los restos de Vernier (*Foote 1992*), que se dejaron sin cambiar, hubo 6 restos en las regiones marco conservadas de los dominios V_L de 33v20064 que difirieron respecto de la línea germinal, 5 de los cuales se revirtieron a la secuencia de línea germinal más próxima usando el método de mutagénesis de Kunkel (*Clackson, T. and Lowman, H.B. Phage Display – A Practical Approach, 2004. Oxford University Press*) con los cebadores

de mutagénesis adecuados. El producto de esta conversión a la línea germinal fue 33_640001. Los números de ID de secuencia se describen en la tabla 22.

Tabla 22. Secuencias de línea germinal del anticuerpo 33v20064

IgG1	Secuencia VH	Secuencia VL	CDR 1, 2, 3 de VH	CDR 1, 2, 3 de VL
33_640001	SEQ ID NO: 282	SEQ ID NO: 287	SEQ ID NO: 283 SEQ ID NO: 284 SEQ ID NO: 285	SEQ ID NO: 288 SEQ ID NO: 289 SEQ ID NO: 290

Inhibición de la unión de IL-33 a ST2 mediante scFv purificado

Se comparó la actividad de 33_640001 con su progenitor no de línea germinal, 33v20064. Se evaluó la capacidad de los anticuerpos scFv para inhibir la unión de His Avi IL-33 humana biotinilada (IL33-01, SEQ ID NO: 632) al receptor ST2 marcado con FLAG®-His en un ensayo bioquímico de competición HTRF® (fluorescencia homogénea resuelta en tiempo, Cisbio International) como se ha descrito en el ejemplo 7.

La figura 41A: muestra la inhibición de la señal de FRET después de 1 hora de incubación, producida por la unión de IL-33 humana a ST2 humano con concentraciones crecientes de los anticuerpos scFv, en donde el eje x es la concentración del anticuerpo en concentración molar y el eje y es el porcentaje de unión específica. 33_640001 tenía una actividad equivalente a la de su progenitor no de línea germinal.

La figura 41B: muestra la inhibición de la señal de FRET después de incubación durante una noche, producida por la unión de IL-33 humana a ST2 humano con concentraciones crecientes de los anticuerpos scFv, en donde el eje x es la concentración del anticuerpo en concentración molar y el eje y es el porcentaje de unión específica. 33_640001 tenía una actividad equivalente a la de su progenitor no de línea germinal.

Maduración por afinidad

33v20064 se optimizó usando una estrategia de mutagénesis dirigida y de selecciones de presentación en fagos basadas en la afinidad. Se crearon bibliotecas grandes de scFv-fago procedentes del progenitor de línea germinal (33_640001) mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótidos de la región determinante de la complementariedad 3 (CDR3) de región variable de cadena pesada (V_H) y la CDR3 de cadena ligera (V_L) usando técnicas de biología molecular convencionales del modo descrito (*Clackson 2004*). Para la CDR3 de V_H, también se incluyeron las dos posiciones de Vernier precedentes a las CDR definidas por Kabat (es decir, las posiciones de V_H 93 y 94) para la potencial optimización en la estrategia de mutagénesis dirigida. Las bibliotecas se sometieron a selecciones de presentación en fagos basadas en afinidad para seleccionar variantes con mayor afinidad por IL-33 humana. Estas selecciones se llevaron a cabo alternando los antígenos de IL-33 humana His-Avi biotinilada de tipo silvestre (IL33-01, SEQ ID NO. 632) y del mutante de IL-33 His Avi biotinilado (IL33-11, SEQ ID NO. 643) en rondas secuenciales o solo con el antígeno de IL33-11 biotinilada en todas las rondas. Las selecciones se llevaron a cabo

esencialmente como se ha descrito previamente (*Thompson 1996*). En resumen, se incubaron las partículas de scFv-fago con el antígeno recombinante biotinilado en solución. Después, se capturaron los scFv-fago unidos al antígeno sobre perlas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina (Dynabeads® M-280) siguiendo las recomendaciones del fabricante). Las partículas de scFv-fago se rescataron posteriormente como se ha descrito previamente (*Osbourn, J.K., et al. Immunotechnology, 1996. 2(3): p. 181-96*) y se repitió el proceso de selección en presencia de concentraciones decrecientes de antígeno biotinilado, normalmente de 50 nM a 10 pM frente a cuatro rondas de selección.

También se optimizó 33v20064 usando tecnología de presentación en ribosomas, tal como se h descrito por Hanes *et al.* (*Hanes, J., et al. Methods in Enzymology, 2000. 328: p. 404-30*). El clon de scFv parental 33v20064 se usó como molde para construir la biblioteca y su conversión a un formato de presentación en ribosomas para las selecciones posteriores. A nivel de ADN, se añadió un promotor T7 en el extremo 5' para una transcripción eficaz en ARNm. A nivel de ARNm, la construcción contenía un sitio de unión a ribosomas de procariotas (secuencia de Shine-Dalgarno). En el extremo 3' de la cadena individual, se retiró el codón de parada y se añadió una porción de gIII (gen III) de bacteriófago M13 para que actuase como espaciador entre el polipéptido naciente de scFv y el ribosoma (*Hanes 2000*).

Se creó una biblioteca de presentación en ribosomas obtenida a partir de la construcción parental de scFv (33v20064) mediante mutagénesis aleatoria usando la el kit para mutagénesis aleatoria por PCR (reacción en cadena de

la polimerasa) Diversify™ (BD Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se seleccionaron las condiciones para esta PCR propensa a errores (EP) para introducir de media 8.1 cambios de nucleótidos por cada 1000 pares de bases (de acuerdo con el fabricante). Después, se usó la biblioteca de EP resultante en las selecciones de presentación en ribosomas basadas en afinidad (*Hanes 2000*). Los scFv se expresaron *in vitro* usando el sistema para producción de ARN a gran escala RiboMAX™ (T7) (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante y un sistema de traducción sin células procariotas basado en *E.coli*. Los complejos de anticuerpo scFv-ribosoma-ARNm (ARM) se incubaron en solución con antígeno de IL-33 humana biotinilada, alternando los antígenos de IL33-01 biotinilada y de IL33-11 biotinilada en rondas secuenciales o solo con el antígeno de IL-33-11 biotinilada en todas las rondas. Los complejos terciarios unidos de manera específica (IL-33:ARM) se capturaron sobre perlas paramagnéticas recubiertas de estreptavidina (Dynabeads® M-280) siguiendo las recomendaciones del fabricante (Dynal) mientras que los ARM no unidos se eliminaron por lavado. Después, el ARNm que codificaba los scFv unidos se recuperó por PCR de retrotranscripcón (RT-PCR). Se repitió el proceso de selección con la población obtenida para rodas adicionales de selección con concentraciones decrecientes de IL-33 humana biotinilada (de 100 nM a 100 pM a lo largo de 5 rondas) para enriquecer y de este modo seleccionar los clones con mayor afinidad por IL-33. Se subclonaron los resultados de las rondas de selección 3, 4 y 5 en pCantab6 (*McCafferty, J., et al. Appl Biochem Biotechnol, 1994. 47(2-3): p. 157.*) y se

identificaron los clones mejoradas como se describe a continuación.

Inhibición de la unión de IL-33 a mAb mediante scFv no purificado

Se cultivó un número representativo de clones individuales de los resultados de la selección en placas de 96 pocillos. Se expresaron scFv en el periplasma bacteriano (*Kipriyanov, et al. J Immunol Methods 200(1-2): 69-77 (1997)*) y se exploraron respecto de su actividad inhibidora en un ensayo de unión de IL-33:mAb basado en FRET homogéneo (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia) HTRF® (fluorescencia resuelta en tiempo homogénea, Cisbio International). En este ensayo, las muestras compitieron con IgG 33v20064 marcada con DyLight por la unión a IL-33-01 His Avi biotinilada (SEQ ID NO. 632) o IL-33 de cinomolgo His Avi biotinilada (SEQ ID NO. 649). Dichos ensayos de competición de epítopos están basados en el principio de que una muestra de anticuerpo de ensayo, que reconoce un epítopo similar a la IgG anti-IL-33 marcada, competirá con la IgG por la unión a IL-33 biotinilada marcada, dando como resultado una reducción en la señal del ensayo.

Las muestras de anticuerpo anti-IL-33 no purificadas se ensayaron respecto de la inhibición de la unión de IL33-01 His Avi biotinilada (humana) o IL-33 de cinomolgo His Avi biotinilada a 33v20064 marcado con DyLight añadiendo 5 microlitros de muestra a una placa de ensayo de bajo volumen de 384 pocillos (Costar, 3673). A continuación, se preparó una solución que contenía 33v20064 marcado con DyLight 2.4 nM para el ensayo de IL-33 humana y se preparó 33v20064 marcada con DyLight 6 nM para el ensayo de

cinomolgo y se añadieron 2.5 microlitros a las placas de ensayo (marcada usando el kit (Innova Biosciences, 326-0010) según las instrucciones del fabricante). Esto fue seguido de la adición de 2.5 microlitros de una solución que contenía IL-33-01 humana biotinilada 0.8 nM combinada con detección de criptato de estreptavidina 0.75 nM (Cisbio International, 610SAKLB) para el ensayo humano o una solución que contenía IL-33 de cinomolgo biotinilada 4 nM combinada con detección de criptato de estreptavidina 1.5 nM (Cisbio International, 610SAKLB) para el ensayo de cinomolgo. Todas las diluciones se efectuaron en tampón de ensayo que contenía fluoruro de potasio 0.8 M (VWR, 26820.236) y seroalbúmina bovina al 0.1% (BSA, PAA, K05-013) en PBS de Dulbecco (Invitrogen, 14190185). Las placas de ensayo se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y la fluorescencia resuelta en tiempo se leyó a longitudes de onda de emisión de 620 nm y 665 nm usando un lector de placas EnVision (Perkin Elmer). Los datos se analizaron calculando la relación 665/620 nm seguido de los valores de % de Delta F para cada muestra. La relación 665/620 nm se usó para corregir respecto de la interferencia de la muestra usando la ecuación 1. El % de Delta F para cada muestra se calculó entonces usando la ecuación 2. El control negativo (unión no específica) se definió reemplazando la IL-33 biotinilada combinada con detección de criptato de estreptavidina solamente por detección de criptato de estreptavidina. Posteriormente, se utilizaron los valores del % de Delta F para calcular el % de unión específica tal y como se describe en la ecuación 3.

A medida que el ensayo de competición de epítopos alcanzó su límite de sensibilidad, se usó un ensayo que usa un mAb intermedio optimizado, 33_640027 para probar las muestras de scFv no purificados. El ensayo fue esencialmente como se describe para el ensayo de competición de 33v20064, con las siguientes modificaciones: Se preparó 33_640027 marcado con DyLight 20 nM y se añadieron 2.5 microlitros a las placas de ensayo. Esto fue seguido de la adición de 2.5 microlitros de una solución que contenía IL-33-01 humana biotinilada 0.32 nM combinada con detección de criptato de estreptavidina 0.75 nM (Cisbio International, 610SAKLB) para el ensayo humano o una solución que contenía IL-33 de cinomolgo biotinilada 0.8 nM combinada con detección de criptato de estreptavidina 1.5 nM (Cisbio International, 610SAKLB) para el ensayo de cinomolgo.

Inhibición de la unión de IL-33 a mAb mediante scFv purificado

Los clones de Fv monocatenarios que mostraron un efecto inhibidor en la interacción IL-33:mAb en forma de extractos periplásmicos no purificados se sometieron a secuenciación de ADN (*Osbourn, et al. Immunotechnology 2(3):181-96 (1996); Vaughan, et al. Nat Biotechnol 14(3):309-14 (1996)*). Los scFv únicos se expresaron nuevamente en bacterias y se purificaron por cromatografía de afinidad (como se describe en el documento WO01/66754). Las muestras de anticuerpo anti-IL-33 purificadas se ensayaron respecto de la potencia de la inhibición haciendo competir una dilución en serie de la preparación purificada frente a la IgG 33v20064 marcada con DyLight o la IgG 33_640027 marcada con DyLight por la unión a IL33-01 His

Avi biotinilada, IL33-11 His Avi biotinilada o IL-33 de cinomolgo His Avi biotinilada. Los métodos son como se han descrito en la sección anterior.

Tabla 23. Actividad de anticuerpos scFv en ensayos de competición de epítopos

Ensayo		Potencia CI_{50} (nM)			
		33v20064	**33_640027**	**33_640047**	**33_640050**
	IL33-01	12	0.4	0.4	0.2
	IL33-11	26	0.6	0.5	0.4
	Cyno IL-33	103	8.2	2.7	1.4
	IL33-01	1498	3.8	2.3	2.5
	IL33-11	1467	2.9	No se determinó	2.4
	Cyno IL-33	3433	38	8.8	4.1

Cambio de formato de scFv a IgG1

Los clones de Fv monocatenario con propiedades deseables de los ensayos de unión de IL-33:mAb se convirtieron a formato de anticuerpo de inmunoglobulina G1 (IgG1) completa como se ha descrito en el ejemplo 1. Estos incluyen los anticuerpos 33_640027 (obtenido de las selecciones de la biblioteca de EP) y 33_640047, 33_640050 (obtenidos de las selecciones de la biblioteca de mutagénesis del bloque de CDR3 de V_H). Las SEQ ID NO correspondientes a las diversas regiones de estos anticuerpos se muestran en la **Tabla 24.**

Tabla 24. Secuencias de anticuerpos para IL33

IgG1	Secuencia VH	Secuencia VL	CDR 1, 2, 3 de VH	CDR 1, 2, 3 de VL
33_640027	SEQ ID NO: 292	SEQ ID NO: 297	SEQ ID NO: 293 SEQ ID NO: 294 SEQ ID NO: 295	SEQ ID NO: 298 SEQ ID NO: 299 SEQ ID NO: 300
33_640047	SEQ ID NO: 312	SEQ ID NO: 317	SEQ ID NO: 313 SEQ ID NO: 314 SEQ ID NO: 315	SEQ ID NO: 318 SEQ ID NO: 319 SEQ ID NO: 320
33_640050	SEQ ID NO: 302	SEQ ID NO: 307	SEQ ID NO: 303 SEQ ID NO: 304 SEQ ID NO: 305	SEQ ID NO: 308 SEQ ID NO: 309 SEQ ID NO: 310

Inhibición de la unión de IL-33 a mAb mediante IgG purificada

Se evaluó la capacidad de los anticuerpos anti-IL-33 para inhibir la unión de IL33-01 His Avi biotinilada, IL33-11 His Avi biotinilada o IL-33 de cinomolgo His Avi biotinilada a la IgG 33v20064 marcada con DyLight o a la IgG 33_640027 marcada con DyLight en un ensayo bioquímico de competición HTRF ® (fluorescencia homogénea resuelta en tiempo, Cisbio International). Las IgG con propiedades

deseables de los ensayos de unión IL-33:mAb se seleccionaron para su análisis adicional.

Inhibición de la producción de IL-8 en HUVEC por IgG

Se usó un ensayo de liberación de citocinas para evaluar la inhibición de la producción de IL-8 inducida por IL-33 por células endoteliales de la vea umbilical humana (HIVEC) por anticuerpos anti-IL-33. Se expusieron células a IL-33 en presencia o ausencia de anticuerpo de ensayo o de ST2.Fc (R&D Systems) esencialmente como se ha descrito en el ejemplo 2 con modificaciones menores. Las soluciones de ensayo de IgG purificada (por duplicado) se diluyeron hasta la concentración deseada en medio de cultivo completo. La IL-33 His Avi N-terminal (IL33-01, SEQ ID NO: 632) se preparó en medio de cultivo completo mezclada con el anticuerpo de ensayo adecuado para dar una concentración final de IL-33 de 2 ng/ml. Todas las muestras se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente, antes de transferir la mezcla de IL-33 / anticuerpo a la placa de ensayo. Después de 18-24 horas de incubación, se midió la IL-8 en los sobrenadantes celulares mediante ELISA (R&D Systems, DY208) adaptado para lectura de europio, como se ha descrito en el ejemplo 2. Los datos se analizaron usando el programa informático Graphpad Prism. Los valores de CI_{50} se determinaron ajustando la curva usando una ecuación logística de cuatro parámetros. Se calcularon los valores de CI_{50} y se resumen en la **Tabla 25** a continuación.

La figura 42A muestra HUVEC estimuladas con IL33-01 en presencia de 33v20064, 33_640050, ST2-Fc humano o mAb de control, en donde el eje x es la concentración del anticuerpo en concentración molar y el eje y es el porcentaje de la respuesta máxima (producción de IL-8).

Neutralización de IL-33 de longitud completa de mamífero

La IL-33 de longitud completa también es activa (Cayrol *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A 106*(22):9021-6 (2009); Hayakawa *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun 387*(1):218-22 (2009); Talabot-Ayer *et al.*, *J Biol Chem. 284*(29):19420-6 (2009)).

Para evaluar la capacidad de los anticuerpos para neutralizar IL-33 de longitud completa, se recogieron células HEK293-EBNA que expresaban HuIL-33 de longitud completa (FL) (y los controles con transfección simulada) 24 horas después de su transfección con acutasa (PAA, n.° L11-007). Las células se diluyeron a $1x10^8$/ml con PBS y se homogeneizaron durante 30 segundos usando un homogeneizador de tejidos. Los restos celulares se retiraron por centrifugación. Las HUVEC se estimularon con lisados celulares a diversas concentraciones. La estimulación de la producción de citocinas se observó únicamente con lisado de células transfectadas con IL-33 de longitud completa y no con el lisado de células con transfección simulada. Se seleccionó una concentración 1:1000 de lisado que estimuló una liberación submáxima de citocinas (aproximadamente la CE_{50}) para los estudios de neutralización de anticuerpos. Los experimentos se realizaron tal como se ha descrito anteriormente. Se calcularon los valores de CI_{50} y se resumen en la **Tabla 25** a continuación.

La figura 42B muestra HUVEC estimuladas lisado celular de IL-33 en presencia de 33v20064, 33_640050, ST2-Fc humano o mAb de control, en donde el eje x es la concentración del anticuerpo en concentración molar y el eje y es el porcentaje de la respuesta máxima (producción de IL-8).

Tabla 25. Valores de CI50 en el ensayo de IL-8 en HUVEC

Anticuerpo	Media geométrica de CI50 (IC del 95%) (nM)	
	frente a IL-33 His Avi	frente a lisado celular de IL-33 de longitud completa
33v20064	Inhibición parcial	185
33_640050	0.7 (0.3-1.5)	0.32
ST2.Fc	0.3 (0.1-0.9)	0.67

Prevención de la forma unida por disulfuro de IL-33 mediante IgG

Se incubó IL-33-01 (0.14 nM o 3 ng/ml) en IMDM o PBS, conteniendo ambos BSA al 1% en presencia o ausencia de anticuerpos (25 ug/ml) o de ST2-Fc humano (105 ug/ml) durante 0-24 horas a 37°C, CO_2 al 5%. En varios instantes, se recogieron alícuotas y se añadieron a una placa preenfriada que contenía PBS o sST2 (concentración final de 10.5 ug/ml). Se añadió sST2 al mAb de control y las muestras no tratadas en el momento de recogerlas para detener el avance de la reacción de oxidación de IL-33. Las muestras se separaron por alícuotas en placas de 96 pocillos precongeladas y se almacenaron a -80°C. El ELISA de IL-33 humana se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (R&D Systems, n.° de cat. DY3625, lote n.° 1362797) sustituyendo el sistema de

detección DELFIA (Perkin Elmer) en lugar de estreptavidina-HRP y en lo sucesivo. En resumen, se recubrieron placas negras de 96 pocillos Maxisorp con 50 ul por pocillo de anticuerpo de captura durante una noche a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3X con 300 ul de Tween-20 al 0.05% en PBS y se bloquearon con 150 ul de BSA al 1% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3X y se añadieron 50 ul por pocillo de muestras o patrones a la placa durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación (400 rpm). Las placas se lavaron 3X y se añadieron 50 ul por pocillo de anticuerpo de detección a la placa durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación (400 rpm). Las placas se lavaron como se ha indicado anteriormente y se añadieron 50 ul por pocillo de estreptavidina-europio diluido a 1 en 1000 en tampón de ensayo DELFIA a la placa durante 40 minutos a temperatura ambiente, resguardad de la luz, con agitación (400 rpm). Las placas se lavaron 7X con 300 ul por pocillo de tampón de lavado DELFIA. Se añadieron 50 ul por pocillo de solución potenciadora DELFIA (precalentada a temperatura ambiente) a la placa. Después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente resguardadas de la luz, se midió la fluorescencia usando un lector de placas EnVision (PerkinElmer). Los patrones y la interpolación de datos se llevaron a cabo en Microsoft Excel efectuándose el análisis posterior en el programa informático GraphPad Prism.

Tal como se ha descrito en el ejemplo 4, **Figura 24A**, este ELISA detecta predominantemente IL-33 unida por disulfuro (IL33-DSB) dentro del intervalo de concentraciones de IL-33 medidas en este experimento. En este caso se usa el ELISA para controlar la conversión de

IL-33 a su forma unida por disulfuro en presencia de anticuerpos de ensayo.

La figura 43 muestra la conversión de IL33-01 a su forma unida por disulfuro (IL33-DSB) durante la incubación en IMDM (**Figura 43A**) o PBS (**Figura 43B**) en presencia o ausencia de anticuerpos de ensayo, en donde el eje x es el tiempo en horas y el eje y es la concentración de IL-33-DSB. IL330004 y 33v20064 frenan la velocidad de conversión de IL-33 en IL33-DSB. 33_640050 y ST2.Fc impiden la conversión en IL-33-DSB en el transcurso de tiempo ensayado.

Recombinación de mutaciones beneficiosas y optimización adicional

Con el objetivo de generar mejoras de afinidad adicionales, se recombinaron las mutaciones beneficiosas identificadas de las cascadas de selección y exploración previas de diversos modos, ya sea mediante una estrategia aditiva simple o mediante una estrategia de biblioteca de recombinación con selecciones adicionales.

Los análisis de secuencia sugirieron que había dos "puntos calientes" de mutación puntual que eran prevalentes en muchas de las secuencias de anticuerpo principales; I98M en la CDR3 de V_H y Q50R en la CDR2 de V_L (numeración de Kabat). Estas dos mutaciones se injertaron en la construcción de 33_640001 para generar un nuevo anticuerpo, 33_640036, usando técnicas de biología molecular convencionales. En una recombinación adicional, se emparejó el V_H de 33_640047 con el V_L de 33_640036 para generar el anticuerpo 33_640117. Estos son ejemplos de recombinación de secuencias usando una estrategia aditiva. Las SEQ ID NO se muestran en la **Tabla 26.**

Tabla 26. Secuencias de anticuerpos para IL33

IgG1	**Secuencia VH**	**Secuencia VL**	**CDR 1, 2, 3 de VH**	**CDR 1, 2, 3 de VL**
33_640036	SEQ ID NO: 352	SEQ ID NO: 357	SEQ ID NO: 353 SEQ ID NO: 354 SEQ ID NO: 355	SEQ ID NO: 358 SEQ ID NO: 359 SEQ ID NO: 360
33_640117	SEQ ID NO: 362	SEQ ID NO: 367	SEQ ID NO: 363 SEQ ID NO: 364 SEQ ID NO: 365	SEQ ID NO: 368 SEQ ID NO: 369 SEQ ID NO: 370

Además, los resultados de la selección de las bibliotecas de mutación en bloque que abarcan las regiones CDR3 de V_H y CDR3 de V_L habían mostrado mejoras de afinidad y una buena diversidad de secuencia y por lo tanto, se recombinaron usando una estrategia de clonación de población. Los resultados de la ronda 3 de selección se recombinaron a partir de bibliotecas en las que los clones contenían secuencias de CDR3 de V_H y CDR3 de V_L emparejadas aleatoriamente y aleatorizadas individualmente. Estas bibliotecas de CDR3 de V_H / CDR3 de V_L recombinadas se usaron posteriormente en selecciones de presentación en ribosomas alternando los antígenos de IL-33 humana His Avi de tipo silvestre biotinilada (IL33-01, SEQ ID NO. 632) y del mutante de IL-33 His Avi biotinilado (IL33-11, SEQ ID NO. 643) en rondas secuenciales o solo con el antígeno de

IL33-11 His Avi biotinilada en todas las rondas. Las selecciones se llevaron a cabo esencialmente como se ha descrito para las bibliotecas individuales de CDR3, en presencia de concentraciones decrecientes de antígeno biotinilado - de 50 nM a 30 pM frente a cinco rondas de selección.

Los extractos periplásmicos en bruto que contenían scFv se prepararon a partir de un número representativo de scFv individuales procedentes de los resultados de la selección de las bibliotecas de CDR3 de V_H / CDR3 de V_L recombinadas. Se evaluó la capacidad de los anticuerpos anti-IL-33 para inhibir la unión de IL33-01 His Avi biotinilada o IL-33 de cinomolgo His Avi biotinilada a la IgG 33v20064 marcada con DyLight o a la IgG 33_640027 marcada con DyLight en un ensayo bioquímico de competición HTRF ® (fluorescencia homogénea resuelta en tiempo, Cisbio International). Las variantes de scFv que mostraron un efecto inhibidor significativamente mejorado en comparación con el scFv parental y los principales generados por la recombinación previa, se sometieron a secuenciación de ADN y se produjeron variantes recombinadas únicas en forma de scFv purificados y se ensayaron como se ha descrito en la sección anterior.

Los anticuerpos optimizados obtenidos de estas bibliotecas recombinadas se ejemplifican por 33_640076, 33_640081, 33_640082, 33_640084, 33_640086 y 33_640087. Las SEQ ID NO de estos anticuerpos se muestran en la **Tabla 27.**

Tabla 27. Secuencias de anticuerpos para IL33

IgG1	**Secuencia VH**	**Secuencia VL**	**CDR 1, 2, 3 de VH**	**CDR 1, 2, 3 de VL**
33_640076	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID	SEQ ID

	372	377	NO: 373 SEQ ID NO: 374 SEQ ID NO: 375	NO: 378 SEQ ID NO: 379 SEQ ID NO: 380
33_640081	SEQ ID NO: 382	SEQ ID NO: 387	SEQ ID NO: 383 SEQ ID NO: 384 SEQ ID NO: 385	SEQ ID NO: 388 SEQ ID NO: 389 SEQ ID NO: 390
33_640082	SEQ ID NO: 392	SEQ ID NO: 397	SEQ ID NO: 393 SEQ ID NO: 394 SEQ ID NO: 395	SEQ ID NO: 398 SEQ ID NO: 399 SEQ ID NO: 400
33_640084	SEQ ID NO: 402	SEQ ID NO: 407	SEQ ID NO: 403 SEQ ID NO: 404 SEQ ID NO: 405	SEQ ID NO: 408 SEQ ID NO: 409 SEQ ID NO: 410
33_640086	SEQ ID NO: 412	SEQ ID NO: 417	SEQ ID NO: 413 SEQ ID NO: 414 SEQ ID NO: 415	SEQ ID NO: 418 SEQ ID NO: 419 SEQ ID NO: 420
33_640087	SEQ ID NO: 422	SEQ ID NO: 427	SEQ ID NO: 423	SEQ ID NO: 428

			SEQ ID NO: 424 SEQ ID NO: 425	SEQ ID NO: 429 SEQ ID NO: 430

Se introdujeron mutaciones espontáneas adicionales en las regiones variables de estos anticuerpos en formato scFv durante los procedimientos de selección de presentación en ribosomas a consecuencia de las rondas repetidas de amplificaciones PCR. Estos eventos añaden diversidad a la secuencia de los resultados pero normalmente no son deseados cuando se producen en las regiones marco conservadas. Por lo tanto, se revirtieron las mutaciones espontáneas que se produjeron en las regiones marco conservadas de 33_640076, 33_640081, 33_640082, 33_640084, 33_640086 y 33_640087 a la línea germinal en las construcciones de IgG como se ha descrito en el ejemplo 3 usando técnicas convencionales de biología molecular. Dichas mutaciones espontáneas, que se produjeron en cualquiera de las CDR o en los restos de Vernier adyacentes a las CDR (por ejemplo, las posiciones de V_H 27, 28, 29, 30, 93 y 94 según la numeración de Kabat) se dejaron sin cambiar. A modo de estrategia adicional para aumentar la afinidad, también se injertó en las construcciones al mismo tiempo un "punto caliente" previamente identificado (la mutación Q50R en la CDR2 de V_L). Los anticuerpos resultantes de estas modificaciones de reversión a la línea germinal y de injerto de puntos calientes se denominaron 33_640076-1, 33_640081-A, 33_640082-2, 33_640084-2, 33_640086-2 y 33_640087-2, correspondientes a los sus anticuerpos parentales 33_640076, 33_640081, 33_640082,

33_640084, 33_640086 y 33_640087, respectivamente. Las SEQ ID NO de estos anticuerpos se muestran en la **Tabla 28.**

Tabla 28. Secuencias de anticuerpos para IL33

IgG1	**Secuencia VH**	**Secuencia VL**	**CDR 1, 2, 3 de VH**	**CDR 1, 2, 3 de VL**
33_640076-1	SEQ ID NO: 432	SEQ ID NO: 437	SEQ ID NO: 433 SEQ ID NO: 434 SEQ ID NO: 435	SEQ ID NO: 438 SEQ ID NO: 439 SEQ ID NO: 440
33_640081-A	SEQ ID NO: 442	SEQ ID NO: 447	SEQ ID NO: 443 SEQ ID NO: 444 SEQ ID NO: 445	SEQ ID NO: 448 SEQ ID NO: 449 SEQ ID NO: 450
33_640082-2	SEQ ID NO: 452	SEQ ID NO: 457	SEQ ID NO: 453 SEQ ID NO: 454 SEQ ID NO: 455	SEQ ID NO: 458 SEQ ID NO: 459 SEQ ID NO: 460
33_640084-2	SEQ ID NO: 462	SEQ ID NO: 467	SEQ ID NO: 463 SEQ ID NO: 464 SEQ ID NO: 465	SEQ ID NO: 468 SEQ ID NO: 469 SEQ ID NO: 470
33_640086-2	SEQ ID NO: 472	SEQ ID NO: 477	SEQ ID NO: 473	SEQ ID NO: 478

			SEQ ID NO: 474 SEQ ID NO: 475	SEQ ID NO: 479 SEQ ID NO: 480
33_640087-2	SEQ ID NO: 482	SEQ ID NO: 487	SEQ ID NO: 483 SEQ ID NO: 484 SEQ ID NO: 485	SEQ ID NO: 488 SEQ ID NO: 489 SEQ ID NO: 490

Optimización de CDR adicionales

A modo de estrategia adicional para aumentar la afinidad, se optimizaron CDR adicionales. Se crearon bibliotecas grandes de scFv-fago procedentes del progenitor de línea germinal (33_640001) mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótidos de las CDR1 y CDR2 de región variable de cadena pesada (V_H) y de las CDR1 y CDR2 de cadena ligera (V_L) usando técnicas de biología molecular convencionales del modo descrito (*Clackson 2004*). Las selecciones y la exploración se efectuaron como se ha descrito para las bibliotecas de CDR3 de V_HV_L. Se obtuvieron las variantes de anticuerpo más mejoradas de la biblioteca de CDR2 de V_H. Estas se ejemplifican por 33_640166, 33_640169 y 33_640170. Las SEQ ID NO de estos anticuerpos se muestran en la **Tabla 29.**

Tabla 29. Secuencias de anticuerpos para IL33

IgG1	**Secuencia VH**	**Secuencia VL**	**CDR 1, 2, 3 de VH**	**CDR 1, 2, 3 de VL**
33_640166	SEQ ID NO: 322	SEQ ID NO: 327	SEQ ID NO: 323 SEQ ID	SEQ ID NO: 328 SEQ ID

			NO: 324 SEQ ID NO: 325	NO: 329 SEQ ID NO: 330
33_640169	SEQ ID NO: 332	SEQ ID NO: 337	SEQ ID NO: 333 SEQ ID NO: 334 SEQ ID NO: 335	SEQ ID NO: 338 SEQ ID NO: 339 SEQ ID NO: 340
33_640170	SEQ ID NO: 342	SEQ ID NO: 347	SEQ ID NO: 343 SEQ ID NO: 344 SEQ ID NO: 345	SEQ ID NO: 348 SEQ ID NO: 349 SEQ ID NO: 350

A modo de estrategia adicional para lograr mejoras adicionales en la afinidad, se injertaron las secuencias de CDR2 de V_H de 33_640166, 33_640169 y 33_640170 en las construcciones de IgG de 33_640076-1, 33_640082-2, 33_640086-2 y 33_640087-2, usando métodos de biología molecular convencionales. Los anticuerpos resultantes de estas recombinaciones se ejemplificaron por 33_640076-4, 33_640082-4, 33_640082-6, 33_640082-7, 33_640086-6 y 33_640087-7. Los orígenes de secuencia y las SEQ ID NO se muestran en la **Tabla 30.**

Tabla 30. Origen de secuencia y números de SEQ ID de anticuerpos para IL-33

IgG1	**Origen**	**Secuencia VH**	**Secuencia VL**	**CDR 1, 2, 3 de VH**	**CDR 1, 2, 3 de VL**
33_640076-	Injerto de	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID

	4	la secuencia de CDR2 de V_H de 33_640170 en 33_640076-1	NO: 492	NO: 497	NO: 493 SEQ ID NO: 494 SEQ ID NO: 495	NO: 498 SEQ ID NO: 499 SEQ ID NO: 500
	33_640082-4	Injerto de la secuencia de CDR2 de V_H de 33_640166 en 33_640082-2	SEQ ID NO: 502	SEQ ID NO: 507	SEQ ID NO: 503 SEQ ID NO: 504 SEQ ID NO: 505	SEQ ID NO: 508 SEQ ID NO: 509 SEQ ID NO: 510
	33_640082-6	Injerto de la secuencia de CDR2 de V_H de 33_640169 en 33_640082-2	SEQ ID NO: 512	SEQ ID NO: 517	SEQ ID NO: 513 SEQ ID NO: 514 SEQ ID NO: 515	SEQ ID NO: 518 SEQ ID NO: 519 SEQ ID NO: 520
	33_640082-7	Injerto de la	SEQ ID NO: 522	SEQ ID NO: 527	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:

	secuencia de CDR2 de V_H de 33_640170 en 33_640082-2			523 SEQ ID NO: 524 SEQ ID NO: 525	528 SEQ ID NO: 529 SEQ ID NO: 530
33_640086-6	Injerto de la secuencia de CDR2 de V_H de 33_640169 en 33_640086-2	SEQ ID NO: 532	SEQ ID NO: 537	SEQ ID NO: 533 SEQ ID NO: 534 SEQ ID NO: 535	SEQ ID NO: 538 SEQ ID NO: 539 SEQ ID NO: 540
33_640087-7	Injerto de la secuencia de CDR2 de V_H de 33_640170 en 33_640087-2	SEQ ID NO: 542	SEQ ID NO: 547	SEQ ID NO: 543 SEQ ID NO: 544 SEQ ID NO: 545	SEQ ID NO: 548 SEQ ID NO: 549 SEQ ID NO: 550

La recombinación de secuencias de CDR3 de V_H / CDR3 de V_L y CDR2 de V_H se llevó a cabo también usando una estrategia de clonación de población y selección. Los

resultados de la ronda 3 de selección de las bibliotecas de mutagénesis en bloque que abarcaban la región CDR2 de V_H se recombinaron con los resultados de la ronda 3 de selección de la biblioteca recombinada de CDR3 de V_H / CDR3 de V_L en una estrategia de clonación de población usando técnicas de biología molecular convencionales. Los resultados de la selección que formados por grandes números de variantes de scFv se recombinaron para formar bibliotecas en las que los clones contenían secuencias emparejadas aleatoriamente procedentes de las selecciones de CDR3 de V_H / CDR3 de V_L y CDR2 de V_H. Las selecciones se llevaron a cabo como se ha descrito para las bibliotecas de CDR3 de V_HV_L en presencia de concentraciones decrecientes de antígeno biotinilado - típicamente de 3 nM a 3 pM a lo largo de cinco rondas de selección. Los extractos periplásmicos que contenían scFv en bruto procedentes de un número representativo de scFv individuales de los resultados de la selección se exploraron en ensayos bioquímicos HTRF® del modo descrito para las bibliotecas de CDR3 de V_HV_L. Las variantes de scFv que mostraron un efecto inhibidor significativamente mejorado cuando se compararon con el scFv parental y los principales generados por la recombinación previa, se sometieron a secuenciación de ADN.

A medida que el ensayo de competición de epítopos utilizando 33_640027 alcanzó su límite de sensibilidad, se usó un ensayo que empleaba 33_640117 para probar las muestras de scFv purificadas. El ensayo fue esencialmente como se describe para el ensayo de competición de 33v20064, con las siguientes modificaciones: Se preparó 33_640117 marcado con DyLight 2.5 nM y se añadieron 2.5 microlitros a las placas de ensayo. Esto fue seguido de la adición de 2.5

microlitros de una solución que contenía IL-33-01 humana biotinilada 0.12 nM combinada con detección de criptato de estreptavidina 0.75 nM (Cisbio International, 610SAKLB) para el ensayo humano o una solución que contenía IL-33 de cinomolgo biotinilada 0.24 nM combinada con detección de criptato de estreptavidina 1.5 nM (Cisbio International, 610SAKLB) para el ensayo de cinomolgo. La fluorescencia se leyó pasada una hora y después de incubación durante una noche. Las muestras más potentes en ambos instantes se avanzaron para su reformateo a IgG.

Las variantes recombinadas únicas se evaluaron en forma de scFv no purificado y los scFv más activos se seleccionaron y convirtieron posteriormente a formato IgG1 como se ha descrito en el ejemplo 1. Los anticuerpos obtenidos de estas bibliotecas recombinadas se ejemplifican por 33_640201 y 33_640237. Las mutaciones espontáneas que se introdujeron en las regiones marco conservadas de 33_640201 y 33_640237 durante las selecciones de presentación en ribosomas se revirtieron a las secuencias de línea germinal como se ha descrito anteriormente en esta sección y sus homólogos revertidos a la línea germinal se nombraron 33_640201-2 y 33_640237-2, respectivamente. Las SEQ ID de estos anticuerpos se muestran en la **Tabla 31.**

Tabla 31. Secuencias de anticuerpos para IL33

IgG1	**Secuencia VH**	**Secuencia VL**	**CDR 1, 2, 3 de VH**	**CDR 1, 2, 3 de VL**
33_640201	SEQ ID NO: 552	SEQ ID NO: 557	SEQ ID NO: 553 SEQ ID NO: 554 SEQ ID	SEQ ID NO: 558 SEQ ID NO: 559 SEQ ID

			NO: 555	NO: 560
33_640237	SEQ ID NO: 562	SEQ ID NO: 567	SEQ ID NO: 563 SEQ ID NO: 564 SEQ ID NO: 565	SEQ ID NO: 568 SEQ ID NO: 569 SEQ ID NO: 570
33_640201-2	SEQ ID NO: 572	SEQ ID NO: 577	SEQ ID NO: 573 SEQ ID NO: 574 SEQ ID NO: 575	SEQ ID NO: 578 SEQ ID NO: 579 SEQ ID NO: 580
33_640237-2	SEQ ID NO: 582	SEQ ID NO: 587	SEQ ID NO: 583 SEQ ID NO: 584 SEQ ID NO: 585	SEQ ID NO: 588 SEQ ID NO: 589 SEQ ID NO: 590

Los datos para los anticuerpos optimizados para CDR3 de V_H / CDR3 de V_L y CDR2 de V_H mediante estrategias de recombinación racional o de población se ejemplifican por 33_640082-6, 33_640087-7, 33_640201 y 33_640237 en las **Figuras 44 y 45.**

Inhibición de la unión de IL-33 a mAb mediante IgG purificada

Se evaluó la capacidad de los anticuerpos anti-IL-33 para inhibir la unión de IL-33 humana His Avi biotinilada o de IL-33 de cinomolgo Avi His a la IgG 33_640117 marcada con DyLight en un ensayo bioquímico de competición HTRF®

(fluorescencia homogénea resuelta en tiempo, Cisbio International) como se ha descrito anteriormente.

La figura 44A muestra la inhibición de la señal de FRET después de 1 hora de incubación, producida por la unión de IL-33 humana biotinilada (IL33-01) a la IgG 33_640117 marcada con DyLight con concentraciones crecientes de los anticuerpos 33v20064, 33_640050, 33_640082-6, 33_640087-7, 33_640201 y 33_640237, en donde el eje x es la concentración del anticuerpo en concentración molar y el eje y es el porcentaje de unión específica.

La figura 44B muestra la inhibición de la señal de FRET después de incubación durante una noche, producida por la unión de IL-33 humana biotinilada (IL33-01) a la IgG 33_640117 marcada con DyLight con concentraciones crecientes de los anticuerpos 33v20064, 33_640050, 33_640082-6, 33_640087-7, 33_640201 y 33_640237, en donde el eje x es la concentración del anticuerpo en concentración molar y el eje y es el porcentaje de unión específica.

La figura 44C muestra la inhibición de la señal de FRET después de 1 hora de incubación, producida por la unión de IL-33 de cinomolgo His Avi biotinilada a la IgG 33_640117 marcada con DyLight con concentraciones crecientes de los anticuerpos 33v20064, 33_640050, 33_640082-6, 33_640087-7, 33_640201 y 33_640237, en donde el eje x es la concentración del anticuerpo en concentración molar y el eje y es el porcentaje de unión específica.

Tabla 32. Valores de CI50 de los anticuerpos IgG1 en 117 ensayos de competición de epítopos

Anticuerpo	IC50 (nM)		
	117-TS 1 hora	117-TS Durante una noche	117-Cino 1 hora
33v20064 IgG	150	689	788
33_640050 IgG	0.3	1.5	4.1
33_640076-4 IgG	0.1	0.1	0.6
33-640081 IgG	0.3	0.6	10
33_640082-6 IgG	0.1	0.1	0.2
33_640082-7 IgG	0.1	0.1	0.2
33_640084-2 IgG	0.3	0.3	0.8
33_640086-6 IgG	0.1	0.1	0.2
33_640087-7 IgG	0.1	0.1	0.2
33_640201 IgG	0.2	0.2	0.3
33_640237 IgG	0.1	0.1	1.8

Inhibición de la producción de IL-8 en HUVEC por IgG

Las IgG se ensayaron en un ensayo de producción de IL-8 en HUVEC. Las células se expusieron a IL-33 marcada en N-terminal con His Avi (IL33-01, SEQ ID NO: 632) o a lisado de células de mamífero de IL-33 de longitud completa (lisado de FL-IL33) en presencia o ausencia de anticuerpo de ensayo, como se ha descrito con anterioridad. Se calcularon los valores de CI_{50} y se resumen en la **Tabla 33** a continuación.

La figura 45A muestra HUVEC estimuladas con IL33-01 en presencia de los anticuerpos de ensayo 33_640050, 33_640082-6, 33_640087-7, 33_640201 y 33_640237, en donde el eje x es la concentración de anticuerpo en concentración molar y el eje y es un porcentaje de la respuesta máxima (producción de IL-8).

La figura 45B muestra HUVEC estimuladas con lisado celular de IL-33 de longitud completa en presencia de los anticuerpos de ensayo 33_640050, 33_640082-6, 33_640087-7, 33_640201 y 33_640237, en donde el eje x es la concentración de anticuerpo en concentración molar y el eje y es un porcentaje de la respuesta máxima (producción de IL-8).

Tabla 33. Valores de CI50 en el ensayo de IL-8 en HUVEC

Anticuerpo	**IC50 (nM)**	
	frente a IL-33 His Avi	**frente a lisado celular de IL-33 de longitud completa**
33_640076 -4	0.032	0.095
33_640082-6	0.030	0.097
33_640082-7	0.031	0.095
33_640084-2	0.036	0.132
33_640086-6	0.026	0.081
33_640087-7	0.025	0.073
33_640201	0.046	0.101
33_640237	0.056	0.091

Reversión a la línea germinal de la secuencia IGLJ

Las secuencias de aminoácidos de las regiones marco conservadas de V_L de los anticuerpos 33_640076-4,

33_640081-A, 33_640082-6, 33_640082-7, 33_640084-2, 33_640086-6, 33_640087-7, 33_640201-2 y 33_640237-2 se alinearon con las secuencias de línea germinal IGLK humanas conocidas en la base de datos IMGT (*Lefranc, M. P. et al. Nucl. Acids Res. 2009. 37(Edición de la base de datos): D1006-D1012*) y se identificó la línea germinal más cercana mediante similitud de secuencia. Para todos estos anticuerpos, esta fue IGLJ2, que tiene una diferencia de un solo aminoácido con los anticuerpos en la posición 104 de la región V_L (numeración de Kabat). Este resto se revirtió a la línea germinal como se ha descrito en el ejemplo 3 usando métodos de biología molecular convencionales. Los anticuerpos resultantes se denominaron 33_640076-4B, 33_640081-AB, 33_640082-6B, 33_640082-7B, 33_640084-2B, 33_640086-6B, 33_640087-7B, 33_640201-2B y 33_640237-2B correspondientes a su linaje parental de 33_640076-4, 33_640081-A, 33_640082-6, 33_640082-7, 33_640084-2, 33_640086-6, 33_640087-7, 33_640201-2 y 33_640237-2, respectivamente. Las SEQ ID de las regiones V_H y V_L de estos anticuerpos se muestran en la **Tabla 34.**

Tabla 34. Secuencias de anticuerpos para IL33 revertidos a la línea germinal

IgG1	**Secuencia VH**	**Secuencia VL**
33_640076-4B	SEQ ID NO: 592	SEQ ID NO: 594
33_640081-AB	SEQ ID NO: 596	SEQ ID NO: 598
33_640082-6B	SEQ ID NO: 600	SEQ ID NO: 602
33_640082-7B	SEQ ID NO: 604	SEQ ID NO: 606

33_640084-2B	SEQ ID NO: 608	SEQ ID NO: 610
33_640086-6B	SEQ ID NO: 612	SEQ ID NO: 614
33_640087-7B	SEQ ID NO: 616	SEQ ID NO: 618
33_640201-2B	SEQ ID NO: 620	SEQ ID NO: 622
33_640237-2B	SEQ ID NO: 624	SEQ ID NO: 626

Ejemplo 9 Modelo de inflamación de las vías respiratorias *in vivo*

Clonación, expresión y purificación de la trampa de citocina IL-33

Se obtuvieron secuencias de proteína para IL-1RAcP de ratón y ST2 de ratón de Swiss Prot (números de referencia Q61730 y P14719, respectivamente). La trampa de citocina IL-33 se diseñó basándose en Economides et al, 2003 y consistía en los aminoácidos 1-359 de Q61730 y los aminoácidos 27-332 de P14719 fusionados a la porción Fc de IgG1 humana. Las secuencias de proteína se optimizaron por codones (Geneart) y se clonaron en pDEST12.2. Las proteínas oriP se secretaron por las células al medio utilizando los péptidos de señal nativos de IL-1RAcP. Para la expresión en células CHO, se retiró el enlazador Gateway mediante PCR de cebador solapante. El vector de expresión de la trampa se transfectó transitoriamente en células de mamífero CHO. La trampa de IL-33 de ratón se expresó y secretó al medio. Las recolecciones se agruparon y filtraron antes de su purificación usando cromatografía de proteína A. Los sobrenadantes de cultivo se cargaron en una columna de

proteína A Hitrap de 5ml (GE Healthcare) y se lavaron con 1xDPBS, la trampa unida se eluyó de la columna usando citrato de sodio 0.1 M (pH 3.0) y se neutralizó mediante la adición de Tris-HCl (pH 9.0). El material eluido se purificó adicionalmente por SEC en 1xDPBS usando una columna S200 16:600 Superdex (GE Healthcare) y se determinó la concentración espectrofotométricamente usando un coeficiente de extinción basado en la secuencia de aminoácidos (*Mach et al., Anal. Biochem. 200(1):74-80 (1992)*).

Ratones humanizados para IL-33

Los métodos para la generación de ratones humanizados para IL-33 se han descrito anteriormente en el ejemplo 4. Los ratones humanizados se usan en modelos de inflamación de las vías respiratorias y/o alérgica para evaluar el efecto de los anticuerpos anti-IL-33 humana.

Modelo de inflamación de las vías respiratorias *in vivo*

Se han descrito con anterioridad modelos de inflamación de las vías respiratorias en ratones inducida por *Alternaria alternata* (ALT) (*Kouzaki et al. J. Immunol. 2011, 186: 4375-4387; Bartemes et al J Immunol, 2012, 188: 1503-1513*). La IL-33 endógena se libera rápidamente después de la exposición a ALT e impulsa la producción de IL-5 y la eosinofilia dependientes de IL-33 en el pulmón. Se anestesió brevemente a ratones macho o hembra de tipo silvestre o humanizados para IL-33 (de 6-10 semanas) con isofluorano y se les administró 25 µg de extracto de ALT (Greer, Lenoir, NC) o vehículo por vía intranasal en un volumen total de 50 µl. Se trató a los ratones por vía intraperitoneal o intranasal con las sustancias de ensayo:

IgG IL330004 (SEQ ID NO: 12 y 17), IgG H338L293 (SEQ ID NO: 182 y 187), trampa de IL-33 de ratón, 33_640050 (SEQ ID NO: 302 y 307), IgG de control de isotipo (NIP228) o vehículo (PBS, 10 ml/kg) en las 24 horas previas (para el tratamiento intraperitoneal) o las 2 horas previas (para el tratamiento intranasal) a la exposición intranasal a ALT. 24 horas después de la exposición, se sedó terminalmente a los ratones con pentobarbital sódico antes de la exanguinación y el lavado broncoalveolar (BAL). Se recogió fluido del lavado broncoalveolar (BALF) mediante lavado (0.3 ml, 0.3 ml y 0.4 ml) mediante una cánula traqueal. El BALF se centrifugó, se contaron las células (células totales mediante FACS (FacsCALIBUR, BD)) y el sobrenadante se analizó respecto de las citocinas mediante ELISA (Meso Scale Discovery, Rockville, MD). Se llevaron a cabo recuentos diferenciales de células (200 células/portaobjetos) en preparaciones Cytospin teñidas con Diff-Quik (Fisher Scientific, R.U.). Todo el trabajo se llevó a cabo según las normas éticas y de cría del Ministerio del Interior del Reino Unido bajo la autoridad de una licencia de proyecto adecuada.

La figura 46 muestra que H338L293 inhibe, dependiendo de la dosis, la IL-5 de BAL y la eosinofilia inducida por ALT en ratones BALB/c de tipo silvestre. Las sustancias de ensayo se dosificaron por vía intranasal (10, 30 o 100mg/kg según se indica entre paréntesis) a las -2 horas antes de la exposición con 25ug de ALT. Se recogió BALF a las 24 horas después de la exposición a ALT y se analizó respecto de la presencia de IL-5 (**Figura 46A**) y eosinófilos (**Figura 46B**). Se determinó un efecto significativo de las sustancias de ensayo usando ANOVA de una vía con prueba de

comparaciones múltiples de Bonferroni. ***p<0.001, ~~p< 0.01 en comparación con el mAb de control (n=4-8). Se usó trampa de IL-33 de ratón como control positivo.

La figura 47 muestra que H338L293 (30mg/kg) y la trampa de IL-33 de ratón (10mg/kg), pero no IL330004 (30mg/kg), inhiben la IL-5 de BAL inducida por ALT en ratones humanizados para IL-33. Las sustancias de ensayo se dosificaron por vía intranasal a las -2 horas antes de la exposición con 25ug de ALT. Se recogió BALF a las 24 horas después de la exposición a ALT y se analizó respecto de la presencia de IL-5. Se determinó un efecto significativo de las sustancias de ensayo usando ANOVA de una vía con prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. ***p<0.001, **p< 0.01 (n=4).

La figura 48 muestra que 33_640050 inhibió de manera dependiente de la dosis la IL-5 de BAL inducida por *Alternaria* en ratones humanizados para IL-33. Las sustancias de ensayo se dosificaron por vía intraperitoneal (0.3, 3 o 30mg/kg según se indica entre paréntesis) a las -24 horas antes de la exposición con 25ug de *Alternaria*. Se recogió BALF a las 24 horas después de la exposición a ALT y se analizó respecto de la presencia de IL-5. Se determinó un efecto significativo de las sustancias de ensayo usando ANOVA de una vía con prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. ***p<0.001, **p< 0.01 (n=4-5).

Ejemplo 10 Caracterización de anticuerpos anti-IL-33

Inhibición de la unión de IL-33 a ST2 mediante IgG purificada

Se evaluó la capacidad de los anticuerpos anti-IL-33 para inhibir la unión de IL33-01 al receptor ST2 marcado

con FLAG®-His en un ensayo bioquímico de competición HTRF® (fluorescencia homogénea resuelta en tiempo, Cisbio International) cuyo principio se ha descrito anteriormente. La actividad de las preparaciones de IgG purificadas se determinó haciendo competir una dilución en serie de la IgG purificada frente a ST2 humano marcado con FLAG®-His por la unión a IL33-01 humana biotinilada (SEQ ID NO: 632).

La figura 49A: muestra la inhibición de la señal de FRET después de incubación durante una noche, producida por la unión de IL-33 humana a ST2 humano con concentraciones crecientes de los anticuerpos 33v20064, 33_640087-7, 33_640087-7B, 33_640050 y 33_640237-2B, en donde el eje x es la concentración del anticuerpo en concentración molar y el eje y es el porcentaje de unión específica.

Inhibición de la producción de IL-8 en HUVEC por IgG

Las IgG se ensayaron en un ensayo de producción de IL-8 en HUVEC. Las células se expusieron a IL-33 marcada en N-terminal con His Avi (IL33-01, SEQ ID NO: 632) en presencia o ausencia de anticuerpo de ensayo, como se ha descrito con anterioridad. Se calcularon los valores de CI_{50} y se resumen en la **Tabla 35** a continuación. Los datos muestran que la reversión a la línea germinal de la secuencia IGLJ no tuvo efecto alguno en la potencia del anticuerpo.

La figura 49B muestra HUVEC estimuladas con IL33-01 en presencia de los anticuerpos de ensayo 33_640087-7, 33_640087-7B, 33_640237-2 y 33_640237-2B, en donde el eje x es la concentración de anticuerpo en concentración molar y el eje y es un porcentaje de la respuesta máxima (producción de IL-8).

Tabla 35. Valores de CI50 en el ensayo de IL-8 en HUVEC

Anticuerpo	CI50 (nM) frente a IL-33 His Avi
33_640087-7	0.041
33_640087-7B	0.046
33_640237-2	0.105
33_640237-2B	0.067

Selectividad y reactividad cruzada de anticuerpos anti-IL-33

Se determinó la selectividad y la reactividad cruzada de los anticuerpos anti-IL-33 revertidos a la línea germinal usando un ensayo de unión de IL-33:mAb basado en FRET homogéneo (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia) HTRF® (fluorescencia resuelta en tiempo homogénea, Cisbio International). En este ensayo, las muestras compitieron con IL-33-01 humana biotinilada (SEQ ID NO: 632) por la unión a IgG 33_640087-7B (SEQ ID NO: 618 y 618) o IgG 33_640237-2B (SEQ ID NO: 624 y 626) marcadas con DyLight.

Se ensayaron IL-33 FLAG®His humana, de cinomolgo y de ratón (descritas en el ejemplo 1 y la tabla 21), IL-1 alfa e IL-1 beta humanas (R&D Systems) (Tabla 21) o IL-33 de rata (GenScript) respecto de la inhibición de la unión de IL-33 humana a 33_640087-7B marcada con DyLight650 o 33_640237-2B marcada con DyLight650 añadiendo 5 microlitros de cada dilución de muestra a una placa de ensayo de bajo volumen de 384 pocillos (Costar, 3673). A continuación, se preparó una solución que contenía 33_640087-7B o 33_640237-2B marcadas con DyLight650 1.2 nM y se añadieron 2.5 microlitros a la placa de ensayo (marcado usando el kit (Innova Biosciences, 326-0010) según las instrucciones del fabricante). Esto fue seguido de la adición de 2.5

microlitros de una solución que contenía IL-33-01 humana biotinilada 0.12 nM combinada con detección de criptato de estreptavidina 0.75 nM (Cisbio International, 610SAKLB). Todas las diluciones se efectuaron en tampón de ensayo que contenía fluoruro de potasio 0.8 M (VWR, 26820.236) y seroalbúmina bovina al 0.1% (BSA, PAA, K05-013) en PBS de Dulbecco (Invitrogen, 14190185). Las placas de ensayo se incubaron durante 4 horas a temperatura ambiente, seguido de 18 horas a 4 grados centígrados y la fluorescencia resuelta en tiempo se leyó a longitudes de onda de emisión de 620 nm y 665 nm usando un lector de placas EnVision (Perkin Elmer). Los datos se analizaron calculando la relación 665/620 nm seguido de los valores de % de Delta F para cada muestra. La relación 665/620 nm se usó para corregir respecto de la interferencia de la muestra usando la ecuación 1. El % de Delta F para cada muestra se calculó entonces usando la ecuación 2. El control negativo (unión no específica) se definió reemplazando la IL-33 humana biotinilada combinada con detección de criptato de estreptavidina solamente por detección de criptato de estreptavidina. Posteriormente, se utilizaron los valores del % de Delta F para calcular el % de unión específica tal y como se describe en la ecuación 3. Los valores CI_{50} se determinaron usando el software GraphPad Prism mediante el ajuste de curva usando una ecuación logística de cuatro parámetros (ecuación 4). Estos resultados demostraron que 33_640087-7B y 33_640237-2B reaccionan de manera cruzada con IL-33 de cinomolgo pero no con IL-33 de ratón, IL-33 de rata e IL-1 alfa o IL-1 beta humanas.

La figura 50A: muestra la inhibición de la señal de FRET, producida por la unión de IL-33-01 humana biotinilada

a 33_640087-7B marcada con DyLight (SEQ ID NO: 618 y 618), con concentraciones crecientes de proteína de ensayo, en donde el eje x es la concentración de muestra de ensayo en concentración molar y el eje y es el porcentaje de unión específica. Se observó inhibición de la señal de FRET con IL-33 humana y de cinomolgo, pero no de ratón o rata e IL-1 alfa o IL-1 beta humanas.

La figura 50B: muestra la inhibición de la señal de FRET, producida por la unión de IL-33-01 humana biotinilada a 33_640237-2B marcada con DyLight (SEQ ID NO: 624 y 626), con concentraciones crecientes de proteína de ensayo, en donde el eje x es la concentración de muestra de ensayo en concentración molar y el eje y es el porcentaje de unión específica. Se observó inhibición de la señal de FRET con IL-33 humana y de cinomolgo, pero no de ratón o rata e IL-1 alfa o IL-1 beta humanas.

Neutralización de IL-33 endógena en el ensayo de IL-8 de HUVEC

Para determinar si los anticuerpos eran capaces de neutralizar la IL-33 endógena, se usó tejido pulmonar humano para proporcionar una fuente de proteína IL-33 endógena. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación (número de referencia 08/H0304/56þ5) del NRES East of England (Cambridge Este) y el tejido fue donado con el consentimiento informado de los pacientes. Se suministró tejido no canceroso adyacente de pacientes de cáncer de pulmón y de cirugías de trasplante de pulmón en medio Aqix RS-I (Aqix Ltd) sobre hielo Por el banco de tejidos para investigación del Papworth Hospital NHS Trust. El tejido se diluyó con 400mg/ml en PBS y se homogeneizó durante 30 segundos usando un homogeneizador de tejidos. Los restos

celulares se retiraron por centrifugación. Las HUVEC se estimularon con lisados pulmonares a diversas concentraciones. Se seleccionó una concentración CE_{50} de lisado que estimulaba la liberación de IL-8 para los estudios de neutralización con anticuerpos. Las células fueron expuestas a lisado pulmonar en presencia o ausencia de anticuerpo de ensayo, como se había descrito previamente. sST2 inhibió la respuesta de IL-8 en un máximo de aproximadamente el 70%, lo que sugiere que la mayoría, pero no toda la producción de IL-8 estaba impulsada por la IL-33 endógena en el lisado pulmonar. Las IgG 33_640050 y 33_640087-7B inhibieron la respuesta de IL-8 en un grado similar a sST2, demostrando su capacidad para unirse y neutralizar a la IL-33 endógena. La IgG 33_640050 neutralizó el lisado pulmonar con una CI50 de 0.032nM. 33_640087-7B neutralizó el lisado pulmonar con una CI_{50} de 0.013nM. sST2 neutralizó el lisado pulmonar con una CI50 de 0.019nM

La figura 51 muestra HUVEC estimuladas con lisado pulmonar humano en presencia de los anticuerpos de ensayo 33_640050 y 33_640087-7B en comparación con sST2, en donde el eje x es la concentración del anticuerpo en concentración molar y el eje y es un porcentaje de la respuesta máxima (producción de IL-8). sST2 inhibió la respuesta de IL-8 en un máximo de aproximadamente el 70%, lo que sugiere que la mayoría, pero no toda la producción de IL-8 estaba impulsada por la IL-33 endógena en el lisado pulmonar. Ambos anticuerpos inhibieron la respuesta de IL-8 en un grado similar a sST2, demostrando su capacidad para unirse y neutralizar a la IL-33 endógena.

Modelo de inflamación de las vías respiratorias *in vivo*

Los métodos para la generación de ratones humanizados para IL-33 se han descrito anteriormente en el ejemplo 4. Se usaron ratones humanizados en un modelo de inflamación de las vías respiratorias inducida por *Alternaria alternata* (ALT), tal como se ha descrito en el ejemplo 9, para evaluar el efecto de 33_640087-7B. Se anestesió brevemente a ratones macho o hembra de tipo silvestre o humanizados para IL-33 (de 6-10 semanas) con isofluorano y se les administró 25 µg de extracto de ALT (Greer, Lenoir, NC) o vehículo por vía intranasal en un volumen total de 50 µl. Se trató a los ratones por vía intraperitoneal con las sustancias de ensayo: IgG 33_640087-7B (SEQ ID NO: 618 y 618), IgG de control de isotipo (NIP228) o vehículo (PBS, 10 ml/kg) en las 24 horas previas a la exposición intranasal a ALT. 24 horas después de la exposición, se sedó terminalmente a los ratones con pentobarbital sódico antes de la exanguinación y el lavado broncoalveolar (BAL). Se recogió fluido del lavado broncoalveolar (BALF) mediante lavado (0.3 ml, 0.3 ml y 0.4 ml) mediante una cánula traqueal. El BALF se centrifugó y el sobrenadante se analizó respecto de las citocinas mediante ELISA (Meso Scale Discovery, Rockville, MD). Todo el trabajo se llevó a cabo según las normas éticas y de cría del Ministerio del Interior del Reino Unido bajo la autoridad de una licencia de proyecto adecuada.

La figura 52 muestra que 33_640087-7B inhibió de manera dependiente de la dosis la IL-5 de BAL inducida por *Alternaria* en ratones humanizados para IL-33. Las sustancias de ensayo se dosificaron por vía intraperitoneal

(0.1, 1, 3 o 10mg/kg según se indica entre paréntesis) a las -24 horas antes de la exposición con 25ug de *Alternaria*. Se recogió BALF a las 24 horas después de la exposición a ALT y se analizó respecto de la presencia de IL-5. Se determinó un efecto significativo de las sustancias de ensayo usando ANOVA de una vía con prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. ***p<0.001, **p< 0.01 (n=5-6).

Ejemplo 11 Afinidad de anticuerpos anti-IL-33

Se determinó la afinidad del fragmento de anticuerpo (Fab) anti-IL-33 por IL33 humana recombinante usando monitorización de la interacción en tiempo real mediante BIACORE™ y en equilibrio usando KinExA™ para 33_640087-7B. Para ambas metodologías, se purificó la proteína IL33 humana mediante SEC-HPLC para asegurar la calidad del antígeno y también del Fab para el análisis BIAcore.

Análisis de afinidad BIAcore

Se generaron fragmentos Fab mediante escisión con papaína de IgG1 de longitud completa y se purificaron por SEC. Se midió la afinidad del fragmento de anticuerpo (Fab) usando el BIAcore T100 a 25°C. La estreptavidina se inmovilizó covalentemente sobre una superficie de microplaca C1 usando técnicas de acoplamiento de amina convencionales a una concentración de 4µg/ml en acetato de sodio 10mM, pH 4.5. Se lograron densidades finales típicas de estreptavidina en la superficie en el intervalo de 115-170 UR. La IL-33 humana recombinante biotinilada enzimáticamente (de producción propia) se tituló sobre la superficie de la microplaca de estreptavidina a 4µg/ml en tampón HBS-EP+ para permitir ~30 UR de unión de Fab en

saturación (Rmáx). Este bajo nivel de unión de analito aseguró efectos de transporte de masa mínimos.

El Fab para IL-33 se diluyó en serie de 5nM a 78pm en tampón HBS-EP+ y se hizo fluir sobre la microplaca a 50µl/min, con 3 minutos de asociación y hasta 30 minutos de disociación. En las mismas condiciones, se efectuaron múltiples inyecciones solo de tampón para permitir la resta de doble referencia de los conjuntos finales de sensogramas, que se analizaron usando el programa informático BiaEval (versión 2.0.1). La superficie de la microplaca se regeneró completamente con pulsos de $MgCl_2$ 3M.

La afinidad de ST2-Flag-His10 (SEQ. ID NO: 650) expresado en células HEK-EBNA por IL-33 humana se determinó mediante BIACORE™ usando los mismos métodos descritos anteriormente.

Tabla 36. Resultados de la afinidad BIAcore para el Fab anti-IL-33

Analito	Configuración de ajuste	k_a (M^{-1} s^{-1})	k_d (s^{-1})	K_D (pM)	$R_{máx}$	Chi^2
33_640001 Fab	Rmáx global	9.76 E+6	3.26 E-2	3340	27.0	0.022
33_640050 Fab	Rmáx local	3.08 E+7	1.05 E-4	3.4	48.9	0.022
33_640087-7B Fab	Rmáx local	2.20 E+7	9.42 E-6	0.43	30.7-32.8	0.010
Monómero de ST2-FH	Rmáx local	1.52 E+7	4.35 E-5	2.9	23.4	0.022

Análisis de afinidad KinExA

Para confirmar la alta afinidad observada con el ensayo SPR, los presentes inventores pasaron a ensayos de exclusión cinéticos (KinExA). KinExA está ganando cada vez más aprobación para resolver interacciones proteína:proteína de mayor afinidad, especialmente aquellas en los intervalos pM a sub-pM, donde las técnicas de biosensor basado en superficie alcanzan sus límites prácticos (*Rathanaswami P, Roalstad S, Roskos L, Qiaojuan JS, Lackie S, Babcook J. Demonstration of an in vivo generated sub-picomolar affinity fully human monoclonal antibody to interleukin-8. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2005; 334: 1004-1013*).

Se midió la afinidad del anticuerpo 33_640087-7B mediante ensayos de exclusión cinética efectuados en el dispositivo KinExA 3200. Las perlas de muestreo se prepararon mezclando 200mg de perlas de azlactona UltraLink Biosupport secas con 110µg de IL-33 (como se ha mencionado anteriormente) en 2.5ml de hidrogenocarbonato sódico 50mM, pH 8.4 a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación constante. Las perlas se enjuagaron y bloquearon con 10mg/ml de BSA en Tris 1M, pH 8.7. Antes de su uso, se resuspendieron las perlas en D-PBS, azida sódica al 0.02%. Se prepararon mezclas en equilibrio de 33_640087-7B/IL-33 en tampón de muestra formado por 1mg/ml de BSA, azida sódica al 0.02% en DPBS (PBS de Dulbecco). Se usaron dos concentraciones diferentes de IgG con diversas concentraciones de IL-33, 5pM de 33_640087-7B con IL-33 diluida en serie de 125pM a 61fM y 500fM de 33_640087-7B con IL-33 diluida el serie de 62.5pM a 15fM, llevándose ambos a cabo con controles de cero IL-33. El reactivo de detección secundario fluorescente fue Alexa Fluor 647 anti-

Fc humano de cabra diluido en 1mg/ml de BSA, azida sódica al 0.02%, Tween 20 al 0.1% en DPBS. Las muestras se ejecutaron en el dispositivo KinExA mientras se alojaron en una cabina de temperatura controlada a 25°C. Los datos se analizaron usando el programa informático KinExA Pro, versión 4.1.11.

Los ensayos KinExA indican que 33_640087-7B tiene una K_D <142 fM (femtomolar) por IL-33 humana (**Tabla 37**).

Tabla 37. Resultados de afinidad de KinExA para la IgG 33_640087-7B

Analito	K_D estimada (pM)	Intervalo superior de confianza al 95% de K_D (pM)	Intervalo inferior de confianza al 95% de K_D (pM)
33_640087-7B	0.03	0.142	sin definir

Ejemplo 12 Actividad de IL-33 oxidada

Estudio piloto *in vivo* para explorar la actividad de IL-33 oxidada

En el ejemplo 4 (véase también *Cohen, E. S. et al. Oxidation of the alarmin IL-33 regulates ST2-dependent inflammation. Nat. Commun. 6:8327 doi: 10.1038/ncomms9327 (2015)*) los presentes inventores describieron el descubrimiento de una forma oxidada, unida por disulfuro de IL-33 (DSB IL-33) y demostraron que esta forma no se une a ST2. Para investigar si la IL-33 oxidada tenía una actividad alternativa independiente de ST2, se trató a ratones deficientes para ST2 por vía intraperitoneal o intranasal con dosis repetidas de IL-33 humana durante 2, 4 o 6 semanas. Se llevó a cabo un análisis histológico en múltiples tejidos.

Se generaron ratones deficientes para ST2 del modo descrito previamente *(Townsend, M.J., Fallon, P.G., Matthews, D.J., Jolin, H.E., y McKenzie, A.N.J. (2000). T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses. J. Exp. Med. 191, 1069-1076)*. Se anestesió brevemente a ratones hembra deficientes para ST2 (12 semanas) con isofluorano y se administraron 10 µg de IL-33 His Avi N-terminal (IL33-01, SEQ ID NO 632; número de lote CCH168, niveles de endotoxina de 0.03 UE/mg), o de vehículo (PBS) por vía intranasal en un volumen total de 50 µl. Como alternativa, la IL-33 o el vehículo se administraron por inyección i.p. Este proceso se repitió 3 x a la semana hasta un total de 18 tratamientos. A los ratones que recibieron únicamente 2 o 4 semanas de tratamiento con IL-33 se les administró PBS durante las primeras 4 o 2 semanas de dosificación, antes de recibir la IL-33.

24 horas después del último tratamiento, se sedó terminalmente a los ratones con pentobarbital sódico antes de la exanguinación y el lavado broncoalveolar (BAL). Se recogió sangre mediante sangrado cardíaco usando una jeringuilla enjuagada con EDTA. Se llevó a cabo una hematología de la sangre usando el analizador para hematología Sysmex XTVet. El resto de la sangre se centrifugó y se extrajo el plasma. Se recogió fluido del lavado broncoalveolar (BALF) mediante lavado (0.3 ml, 0.3 ml y 0.4 ml) mediante una cánula traqueal. Se contaron las células de BAL (células totales de BAL mediante citómetro de flujo (MACSquant, Miltenyi Biotec) y se centrifugó el BALF para separar el sobrenadante, que se analizó respecto de las citocinas mediante ELISA (Meso Scale Discovery,

Rockville, MD). Se llevaron a cabo recuentos diferenciales de células (200 células/portaobjetos) en preparaciones Cytospin teñidas con Diff-Quik (Fisher Scientific, R.U.). Después del lavado con PBS, se inflaron los pulmones con 10% de formalina neutra tamponada (NBF) a través de una infusión traqueal para mantener la arquitectura pulmonar y se fijaron por inmersión en NBF durante 24-48 horas. Después, se cortaron transversalmente las muestras de pulmón fijadas en 4 secciones transversales iguales antes de procesarlas a través de una serie de alcoholes, xileno y en cera de parafina. Finalmente, se incluyeron las secciones transversales de pulmón en bloques de cera de parafina. Se cortaron secciones histológicas de 4µm y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para su análisis y evaluación de la puntuación de inflamación.

Todo el trabajo se llevó a cabo según las normas éticas y de cría del Ministerio del Interior del Reino Unido bajo la autoridad de una licencia de proyecto adecuada.

Para investigar la exposición a IL-33 por las vías intraperitoneal o intranasal, se midió IL-33 humana en BALF y plasma usando el ensayo de IL-33 humana de Millipore (n.° de cat. HTH17MAG-14K, lote 2159117) como se ha descrito en el ejemplo 4. Se usó la capacidad de sST2-Fc para reducir la señal de ensayo para determinar la presencia de IL-33 de unión a ST2 (reducida) frente a la no de unión a ST2 (oxidada). Después de las administraciones intranasales, se detectó la IL-33 de manera consistente en BALF y plasma en los puntos finales de 2, 4 y 6 semanas. La mayoría de la IL-33 detectada estaba oxidada. Después de una sola administración intraperitoneal, se detectó IL-33 de manera

transitoria en el plasma 5 horas después de la dosificación, pero era indetectable pasadas 24 horas. Después de las administraciones repetidas de IL-33, la IL-33 humana no se detectó de manera consistente en BALF o plasma en los puntos finales de 2, 4 o 6 semanas. Estos datos indican que la mejor exposición sistémica a IL-33 oxidada se logra mediante dosificación intranasal.

Figura 53A. Diseño experimental del estudio piloto *in vivo*. Se trató a ratones deficientes para ST2 por vía intraperitoneal o intranasal con la administración repetida de IL-33 humana o vehículo (PBS) durante 6 semanas (n=3-4 por grupo). Los tejidos, el BALF y el suero se recogieron 24 horas después de la administración final de IL-33.

Figura 53B. Análisis de la exposición a IL-33 humana en fluido de BAL después de la administración repetida de IL-33 humana a ratones BALB/c. Se midió la IL-33 humana en BALF de ratones tratados como se ha descrito en la figura 53A, en donde el eje x muestra el grupo de tratamiento y el eje y muestra la señal del ensayo para IL-33 humana en unidades arbitrarias. La IL-33 se detectó únicamente en BALF después de la dosificación intranasal. Se observó que la IL-33 detectada estaba predominantemente oxidada (no de unión a ST2).

Figura 53C Análisis de la exposición a IL-33 en plasma después de una sola administración intraperitoneal de IL-33 humana (10ug). Se midió la IL-33 humana en plasma a las 2, 5, 24 y 48 horas después de la administración, en donde el eje x muestra el instante de análisis y el eje y muestra la señal de ensayo de IL-33 humana en unidades arbitrarias. Se detectó IL-33 de manera transitoria en el plasma 5 horas

después de la dosificación, pero era indetectable pasadas 24-48 horas.

Figura 53D Análisis de la exposición a IL-33 en plasma después de la administración repetida de IL-33 humana a ratones BALB/c. Se midió la IL-33 humana en plasma de ratones tratados como se ha descrito en la figura 53A, en donde el eje x muestra el grupo de tratamiento y el eje y muestra la señal del ensayo para IL-33 humana en unidades arbitrarias. La IL-33 se detectó únicamente en plasma después de la dosificación intranasal. Se observó que la IL-33 detectada estaba predominantemente oxidada (no de unión a ST2).

Se llevó a cabo un análisis histológico en múltiples tejidos. No se observaron anomalías relevantes en los ratones tratados con IL-33 humana en comparación con los controles en el hígado, cerebro, bazo, piel, estómago, nódulos linfáticos o el corazón. En el pulmón, había presente inflamación perivascular linfocítica en los ratones tratados con IL-33 en comparación con los controles únicamente en el grupo intranasal y únicamente después de 6 semanas de tratamiento. Esto es coherente con la exposición máxima a IL-33 oxidada (**Figura 53**). En conclusión, el tratamiento de ratones KO para ST2 con IL-33 aumenta la presencia de infiltrado linfocítico perivascular en los pulmones de ratones tratados con IL-33 en comparación con los controles. Esta patología puede estar mediada por IL-33 oxidada.

La figura 54A muestra secciones representativas en parafina teñidas con H&E de tejido pulmonar de ratones a los que se administró PBS por vía intranasal durante 6 semanas (n=3).

La figura 54B muestra secciones representativas en parafina teñidas con H&E de tejido pulmonar de ratones a los que se administró IL-33 por vía intranasal durante 6 semanas (n=4).

Análisis de rutas de pulmón de ratón tratado con IL-33

Para tener una perspectiva acerca de las vías moduladas por IL-33 oxidad en el pulmón de ratón que dan lugar a la respuesta inflamatoria observada, se llevó a cabo un análisis de micromatriz en tejido pulmonar de animales tratados con PBS durante 6 semanas frente a tratados con IL-33 durante 6 semanas.

Se recogieron tejidos pulmonares de 7 ratones ST2KO (3 dosificados con PBS y 4 dosificados con IL33-01 como se ha descrito anteriormente) y se colocaron directamente en 350uL de tampón RLT (Qiagen, n.° 79216). Después se rompió el tejido usando un dispositivo Qiagen TissueLyser (Qiagen, n.° 85300) según el protocolo del fabricante y se purificó el ARN usando el kit para tejido fibroso RNeasy (Qiagen, n.° 74704). Después, se concentró el ARN purificado mediante este kit usando columnas RNeasy Micro (Qiagen, n.° 74004) según el protocolo del fabricante. Después, se amplificó el ARN en ADN monocatenario usando el kit de reactivo GeneChip WT Plus de Affymetrix (Affymetrix, n.° 902513) y se hibridaron en chips génicos de Mouse Transcriptome 1.0 (MTA1.0) (Affymetrix, n.° 900720), se lavaron en la estación de fluidos de Affymetrix y se escanearon en el dispositivo Affymetrix Genechip Scanner 3000 7G. Después, se procesaron los datos en la consola de Affymetrix Expression. Los datos se analizaron en Microsoft Excel y se clasificaron respecto de genes donde al menos 2 de los 4 ratones tratados con IL33 habían aumentado más de

1.2 veces en la señal respecto de la media del grupo de control. La lista de genes clasificados se convirtió a ID de KEGG usando Biological Database Network (BioDBnet v2.1) y se analizaron en el análisis de rutas KEGG (www.kegg.jp; KEG Mapper v2.5). Los mismos genes que se analizaron en KEGG Pathway se analizaron también usando Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Qiagen). El análisis IPA sugirió que las rutas relacionadas con el ciclo celular parecían estar moduladas. Los genes de ejemplo se listan en la **Tabla 38.**

Tabla 38. Genes modulados en ratones deficientes para ST2 mediante tratamiento intranasal con IL-33

	Símbolos de los genes
Genes regulados positivamente en relación con el ciclo celular (múltiplo de cambio medio >1.2)	HSPA1A, CEBP, CDKN1A, JUNB, AHCY, SOX2, MYC, ID2, HRAS, EGR1, WT1, JUND, COX4I1
Genes regulados negativamente en relación con el ciclo celular (múltiplo de cambio medio >-1.2)	IL1A, HGF, ERG, ZEB1, P10, DMTF1, ARHGAP18, PLA2R1, NSMCE2, CAV1

Señalización de DSB IL-33 en HUVEC

Para determinar si podría observarse una respuesta a IL-33 humana oxidada (DSB) en células humanas, se exploró la estimulación *in vitro* de células humanas. El análisis de micromatriz de ratón indicó la activación de rutas relacionadas con el ciclo celular y por lo tanto, se investigó la señalización de MAP cinasa p38 y JAK-STAT. Se cultivaron células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) según las instrucciones del fabricante y se

estimularon con IL-33 reducida o DSB. Se detectó translocación de p-p38 MAPK o de p-STAT5 mediante tinción de inmunofluorescencia. La obtención de imágenes y la cuantificación de la intensidad de tinción nuclear se llevó a cabo en un lector ArrayScan VTi HCS (Cellomics). El ensayo fue esencialmente el mismo que el descrito para la translocación nuclear de NFκB p65/RelA pero con las siguientes modificaciones.

Para el ensayo de p-p38 MAPK, las HUVEC se sembraron a razón de $1x10^4$/75µl/pocillo en medio de cultivo [EBM-2 (Lonza, n.º CC-3156) con el kit complementario EGM-2 SingleQuot y factores de crecimiento (Lonza, n.º CC-4176)] en placas de 96 pocillos de paredes negras y fondo plano transparente recubiertas con colágeno I (Greiner, n.º 655956) y se incubaron a 37ºC, CO_2 al 5% durante 18-24 horas. Las muestras de ensayo de IL-33 reducida o DSB (por duplicado) se diluyeron a la concentración deseada en medio de cultivo completo en placas de polipropileno de fondo en U de 96 pocillos (Greiner, 650201) y se añadieron 75ul a las placas de HUVEC para iniciar la estimulación. Después de 15 o 30 minutos de ensayo de incubación a 37ºC, se fijaron las células durante 15 minutos en solución de formaldehído al 3.7% (mediante la adición de 50ul de solución al 16% que se había precalentado a 37ºC). El fijativo se aspiró y se lavaron las células dos veces con 100µL/pocillo de PBS. Las células se tiñeron para p-p38 con anticuerpo para fosfo-p38 (Cell Signalling, n.º 9211S) a una dilución 1:250. En resumen, se permeabilizaron las células durante 15 minutos a temperatura ambiente, se bloquearon durante 15 minutos y se tiñeron durante 1 hora con solución de anticuerpo primario en un volumen de 50µl.

Las placas se lavaron 2 x en tampón de bloqueo y se tiñeron durante 1 hora a temperatura ambiente con solución de anticuerpo secundario (IgG de cabra anti-conejo marcada con DyLight 488; ThermoFisher Scientific, n.º 35552 a una dilución 1:400) y tinción nuclear de Hoechst (ThermoFisher Scientific n.º 62249 a una dilución 1:10000). Las células se lavaron 2 x en PBS. Las células se almacenaron en un volumen final de 150µl/pocillo de PBS y se cubrieron con un sello ligero de bloqueo negro (Perkin Elmer, n.º 6005189) antes de leerlas en un lector ArrayScan VTi HCS. La intensidad de la tinción nuclear se calculó usando un algoritmo adecuado. Los datos se analizaron usando el programa informático Graphpad Prism.

Para el ensayo de pSTAT5, las HUVEC se sembraron a razón de $1x10^4$/75µl/pocillo en medio de cultivo [EBM-2 (Lonza, n.º CC-3156) con el kit complementario EGM-2 SingleQuot y factores de crecimiento (Lonza, n.º CC-4176)] en placas de 96 pocillos de paredes negras y fondo plano transparente recubiertas con colágeno I (Greiner, n.º 655956) y se incubaron a 37ºC, CO_2 al 5% durante 18-24 horas. Después de esto, se aspiró el medio completo, se lavaron las células 2x en 100ul de PBS/pocillo, se aspiró el PBS y se añadieron 75ul de medio de ayuno [EBM-2 (Lonza, n.º CC-3156) con pen/estrep] a cada pocillo. Después, se incubaron las células a 37ºC, CO_2 al 5% durante 18 horas. Las muestras de ensayo de IL-33 reducida o DSB (por duplicado) se diluyeron a la concentración deseada en medio de ayuno en placas de polipropileno de fondo en U de 96 pocillos (Greiner, 650201) y se añadieron 75ul a las placas de HUVEC para iniciar la estimulación. Después de 15 o 30 minutos de ensayo de incubación a 37ºC, se fijaron las

células durante 15 minutos en solución de formaldehído al 3.7% (mediante la adición de 50ul de solución al 16% que se había precalentado a 37ºC). El fijativo se aspiró y se lavaron las células dos veces con 100µL/pocillo de PBS. Las células se tiñeron para p-STAT5 con anticuerpo de conejo para fosfo-STAT5 C71E5 (Cell Signalling, n.º 9314S) a una dilución 1:250, que se detectó como se ha descrito anteriormente.

La IL-33 reducida desencadenó la señalización de p-p38 MAPK, que se perdió tras su oxidación a la forma DSB (**Figura 55A**) de manera similar a la descrita previamente para la señalización de NFκB (Ejemplos 4-6). Sin embargo, la DSB IL-33, pero no la IL-33 reducida, desencadenó la señalización de p-STAT5 (**Figura 55B**). Por lo tanto, se observó un cambio claro en la activación de la vía de señalización tras la conversión de IL-33 humana de la forma reducida a la forma DSB, lo que sugiere que DSB IL-33 puede tener una actividad distinta a las vías de IL-33 conocidas.

Para confirmar el resultado de los ensayos de translocación nuclear, se determinó la señalización de IL-33 mediante análisis de transferencia de Western. Se estimularon HUVEC como en el caso anterior con IL-33 reducida o DSB (3ng/ml) durante 15 minutos. Después, las células se lavaron dos veces en PBS enfriado en hielo y se lisaron con 250ul de tampón RIPA (Pierce, n.º 89901) que contenía inhibidores de proteasa HALT (Pierce, n.º 78430). Las muestras se sometieron a SDS-PAGE en condiciones reductoras. Las muestras se mezclaron a razón de 3:1 con tampón de carga de gel NuPAGE 4x (Invitrogen) y se desnaturalizaron a 90ºC durante 3 minutos. Las muestras reducidas contenían beta-mercaptoetanol al 2%. Las muestras

se ejecutaron en minigeles NuPAGE Novex con Bis-Tris al 4-12% (Invitrogen) con tampón de ejecución MOPS (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Invitrogen, n.° de cat IB3010-02) y se detectaron mediante transferencia de Western con anticuerpo para fosfo-p38 MAPK de conejo (Cell Signalling, n.° 9211S), anticuerpo para fosfo-STAT5 de conejo C71E5 (Cell Signalling, n.° 9314S) o anticuerpo para p-JAK2 de conejo (Cell Signalling n.° 3771S). Los anticuerpos primarios se detectaron con anti-conejo-HRP (Cell Signalling, n.° 7074) y se visualizaron usando reactivo ECL (Thermo Scientific, n.° 34096).

La figura 55A muestra la actividad de translocación nuclear de p-p38 MAPK en HUVEC en respuesta a IL-33 reducida o DSB IL-33 (IL33-01 pretratada con medio IMDM), en donde el eje x muestra la concentración de IL-33 y el eje y muestra la señal de translocación nuclear en unidades arbitrarias. Se observó una señal dependiente de la dosis para la IL-33 reducida, pero no para la oxidada.

La figura 55B muestra la translocación nuclear de p-STAT5 en HUVEC en respuesta a IL-33 reducida o DSB IL-33 (IL33-01 pretratada con medio IMDM), en donde el eje x muestra la concentración de IL-33 y el eje y muestra la señal de translocación nuclear en unidades arbitrarias. Se observó una señal dependiente de la concentración para IL-33 DSB pero no para la reducida.

Figura 55C. Análisis de transferencia de Western de p-p38 MAPK, p-JAK2 y p-STAT5 en HUVEC estimuladas durante 15 minutos con IL-33 reducida o DSB IL-33 (IL33-01 pretratada con medio IMDM). La activación de p-p38 MAPK se detectó después de la estimulación con IL-33 reducida pero no DSB.

La activación de p-JAK2 y p-STAT5 se detectó después de la estimulación con DSB IL-33 pero no con IL-33 reducida.

La señalización de DSB IL-33 está mediada por el receptor para productos finales de glucación avanzada (RAGE)

Para tener una perspectiva acerca de las vías moduladas por DSB IL-33 en HUVEC, se cultivaron HUVEC como se ha descrito anteriormente, se sembraron a razón de $1x10^6$ células/pocillo en una placa tratada para cultivo tisular de 6 pocillos (Nunc, 140675). Después de una incubación durante una noche, las células se estimularon con DSB IL-33 durante 2 o 6 horas. Las células se recogieron en 350ul de tampón RLT (Qiagen, n.° 79216). El ARN se purificó usando el kit RNeasy Micro (Qiagen, n.° 74004) según el protocolo del fabricante. Después, se amplificó el ARN en ADN monocatenario usando el kit de reactivo GeneChip WT Plus de Affymetrix (Affymetrix, n.° 902513) y se hibridaron en chips génicos de Human Genome U133A 2.0 (U133A 2.0) (Affymetrix, n.° 900469), se lavaron en la estación de fluidos de Affymetrix y se escanearon en el dispositivo Affymetrix Genechip Scanner 3000 7G. Después, se procesaron los datos en la consola Affymetrix Expression y se clasificaron respecto de genes con un cambio mayor de ±1.8 veces en la señal respecto del control no tratado. Se observaron muy pocos cambios de expresión génica (**Tabla 39**). Sin embargo, el panel génico limitado se analizó usando Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Qiagen), lo que sugirió la vía de señalización EIF2 a las 2 horas y señalización de AGER a las 6 horas. Potencialmente, esto sugirió la activación de la vía de depuración / receptor para productos finales de glucación avanzada (RAGE).

Tabla 39. Genes modulados en HUVEC estimuladas con DSB-IL-33.

Punto de tiempo	**Símbolos de los genes** Genes regulados >±1.8 veces
2 horas	EIF3F, RPL14 , RPL38, RPL27A, RPL37A, RPS10, RPS27L
6 horas	IFIT1, S100A8

El receptor para los productos finales de glucación avanzada (RAGE) es un receptor para múltiples ligandos que pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas y reconoce a una serie de ligandos, incluyendo la caja 1 del grupo de alta movilidad (HMGB-1), familia de proteínas S100, productos finales de glucación avanzada (AGE) y materiales fibrilares de lámina β. Se cree que está implicado en el estrés oxidativo y se ha relacionado con la patogénesis de numerosas enfermedades.

Para evaluar si DSB interactuó directamente con RAGE, se usó un formato ELISA para explorar la unión de RAGE a IL-33 reducida frente a DSB IL-33 (**Figura 56A**). Las IL-33 marcadas con His Avi N-terminal reducidas o DSB (IL33-01, SEQ ID NO: 632) se biotinilaron como se ha descrito en el ejemplo 7. Se recubrieron placas de estreptavidina (Thermo Scientific, AB-1226) con antígeno biotinilado a razón de 50µg/ml en PBS y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron 3x con PBS-T (PBS + Tween-20 al 1% (v/v)) y se bloquearon con 300 µl/pocillo de tampón de bloqueo (PBS con BSA al 1% (Sigma, A9576)) durante 1 hora. Las placas se lavaron 3x con PBS-T. Se diluyó RAGE-Fc (R&D Systems, n.° 1145-RG) en tampón de bloqueo, se añadió a los pocillos recubiertos con IL-33 o

de control (sin IL-33) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Se detectó RAGE-Fc con anti-IgG humana HRP (Sigma, A0170) diluido a 1:5000 en tampón de bloqueo, 50 µl/pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3x con PBS-T y se revelaron con TMB, 50 µl/pocillo (Sigma, T0440). La reacción se inactivó con 50 µl/pocillo de H_2SO_4 0.1M antes de leerla en un lector de placas EnVision™ o un equipo similar a 450 nm.

Para confirmar adicionalmente la interacción de DSB IL-33 con RAGE, se evaluó la capacidad de RAGE-Fc o de los anticuerpos anti-RAGE para inhibir la señalización de pSTAT5 independiente de ST2 eh HUVEC. Para este fin, se usaron diversas concentraciones de DSB IL-33 (IL33-01 tratada con IMDM) para estimular HUVEC de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente en presencia o ausencia de RAGE-Fc (R&D Systems, n.° 1145-RG), ST2-Fc (R&D Systems, n.° 523-ST), mAb anti-RAGE (del documento WO 2008137552) o reactivos de control. La neutralización de DSB IL-33 con RAGE-Fc (**Figura 56B**) o la neutralización del receptor con mAb anti-RAGE (**Figura 56C**) fue capaz de inhibir completamente la señal de pSTAT5.

Figura 56A. Unión de RAGE-Fc a la superficie de placa de IL-33 reducida o DSB mediante ELISA, en donde el eje x muestra la concentración de RAGE-Fc y el eje y muestra la absorbancia a 450nM. Los datos mostraron la unión aumentada de RAGE a DSB IL-33 en comparación con IL-33 reducida.

La figura 56B muestra la respuesta de pSTAT5 a DSB IL-33 en HUVEC en presencia de RAGE-Fc (50ug/ml), ST2-Fc (50ug/ml) o anticuerpo de control negativo IgG1 anti-NIP, NIP228 (50ug/ml). La señalización de pSTAT5 se inhibió completamente por RAGE-Fc pero no con ST2-Fc o NIP228.

La figura 56C muestra la respuesta de pSTAT5 a DSB IL-33 en HUVEC en presencia de mAb anti-RAGE, m4F4 (10ug/ml) o anticuerpo de control negativo IgG1 de ratón (10ug/ml). La señalización de pSTAT5 se inhibió completamente por m4F4, pero no por mAb de control.

Prevención de la actividad de DSB IL-33 con anticuerpos anti-IL-33

Como se ha descrito en el ejemplo 8, los anticuerpos que se unen a IL-33 pueden prevenir la oxidación de IL-33 en la forma DSB (**Figura 43A**). Se evaluó la capacidad de los anticuerpos para IL-33 para prevenir la señalización de pSTAT5 en HUVEC.

Se prepararon concentraciones fijas de 33_640087-7B (SEQ ID NO: 616 y 618), anti-ST2 (del documento WO 2013/173761 Ab2; SEQ ID 85 y SEQ ID 19) y los mAb de control de isotipo en IMDM y después se combinaron (100ul con 100ul) con una titulación de IL-33 de TS (también preparada en IMDM) en placas de fondo en U de 96 pocillos. Las placas se incubaron a 37°C y CO2 al 5% durante una noche. Se añadieron 75ul de cada pocillo de estas placas de "tratamiento de preincubación" a las células "privadas de alimento" preparadas como se ha descrito anteriormente para el ensayo de pSTAT5 y se incubaron a 37°C durante 15 minutos. Después, se lavaron las células dos veces en PBS enfriado en hielo y se añadieron 100ul de tampón de lisis del ELISA Instant One de fosfo-STAT5A/B de eBioscience (eBioscience, n.° 85-86112-11) a cada pocillo. Después, se midió la actividad de pSTAT5 en los lisados celulares según las instrucciones del fabricante.

La figura 57 muestra la respuesta de pSTAT5 en HIVEC a IL-33 tratada con IMDM en presencia de 33_640087-7B

(10ug/ml) o mAb anti-ST2, Ab2, (10ug/ml), en donde el eje x es la concentración de IL-33 y el eje y es la señal de pSTAT5. La señalización de pSTAT5 se inhibió completamente mediante 33_640087-7B pero no por anti-ST2, confirmando que esta respuesta es independiente de ST2.

Los anticuerpos anti-IL-33 inhiben la respuesta dependiente de RAGE en células epiteliales

RAGE se expresa a alto nivel en células epiteliales de pulmón. Se evaluaron líneas celulares epiteliales de pulmón respecto de respuestas dependientes de DSB IL-33. Para este fin, se cultivaron células A549 en medio F12K (Gibco, n.° 21127022) complementado con penicilina/estreptomicina al 1% y FBS al 10%. Las células se recogieron con tripsina-EDTA al 0.5% (Gibco, n.° 15400-054), se lavaron y se sembraron en placas de 96 pocillos a razón de $1x10^5$ células/pocillo e medio de cultivo. Después, se incubaron las células a 37°C, CO_2 al 5% durante 24 horas. Al día siguiente, se retiró el medio, se lavaron las células dos veces en PBS y se reemplazó el medio por medio de "ayuno" (medio F12K con pen/estrep al 1%) y se incubaron las placas durante 24 horas a 37°C y CO_2 al 5%.

Se prepararon concentraciones fijas de 33_640087-7B (SEQ ID NO: 616 y 618), anti-ST2 (documento WO 2013/173761 Ab2 (SEQ ID 85 y SEQ ID 19)) anti-RAGE m4F4 (del documento WO 2008137552) y los mAb de control de isotipo en IMDM y después se combinaron (100ul con 100ul) con IL-33 de TS (también preparada en IMDM) en placas de fondo en U de 96 pocillos. Las placas tanto de células como de tratamiento se incubaron a 37°C y CO_2 al 5% durante una noche. Se añadieron 75ul de cada pocillo de estas placas de "tratamiento de preincubación" a las células "privadas de

alimento" preparadas como se ha descrito anteriormente y las placas se incubaron durante 24 horas a 37ºC y CO_2 al 5%. Después, se preparó el sistema transpocillo de 96 pocillos (Corning, n.º CLS3422-48EA) añadiendo una placa transpocillo de 96 pocillos a una placa receptora de 96 pocillos de baja unión. Se añadieron 235ul de medio completo (medio F12K complementado con FBS al 10% y pen/estrep al 1%) a la cámara inferior del sistema transpocillo. Después, se lavó cada pocillo de las células A549 tratadas en 96 pocillos en PBS, se tripsinizaron para desprenderlas, se centrifugaron a 1000rpm durante 5 min, se resuspendieron en 75ul de medio de "ayuno" y se añadieron a la cámara superior del sistema transpocillo. Después, se incubó la placa transpocillo a 37ºC, CO_2 al 5% durante 16 horas. Después se retiró el medio de las cámaras tanto superiores como inferiores y se retiraron las células de la cámara inferior usando 235ul de tripsina. Después, se añadieron 100ul de la suspensión de tripsina/células a 100ul de Cell Titer Glo (Promega, n.º G7571). Se preparó una titulación de células A549 frescas en tripsina y se añadió a una proporción de 50:50 a Cell Titer Glo para crear una curva patrón del número de células. Después, se incubaron y leyeron las placas según las instrucciones del fabricante.

La figura 58A muestra la migración de células A549 después del tratamiento con IL33-01 incubada en presencia de 33_640087-7B (10ug/ml), mAb anti-ST2, Ab2, (10ug/ml) o mAb anti-RAGE 4F4, en donde el eje x muestra las condiciones del pretratamiento de las células y el eje y es el número de células migradas. Los datos demuestran que el pretratamiento de células A549 con DSB IL-33 reduce la

migración posterior de células. Esta inhibición de la migración se revirtió mediante el mAb anti-RAGGE y 33_640087-7B, pero no por anti-ST2.

La figura 58B muestra la migración de células A549 después del tratamiento con DSB IL33-01 incubada en presencia de 33_640087-7B (10ug/ml) o mAb anti-ST2, Ab2, (10ug/ml), en donde el eje x muestra las condiciones del pretratamiento de las células y el eje y es el número de células migradas. Los datos demuestran que el pretratamiento de células A549 con DSB IL-33 reduce la migración posterior de células. Esta inhibición de la migración no se revirtió mediante 33_640087-7B o anti-ST2.

En su conjunto, estos datos confirman que 33_640087-7B inhibe la actividad de DSB-IL-33, previniendo la conversión de IL-33 reducida a DSB IL-33 en lugar de neutralizar directamente a DSB IL-33, lo que es coherente con su capacidad para unirse únicamente a la forma reducida, activa en ST2 de IL-33.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.