

MÉTODOS PARA TRATAR AFECCIONES INFLAMATORIAS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a métodos para tratar una
5 afección inflamatoria que comprende administrarle a un sujeto
que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un
antagonista de interleucina-33 (IL-33) solo o en combinación
con un antagonista de interleucina-4 (IL-4). Más
específicamente, la presente invención se refiere a tratar
10 trastornos o enfermedades pulmonares obstructivas o
inflamatorias mediante la administración de una cantidad
terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de interleucina-33
(IL-33) solo o en combinación con un anticuerpo de
interleucina-4R (IL-4R).

15

ANTECEDENTES

La inflamación se inicia como respuesta protectora por el
hospedador, pero a menudo puede dar como resultado patologías
sistémicas. Las enfermedades pulmonares inflamatorias, tales
20 como el asma, alergia y enfermedad pulmonar obstructiva
crónica (EPOC) están aumentando en los países desarrollados,
lo cual tiene como resultado consecuencias importantes para
los costos de los servicios médicos. Diversas células
inflamatorias y sus mediadores participan en el desarrollo y

evolución de estas enfermedades. En determinados casos, estas
 enfermedades asemejan el resultado del a inmunidad tipo 2,
 que se caracteriza por la infiltración de los tejidos con
 eosinófilos, basófilos, mastocitos, linfocitos T auxiliares 2
 5 (Th2) CD4+, células linfoides innatas del grupo 2 (ILC2, por
 sus siglas en inglés), macrófagos inducidos por interleucina-
 4 (IL-4) y/o IL-13, así como una elevación de IgE en suero y
 mediante un aumento de las citocinas IL-4, IL-5, IL-9 e IL-
 13.

10 Una citocina que se cree que tiene un papel en las
 enfermedades pulmonares inflamatorias es la interleucina-33
 (IL-33), una citocina proinflamatoria liberada por el tejido
 epitelial dañado en respuesta a agresiones tales como
 alérgenos, virus o humo. IL-33 es un miembro de la familia de
 15 interleucina-1 (IL-1) que impulsa de forma potente la
 producción de citocinas asociadas con T auxiliar 2 (Th2) (por
 ejemplo, IL-4). IL-33 es expresada por una amplia variedad de
 tipos celulares, inclusive fibroblastos, mastocitos, células
 dendríticas, macrófagos, osteoblastos, células epiteliales y
 20 células epiteliales. La interleucina-33 (IL-33) es un
 ligando para ST2 (a menudo mencionado como "supresión de
 tumorigenicidad 2"), un miembro de la superfamilia del
 receptor de interleucina 1/tipo toll que se asocia con una
 proteína accesoria, IL-1RAcP ("proteína accesoria de receptor

de interleucina-1", por reseñas, véanse, por ejemplo, Kakkar y Lee, *Nature Reviews - Drug Discovery* 7(10):827-840 (2008), Schmitz et ál., *Immunity* 23:479-490 (2005); Liew et ál., *Nature Reviews - Immunology* 10:103-110 (2010); US 2010/0260770; US 2009/0041718). Después de la activación de ST2/IL-1RAcP mediante IL-33, se activa una cascada de señalización mediante moléculas posteriores, como MyD88 (factor de diferenciación mieloide 88) y TRAF6 (factor asociado al receptor de TNF 6), lo lleva a la activación de NFκB (factor nuclear κB), entre otros. La señalización de IL-33 se ha visto implicada como factor en una variedad de enfermedades y trastornos, inclusive las enfermedades pulmonares inflamatorias descritas en la presente. (Liew et ál., *Nature Reviews - Immunology* 10:103-110 (2010)). Los inhibidores de la señalización de IL-33 se han descrito, por ejemplo, en US9,453,072; US8187596; US2013/17373761; US2014/0212412; US2014/0271658; US2014/0271642; US2014/0004107; WO2015/099175; WO2015/106080; WO2011/031600; WO2014/164959; WO2014/152195; WO2013/165894; WO2013/173761; EP1725261; EP10815921A1; y EP2850103A2.

La interleucina-4 (IL-4, también conocida como factor estimulante de linfocitos B o BSF-1) también se ha implicado como citocina clave que impulsa procesos alérgicos e inflamatorios polarizados por linfocitos T auxiliares tipo 2

(Th2). Se ha observado que IL-4 posee un amplio espectro de actividades biológicas, inclusive estimulación del crecimiento de linfocitos T, mastocitos, granulocitos, megacariocitos y eritrocitos. IL-4 induce la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II en linfocitos B en reposo y mejora la secreción de isotipos de IgG1 e IgE mediante linfocitos B estimulados. Las actividades biológicas de IL-4 están mediadas por receptores específicos de la superficie celular para IL-4. El receptor alfa de IL-4 humana (hIL-4R) (SEQ ID NO: 347) se describe, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.º 5,599,905, 5,767,065 y 5,840,869. Los anticuerpos para hIL-4R se describen en las patentes estadounidenses n.º 5,717,072, 7,186,809 y 7,605,237. Los métodos para utilizar los anticuerpos para hIL-4R se describen en las patentes estadounidenses n.º 5,714,146; 5,985,280; 6,716,587 y 9,290,574.

Las terapias actuales para el tratamiento de enfermedades inflamatorias del pulmón tienen mucho que mejorar respecto a la seguridad y eficacia en pacientes que padecen, por ejemplo, asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), particularmente para reducir exacerbaciones. A pesar de que hay disponibles numerosas combinaciones de fármacos broncodilatadores y antiinflamatorios inhalados, muchos

pacientes siguen experimentando exacerbaciones. Las exacerbaciones pueden requerir el uso de corticosteroides sistémicos, que son eficaces debido a su amplia capacidad de neutralización inmunitaria, pero están cargados con efectos secundarios no deseables, inclusive infección y pérdida ósea. Muchas terapias biológicas, la mayoría de las cuales se dirigen a mediadores inmunitarios individuales, se encuentran en etapa de desarrollo tardío para el asma y EPOC. Sin embargo, debido a la complejidad del entorno inflamatorio, estos agentes es probable que tengan un uso limitado. Por consiguiente, existe una necesidad insatisfecha en la técnica de combinaciones novedosas de terapias para el tratamiento y/o prevención de enfermedades pulmonares inflamatorias, tales como las descritas en la presente.

15

BREVE COMPENDIO DE LA INVENCION

De acuerdo con determinados aspectos de la presente invención, se proporcionan métodos para tratar un trastorno o enfermedad inflamatoria, o al menos un síntoma asociado con el trastorno o enfermedad inflamatoria, donde el método comprende administrarle a un sujeto que lo necesita una o más dosis de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de interleucina-33 (IL-33) solo o en combinación con una o más dosis de una cantidad terapéuticamente eficaz

20

de un antagonista de interleucina-4 (IL-4), o una composición farmacéutica que comprende un antagonista de IL-33 y un antagonista de IL-4 α a un paciente que lo necesita. En una modalidad, la administración del antagonista de IL-33 en
5 comparación con el antagonista de IL-4 da como resultado una mejora en la eficacia terapéutica en comparación con la observada con la administración del antagonista de IL-33 solo o el antagonista de IL-4 solo.

En determinadas modalidades, el antagonista de IL-33 es
10 cualquier agente que sea capaz de bloquear, atenuar o interferir de otro modo con la señalización de IL-33 y/o la interacción entre IL-33 y un receptor celular (por ejemplo, ST2) o un correceptor (por ejemplo, IL-1RAcP) o un complejo de estos. Cualquiera de los anteriores puede bloquear o
15 inhibir al menos una actividad biológica de IL-33.

En determinadas modalidades, el antagonista de IL-33 es un anticuerpo que se une o interactúa con IL-33 y bloquea la interacción de IL-33 con su receptor, ST2, y previene o inhibe la interacción de ST2 con el correceptor, IL1-RAcP, o
20 previene la formación de un complejo de señalización. En una modalidad, el antagonista de IL-33 es un anticuerpo monoclonal que se une o interactúa específicamente con IL-33 humana. En una modalidad, el antagonista de IL-33 es una trampa basada en receptor que se une o interactúa

específicamente con IL-33 humana.

En una modalidad, el antagonista de IL-4 es un antagonista del receptor de interleucina-4 (IL-4R).

En una modalidad, el antagonista de IL-4R es cualquier agente
5 que se una o interactúe con IL-4R α o un ligando de IL-4R e inhiba o atenúe la función de señalización biológica normal de un receptor de IL-4 de tipo 1 y/o tipo 2. En una modalidad, el antagonista de IL-4R es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente con IL-4R α humana. En
10 una modalidad, el antagonista de IL-4R es un anticuerpo monoclonal que se une a IL-4R α y bloquea tanto la señalización mediada por IL-4 como por IL-13 ya sea del receptor tipo I o tipo II. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal que se une específicamente a IL-4R α y bloquea
15 tanto la señalización mediada por IL-4 como por IL-13 es dupilumab o un bioequivalente de este. En una modalidad, el método para tratar un trastorno o afección inflamatoria se logra a través del uso de una combinación de REGN3500 que tiene un par de secuencias de aminoácidos de región variable
20 de cadena pesada/región variable de cadena ligera (HCVR/LCVR, por sus siglas en inglés) de las SEQ ID NO: 274/282 y dupilumab que tiene un par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR de las SEQ ID NO: 337/338.

En una modalidad, el trastorno o enfermedad inflamatoria que

se puede tratar mediante los métodos de la invención se selecciona del grupo que consiste en asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), síndrome de superposición asma-EPOC (ACOS, por sus siglas en inglés),
 5 dermatitis atópica, pólipos nasales, una respuesta alérgica, bronquitis crónica, enfisema, rinosinusitis crónica con o sin pólipos nasales, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, neumonitis por hipersensibilidad, esclerosis múltiple, artritis (inclusive
 10 osteoartritis, artritis reumatoide o artritis psoriásica), rinitis alérgica, fibrosis, esofagitis eosinofílica, vasculitis, urticaria, síndrome de Churg Strauss, dolor inflamatorio y psoriasis.

En una modalidad, el asma es asma eosinofílica.

15 En una modalidad, el asma es asma no eosinofílica.

En una modalidad, el asma es asma alérgica.

En una modalidad, el asma es asma no alérgica.

En una modalidad, el asma es asma refractaria grave.

En una modalidad, el asma es asma resistente a esteroides.

20 En una modalidad, el asma es asma sensible a esteroides.

En una modalidad, el asma es asma refractaria por esteroides.

En una modalidad, el asma es exacerbación del asma.

En una modalidad, se alivia o se reduce la gravedad, duración o frecuencias de aparición del trastorno o enfermedad

inflamatoria, o se alivia o reduce la gravedad, duración o frecuencia de aparición de al menos un síntoma asociado con el trastorno o enfermedad inflamatoria.

En una modalidad, la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más dosis de un antagonista de IL-33 a un sujeto que lo necesita, solo o en combinación con una o más dosis de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de IL-4R da como resultado una mejora de la eficacia terapéutica, según se mide mediante uno o más de los siguientes parámetros:

- a) una reducción de la frecuencia de uno o más de los siguientes: eosinófilos, linfocitos B activados, linfocitos T CD8 activados o proporción entre linfocitos T CD4/CD8 en una muestra de tejido;
- 15 b) una reducción de uno o más de los siguientes: niveles de interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6), interleucina-13 (IL-13), proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1) o factor de necrosis tumoral alfa (TNF α , por sus siglas en inglés) en una muestra de tejido; o
- 20 c) una reducción del nivel de expresión génica de uno o más de los siguientes: *Il4*, *Il5*, *Il6*, *Il9*, *Il13*, *Il1rl1*, *Il13ra2*, *tnf*, *Tgfb1*, *Ccl2*, *Ccl11*, *Ccl24*, *Col15a1* o *Col24a1* en una muestra de tejido.

En una modalidad, la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más dosis de un antagonista de IL-33 a un sujeto que lo necesita, solo o en combinación con una o más dosis de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de IL-4R da como resultado una mejora de la eficacia terapéutica, según se mide adicionalmente mediante uno o más de los siguientes:

- d) reducción de los niveles de IgE en suero
- e) reducción de metaplasia de células caliciformes en el pulmón;
- f) una mejora de la consolidación tumoral; o
- g) una disminución de la fibrosis subepitelial en el pulmón.

En una modalidad, la muestra de tejido se obtiene del pulmón. En una modalidad, la muestra de tejido se selecciona del grupo que consiste en riñón, hígado, corazón o sangre entera. En determinadas modalidades, pueden utilizarse células sanguíneas, suero o plasma para medir uno o más de los parámetros descritos anteriormente.

En una modalidad, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica que se puede tratar mediante los métodos de la invención puede exacerbarse mediante uno o más de los siguientes: asma, una enfermedad viral, una infección bacteriana, una exposición a un alérgeno, una exposición a un químico a vapores químicos o una exposición a un ambiente irritante o a

polución del aire.

En una modalidad relacionada, el asma que se puede tratar mediante los métodos de la invención puede exacerbarse mediante uno o más de los siguientes: una enfermedad viral,
5 una infección bacteriana, una exposición a un alérgeno, una exposición a un químico a vapores químicos o una exposición a un ambiente irritante o a polución del aire.

En una modalidad determinada, el asma que se puede tratar mediante los métodos de la invención se selecciona del grupo
10 que consiste en asma eosinofílica, asma no eosinofílica, asma resistente a esteroides y asma sensible a esteroides.

En una modalidad, la enfermedad obstructiva crónica que se puede tratar mediante los métodos de la invención surge o se exagera en parte por el humo de cigarro.

15 En una modalidad, los pacientes que padecen la enfermedad obstructiva crónica que se puede tratar mediante los métodos de la invención puede o no presentar un aumento de la cantidad de eosinófilos.

En una modalidad, los pacientes que padecen de síndrome de
20 superposición de asma y EPOC (ACOS) que se puede tratar mediante los métodos de la invención puede o no presentar un aumento de la cantidad de eosinófilos.

Un segundo aspecto de la invención proporciona el tratamiento de un trastorno o enfermedad inflamatoria, o al menos un

síntoma asociado con el trastorno o enfermedad inflamatoria, mediante la administración de una cantidad eficaz de uno o más agentes terapéuticos útiles para aliviar el trastorno o enfermedad inflamatoria, o al menos un síntoma del trastorno
5 o enfermedad inflamatoria, en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de interleucina-33 (IL-33), por ejemplo un anticuerpo de IL-33 o una trampa de IL-33, y una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de interleucina-4 (IL-4), por ejemplo, un
10 anticuerpo de IL-4R, tal como dupilumab, o un equivalente terapéutico de estos.

En una modalidad, el o los agentes terapéuticos adicionales se seleccionan del grupo que consiste en un antiinflamatorio no esteroideo (AINE), un corticosteroide (por ejemplo, un
15 corticosteroide inhalado o ICS), un agonista adrenérgico β 2 de acción prolongada (LABA), un agonista muscarínico de acción prolongada (LAMA, por sus siglas en inglés), un broncodilatador, un antihistamínico, epinefrina, un descongestivo, un antagonista de linfopoyetina estromal
20 tímica (TSLP, por sus siglas en inglés), un antagonista de IL-1, un antagonista de IL-8, un antagonista de IL-13, un antagonista de IL-4 diferente, un antagonista dual de IL-4/IL-13, un antagonista de dual de IL-33/IL-13, un antagonista de IL-5, un antagonista de IL-6, un antagonista

de IL-12/23, un antagonista de IL-22, un antagonista de IL-25, un antagonista de IL-17, un antagonista de IL-31, un inhibidor de TNF, un inhibidor de IgE, un inhibidor de leucotrieno, un inhibidor de PDE4 oral, metilxantina, nedocromil sodio, cromolín sodio, un agonista beta 2 de acción prolongada u otros antagonistas de IL-33 (por ejemplo, un anticuerpo diferente a IL-33, un receptor diferente a una trampa basada en el receptor de IL-33, un antagonista de ST2, inclusive un anticuerpo de ST2, o un receptor soluble de ST2 receptor, o un antagonista a otro receptor de IL-33 diferente a ST2, o un antagonista de IL-1RAcP, inclusive un anticuerpo de IL-1RAcP, o un anticuerpo que interactúa con un complejo de IL-33/ST2).

En algunas modalidades, la presente invención proporciona método para tratar una enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) de moderada a grave, que comprende la administración concomitante de un antagonista de IL-4R (por ejemplo, dupilumab) y un antagonista de IL-33 (por ejemplo, REGN3500), además de una terapia de fondo que inclusive, por ejemplo, un corticosteroide inhalado (ICS, por sus siglas en inglés) y/o un agonista adrenérgico β 2 de acción prolongada (LABA) y/o un antagonista muscarínico de acción prolongada (LAMA).

En determinadas modalidades, la presente invención

proporciona métodos para reducir la incidencia de eventos de "pérdida de control del asma" (LOAC, por sus siglas en inglés) que comprenden tratar a pacientes que padecen asma con un antagonista de IL-4R (por ejemplo, dupilumab) en combinación con un antagonista de IL-33 (REGN3500). En determinadas modalidades, el uso combinado de un antagonista de IL-4R con un antagonista de IL-33 proporciona un resultado más eficaz que la administración de cada uno del antagonista de IL-4R solo o el antagonista de IL-33 solo.

En una modalidad relacionada, la administración del antagonista de IL-33 en combinación con el antagonista de IL-4R da como resultado un aumento de la respuesta inmunitaria de tipo 1 y/o una reducción de la respuesta inmunitaria de tipo 2 producida por la enfermedad, o por el agente causante de la enfermedad o alergia.

Un tercer aspecto de la invención proporciona un método para tratar un trastorno o enfermedad fibrótica, o al menos un síntoma asociado con el trastorno o enfermedad fibrótica, donde el método comprende administrar una combinación de un antagonista de IL-33 (un anticuerpo de IL-33 o trampa de IL-33) que se une específicamente a IL-33, y un anticuerpo que se une específicamente a IL-4R α o un fragmento de unión al antígeno de este, o una composición farmacéutica que comprende un antagonista de IL-33 y un antagonista de IL-4 α ,

a un paciente que lo necesita, donde se alivia o reduce la gravedad o duración del trastorno o enfermedad fibrótica, o se alivia o reduce la gravedad, duración o frecuencia de la aparición de al menos un síntoma del trastorno o enfermedad fibrótica. En una modalidad, el tratamiento de la enfermedad fibrótica con un antagonista de IL-33 en combinación con un antagonista IL-4R puede dar como resultado la restauración del tejido fibrótico a su estado normal.

En una modalidad, los trastornos o enfermedades fibróticas que se pueden tratar mediante la administración de los antagonistas anti-IL-33 y de IL-4R de la invención, tales como los anticuerpos de IL-33 o trampas de IL-33 en combinación con los anticuerpos de IL-4R α descritos en la presente, incluyen fibrosis pulmonar (por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, fibrosis pulmonar inducida por asbestos y síndrome de bronquiolitis obliterante), asma crónica, fibrosis asociada a lesiones pulmonares agudas y síndrome de dificultad respiratoria aguda (por ejemplo, fibrosis inducida por neumonía bacteriana, fibrosis inducida por traumatismo, fibrosis inducida por neumonía viral, fibrosis inducida por ventilador, fibrosis inducida por sepsis no pulmonar y fibrosis inducida por aspiración), silicosis, fibrosis inducida por radiación, enfermedad pulmonar obstructiva

crónica (EPOC, que puede estar o no relacionada, causada en parte o surgir de la exposición directa o indirecta al humo de cigarro), escleroderma, fibrosis ocular, fibrosis de la piel (por ejemplo, escleroderma), fibrosis hepática (por ejemplo, cirrosis, fibrosis hepática inducida por alcohol, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), lesión del ducto biliar, cirrosis biliar primaria, fibrosis hepática inducida por infección o virus, hepatitis autoinmunitaria, fibrosis de riñón (renal), fibrosis cardíaca, aterosclerosis, restenosis del stent y mielofibrosis.

Un cuarto aspecto de la invención proporciona un método para prevenir o reducir la gravedad de una respuesta alérgica, donde el método comprende administrar una o más dosis de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de IL-33 en combinación con una o más dosis de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de IL-4R a un sujeto que lo necesita, donde la administración de la combinación da como resultado una mejora de la eficacia terapéutica para prevenir o reducir la gravedad de una respuesta alérgica en comparación con la observada con la administración del antagonista de IL-33 solo o del antagonista de IL-4R solo. El sujeto tratado con el antagonista de IL-33 en combinación con el antagonista de IL-4R puede presentar una reducción de sensibilidad o una

reacción alérgica disminuida ante el alérgeno, o puede no experimentar ninguna reacción alérgica o sensibilidad o una respuesta anafiláctica ante el alérgeno después de la administración de la combinación del antagonista de IL-33 y el antagonista de IL-4R o una composición que comprende los antagonistas.

En una modalidad, el antagonista de IL-33 para su uso en los métodos de la invención es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno de este que se une o interactúa específicamente con IL-33 humana. El anticuerpo de IL-33 o fragmento de unión al antígeno de este puede bloquear la interacción de IL-33 y ST2, o puede permitir la unión de baja afinidad de IL-33 al receptor de ST2. Al hacer esto, se le puede prohibir a ST2 que interactúe con IL-1RACP. En sí, los anticuerpos de IL-33 de la invención son útiles, entre otras cosas, para inhibir la señalización mediada por IL-33 y para tratar trastornos y enfermedades causados por la actividad y/o señalización de IL-33 o relacionados con estas. En una modalidad, el anticuerpo de IL-33 o fragmento de unión al antígeno de este reduce la frecuencia de uno o más de los siguientes: eosinófilos, linfocitos T CD4+, linfocitos B, linfocitos ST2+/CD4+ en la población de linfocitos T o reduce la proporción entre linfocitos T CD4/CD8 en los pulmones cuando se administra a un mamífero que tiene una inflamación

pulmonar inducida por alérgenos.

En una modalidad, el anticuerpo de IL-33 o fragmento de unión al antígeno de este reduce el nivel de expresión de uno o más de los siguientes: IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, Ccl2, Ccl11, Ccl24 o MCP-1 en los pulmones cuando se administra a un mamífero que tiene una inflamación pulmonar inducida por alérgenos.

En una modalidad, el anticuerpo de IL-33 o fragmento de unión al antígeno de este reduce los niveles de IgE en suero, metaplasia de células caliciformes, o espesor del colágeno epitelial en los pulmones cuando se administra a un mamífero que tiene una inflamación pulmonar inducida por alérgenos.

En determinadas modalidades, los anticuerpos de IL-33 que se unen específicamente a IL-33 humana, o los fragmentos de unión al antígeno de estos, que pueden utilizarse en los métodos de la invención comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) que se encuentran dentro de una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada (HCVR) que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 y 308; y comprende tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera (LCVR) que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID

NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298 y 316.

En determinadas modalidades, los anticuerpos de IL-33 que se unen específicamente a IL-33 humana, o los fragmentos de unión al antígeno de estos, que pueden utilizarse en los métodos de la invención comprenden una región variable de cadena pesada (HCVR) que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 y 308, o una secuencia sustancialmente similar a estas con al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia.

De acuerdo con determinadas modalidades, los anticuerpos anti-IL-33, o fragmentos de unión al antígeno de estos, para su uso en los métodos de la invención comprenden una región variable de cadena ligera (LCVR) que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298 y 316, o una secuencia sustancialmente similar a estas con al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia.

De acuerdo con determinadas modalidades, los anticuerpos

anti-IL-33, o fragmentos de unión al antígeno de estos, para su uso en los métodos de la invención comprenden un par de secuencias de HCVR y LCVR (HCVR/LCVR) que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 5 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298 y 308/316.

De acuerdo con determinadas modalidades, los anticuerpos anti-IL-33, o fragmentos de unión al antígeno de estos, para su uso en los métodos de la invención comprenden un dominio de CDR3 de cadena pesada (HCDR3) que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296 y 314, o una secuencia 15 sustancialmente similar de esta con al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia; y un dominio de CDR3 de cadena ligera (LCDR3) con una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 20 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304 y 322, o una secuencia sustancialmente similar a estas con al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia.

De acuerdo con determinadas modalidades, los anticuerpos anti

IL-33, o fragmentos de unión al antígeno de estos, para su uso en los métodos de la invención comprenden un par de secuencias de aminoácidos de HCDR3/LCDR3 que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 8/16, 24/32, 40/48, 5 56/64, 72/80, 88/96, 104/112, 120/128, 136/144, 152/160, 168/176, 184/192, 200/208, 216/224, 232/240, 248/256, 264/272, 280/288, 296/304 y 314/322.

De acuerdo con determinadas modalidades, los anticuerpos anti-IL-33, o fragmentos de unión al antígeno de estos, para 10 su uso en los métodos de la invención comprenden además un dominio de cadena pesada de CDR1 (HCDR1) que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292 y 310, 15 o una secuencia sustancialmente similar de esta con al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia; un dominio de CDR2 de cadena pesada (HCDR2) con una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 20 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294 y 312, o una secuencia sustancialmente similar de esta con al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia; un dominio de CDR1 de cadena ligera (LCDR1) con una secuencia de aminoácidos que se

selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300 y 318, o una secuencia sustancialmente similar de esta con al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 5 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia; y un dominio de CDR2 de cadena ligera (LCDR2) con una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302 y 320, o una secuencia 10 sustancialmente similar a estas con al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia.

Determinados ejemplos no taxativos de anticuerpos anti-IL-33 y fragmentos de unión al antígeno que pueden utilizarse en 15 los métodos de la invención comprenden los dominios HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, respectivamente, con las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: las SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16 (por ejemplo, H1M9559N); 20-22-24-28-30-32 (por ejemplo, H1M9566N); 36-38- 20 40-44-46-48 (por ejemplo, H1M9568N); 52-54-56-60-62-64 (por ejemplo, H4H9629P); 68-70-72-76-78-80 (por ejemplo, H4H9633P); 84-86-88-92-94-96 (por ejemplo, H4H9640P); 100-102-104-108-110-112 (por ejemplo, H4H9659P); 116-118-120-124-126-128 (por ejemplo, H4H9660P); 132-134-136-140-142-144 (por

ejemplo, H4H9662P); 148-150-152-156-158-160 (por ejemplo, H4H9663P); 164-166-168-172-174-176 (por ejemplo, H4H9664P); 180-182-184-188-190-192 (por ejemplo, H4H9665P); 196-198-200-204-206-208 (por ejemplo, H4H9666P); 212-214-216-220-222-224
 5 (por ejemplo, H4H9667P); 228-230-232-236-238-240 (por ejemplo, H4H9670P); 244-246-248-252-254-256 (por ejemplo, H4H9671P); 260-262-264-268-270-272 (por ejemplo, H4H9672P); 276-278-280-284-286-288 (por ejemplo, H4H9675P); 292-294-296-300-302-304 (por ejemplo, H4H9676P); y 310-312-314-318-320-
 10 322 (H1M9565N).

De acuerdo con determinadas modalidades, los anticuerpos anti-IL-33 o fragmentos de unión al antígeno de estos para su uso en los métodos de la invención, por ejemplo, para tratar afecciones inflamatorias, comprenden los dominios de CDR de
 15 cadena pesada y ligera contenidos en las secuencias de región variable de cadena pesada y ligera (HCVR/LCVR) que se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234,
 20 242/250, 258/266, 274/282, 290/298 y 308/316. Los métodos y técnicas para identificar las CDR dentro de las secuencias de aminoácidos HCVR y LCVR son conocidos en la técnica y se pueden usar para identificar las CDR dentro de las secuencias de aminoácidos HCVR y/o LCVR determinadas, descritas en la

presente. Los ejemplos de convenciones que se pueden utilizar para identificar los límites de las CDR incluyen, por ejemplo, la definición de Kabat, la definición de Chothia y la definición de AbM. En términos generales, la definición de Kabat se basa en la variabilidad de secuencia, la definición de Chothia se basa en la ubicación de las regiones de bucle estructural y la definición de AbM es un acuerdo entre los enfoques de Kabat y de Chothia. Véase, por ejemplo, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et ál., *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); y Martin et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989). También hay bases de datos públicas disponibles para identificar las secuencias de CDR dentro de un anticuerpo.

En una modalidad, el anticuerpo de IL-33 o fragmento de unión al antígeno para su uso en los métodos de la invención comprende las CDR de cadena pesada y ligera de un par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR de las SEQ ID NO: 274/282.

En una modalidad relacionada, el anticuerpo de IL-33 o fragmento de unión al antígeno para su uso en los métodos de la invención comprende los dominios HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, respectivamente, de las SEQ ID NO: 276-278-280-

284-286-288.

En una modalidad, el anticuerpo que se une específicamente a interleucina-33 (IL-33) humana o fragmento de unión al antígeno para su uso en los métodos de la invención
5 comprende: (a) una región variable de cadena pesada (HCVR) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 274; y (b) una región variable de cadena ligera (LCVR) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:282.

En una modalidad, el anticuerpo de IL-33 o fragmento de unión
10 al antígeno para su uso en los métodos de la invención comprende el par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR de: las SEQ ID NO: 274/282.

En una modalidad, el anticuerpo de IL-33 o fragmento de unión al antígeno para su uso en los métodos de la invención
15 interactúa con una secuencia de aminoácidos que oscila entre alrededor de la posición 1 y alrededor de la posición 12 de la SEQ ID NO: 349 y/o con una secuencia de aminoácidos que oscila entre alrededor de la posición 50 y alrededor de la posición 94 de la SEQ ID NO: 349 según se determina mediante
20 intercambio de hidrógeno/deuterio.

En una modalidad, el anticuerpo de IL-33 o fragmento de unión al antígeno para su uso en los métodos de la invención interactúa con una secuencia de aminoácidos que oscila entre alrededor de la posición 112 y alrededor de la posición 123

de la SEQ ID NO: 348 y/o con una secuencia de aminoácidos que oscila entre alrededor de la posición 161 y alrededor de la posición 205 de la SEQ ID NO: 348 según se determina mediante intercambio de hidrógeno/deuterio.

5 En una modalidad, el anticuerpo de IL-33 o fragmento de unión al antígeno de este para su uso en los métodos de la invención interactúa ya sea con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 350 o con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 351, o interactúa con ambas SEQ ID NO: 350 y 351
10 se determina mediante intercambio de hidrógeno/deuterio.

En una modalidad, el anticuerpo de IL-33 o fragmento de unión al antígeno de este para su uso en los métodos de la invención compete para unirse a IL-33 con un anticuerpo de referencia que comprende el par de secuencias de aminoácidos
15 de HCVR/LCVR de las SEQ ID NO: 274/282.

En una modalidad, el anticuerpo de IL-33 o fragmento de unión al antígeno de este para su uso en los métodos de la invención se une al mismo epítipo en IL-33 que un anticuerpo de referencia que comprende el par de secuencias de
20 aminoácidos de HCVR/LCVR de las SEQ ID NO: 274/282.

En un quinto aspecto, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos anti-IL-33 o fragmentos de unión al antígeno que se utilizarán en los métodos de la invención. Los vectores de expresión

recombinante que portan los ácidos nucleicos de la invención, y las células hospedadoras en las que se han introducido dichos vectores, también están incluidos en la invención, así como los métodos para producir los anticuerpos mediante el cultivo de las células hospedadoras en condiciones que permiten la producción de los anticuerpos y la recuperación de los anticuerpos producidos.

En una modalidad, la invención proporciona métodos para utilizar un anticuerpo o fragmento de este que se une específicamente a IL-33 humana que comprende una HCVR codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 17, 33, 49, 65, 81, 97, 113, 129, 145, 161, 177, 193, 209, 225, 241, 257, 273, 289 y 307, o una secuencia sustancialmente idéntica con una homología de al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 %.

La presente invención presente métodos para utilizar un anticuerpo o fragmento de este que se une específicamente a IL-33 humana que comprende una LCVR codificada por una secuencia de ácido nucleico que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9, 25, 41, 57, 73, 89, 105, 121, 137, 153, 169, 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281, 297 y 315, o una secuencia sustancialmente idéntica con una homología de al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 %.

La presente invención presente métodos para utilizar un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se une específicamente a IL-33 humana que comprende un dominio de HCVR3 codificado por una secuencia de nucleótidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 23, 39, 55, 71, 87, 103, 119, 135, 151, 167, 183, 199, 215, 231, 247, 263, 279, 295 y 313, o una secuencia sustancialmente idéntica con una homología de al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 %; y un dominio de LCDR3 codificado por una secuencia de nucleótidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 15, 31, 47, 63, 79, 95, 111, 127, 143, 159, 175, 191, 207, 223, 239, 255, 271, 287, 303 y 321, o una secuencia sustancialmente idéntica con una homología de al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 %.

La presente invención presente métodos para utilizar un anticuerpo o fragmento de este que se une específicamente a IL-33 humana que comprende además un dominio de HCDR1 codificado por una secuencia de nucleótidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, 19, 35, 51, 67, 83, 99, 115, 131, 147, 163, 179, 195, 211, 227, 243, 259, 275, 291 y 309, o una secuencia sustancialmente idéntica con una homología de al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 %; un dominio de HCDR2 codificado por una

secuencia de nucleótidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5, 21, 37, 53, 69, 85, 101, 117, 133, 149, 165, 181, 197, 213, 229, 245, 261, 277, 293 y 311, o una secuencia sustancialmente idéntica con una homología de al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 %; un domino de LCDR1 codificado por una secuencia de nucleótidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 11, 27, 43, 59, 75, 91, 107, 123, 139, 155, 171, 187, 203, 219, 235, 251, 267, 283, 299 y 317, o una secuencia sustancialmente idéntica con una homología de al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 %; y un domino de LCDR2 codificado por una secuencia de nucleótidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 13, 29, 45, 61, 77, 93, 109, 125, 141, 157, 173, 189, 205, 221, 237, 253, 269, 285, 301 y 319, o una secuencia sustancialmente idéntica con una homología de al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 %.

De acuerdo con determinadas modalidades, los métodos de la invención proporcionan el uso de un anticuerpo o fragmento de este que se une específicamente a IL-33 humana, que comprende las secuencias de CDR de cadena pesada y ligera codificadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 y 9 (por ejemplo, H1M9559N), 17 y 25 (por ejemplo, H1M9566N), 33 y 41 (por ejemplo, H1M9568N), 49 y 57 (por ejemplo,

H4H9629P), 65 y 73 (por ejemplo, H4H9633P), 81 y 89 (por ejemplo, H4H9640P), 97 y 105 (por ejemplo, H4H9659P), 113 y 121 (por ejemplo, H4H9660P), 129 y 137 (por ejemplo, H4H9662P), 145 y 153 (por ejemplo, H4H9663P), 161 y 169 (por ejemplo, H4H9664P), 177 y 185 (por ejemplo, H4H9665P), 193 y 201 (por ejemplo, H4H9666P), 209 y 217 (por ejemplo, H4H9667P), 225 y 233 (por ejemplo, H4H9670P), 241 y 249 (por ejemplo, H4H9671P), 257 y 265 (por ejemplo, H4H9672P), 273 y 281 (por ejemplo, H4H9675P), 289 y 297 (por ejemplo, H4H9676P), o 307 y 315 (H1M9565N).

En una modalidad, el antagonista de IL-33 para su uso en los métodos de la invención es una trampa basada en el receptor de IL-33, tal como las que se describen en la presente (véase la Figura 1).

En una modalidad, la trampa basada en el receptor de IL-33 comprende un primer dominio de unión a IL-33 (D1) unido a un dominio de multimerización (M), donde D1 comprende una parte de unión a IL-33 de una proteína ST2.

En una modalidad, la trampa de IL-33 para su uso en los métodos de la invención comprende además un segundo dominio de unión a IL-33 (D2) unido a D1 y/o M, donde D2 comprende una parte extracelular de una proteína IL-1RAcP. En una modalidad, D1 está unido al extremo N de M. En una modalidad, D1 está unido al extremo C de M. En una modalidad, D2 está

unido al extremo N de M. En una modalidad, D2 está unido al extremo C de M. En una modalidad, D1 está unido al extremo N de D2, y donde D2 está unido al extremo N de M.

En una modalidad, D1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 328 o 329, o una secuencia de aminoácidos con al menos 90 % de identidad con esta. En una modalidad, D2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 330 o 331, o una secuencia de aminoácidos con al menos 90 % de identidad con esta.

En una modalidad, el antagonista de IL-33 para su uso en los métodos de la invención comprende un primer dominio de unión a IL-33 (D1) unido a un primer dominio de multimerización (M1) y un segundo dominio de unión a IL-33 (D2) unido a un segundo dominio de multimerización (M2), donde los dominios D1 y/o D2 comprenden una parte de unión a IL-33 de un receptor que se selecciona del grupo que consiste en ST2 e IL-1RAcP.

En una modalidad, el antagonista de IL-33 para su uso en los métodos de la invención comprende un tercer dominio de unión a IL-33 (D3), que está unido ya sea a D1 o M1, y donde D3 comprende una parte de unión a IL-33 de un receptor que se selecciona del grupo que consiste en ST2 e IL-1RAcP.

En una modalidad, el antagonista de IL-33 para su uso en los métodos de la invención comprende un cuarto dominio de unión

a IL-33 (D4), que está unido ya sea a D2 o M2, y donde D4 comprende una parte de unión a IL-33 de un receptor que se selecciona del grupo que consiste en ST2 e IL-1RAcP.

En una modalidad, D1 está unido al extremo N de M1 y D2 está
5 unido al extremo N de M2.

En una modalidad, D3 está unido al extremo N de D1.

En una modalidad, D3 está unido al extremo C de M1.

En una modalidad, D4 está unido al extremo N de D2.

En una modalidad, D4 está unido al extremo C de M2.

10 En una modalidad, D3 está unido al extremo N de D1, y D1 está unido al extremo N de M1; y donde D4 está unido al extremo N de D2 y D2 está unido al extremo N de M2.

En una modalidad, D3 es idéntico o básicamente idéntico a D4 y donde D1 es idéntico o básicamente idéntico a D2.

15 En una modalidad, cada uno de D3 y D4 comprende una parte de unión a IL-33 de una proteína ST2; y donde cada uno de D1 y D2 comprende una parte extracelular de una proteína IL-1RAcP.

En una modalidad, la trampa de IL-33 para su uso en los métodos de la invención comprende una secuencia de
20 aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 323, 324, 325, 326 y 327.

En una modalidad, el antagonista de IL-4 para su uso en los métodos de la invención es un antagonista del receptor de interleucina-4 (IL-4R).

En una modalidad, el antagonista de IL-4R para su uso en los métodos de la invención es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se une a IL-4R α y previene la interacción de IL-4 y/o IL-13 con un receptor de IL-4 del tipo 1 o tipo 2.

En una modalidad, el anticuerpo de IL-4R o fragmento de unión al antígeno de este para su uso en los métodos de la invención previene la interacción de IL-4 y/o IL-13 tanto con los receptores de IL-4 de tipo 1 como los de tipo 2.

En una modalidad, el antagonista de IL-4R para su uso en los métodos de la invención es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente con IL-4R α humana.

En una modalidad, el anticuerpo monoclonal que se une específicamente a IL-4R α para su uso en los métodos de la invención es dupilumab o un bioequivalente de este.

En una modalidad determinada, el anticuerpo de IL-4R o fragmento de unión al antígeno de este para su uso en los métodos de la invención comprende las regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada (HCDR) de una región variable de cadena pesada (HCVR) de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:335 o la SEQ ID NO: 337 y las regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera (LCDR) de una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:336

o la SEQ ID NO: 338.

En una modalidad relacionada, el anticuerpo de IL-4R o fragmento de unión al antígeno de este para su uso en los métodos de la invención comprende tres HCDR (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) y tres LCDR (LCDR1, LCDR2 y LCDR3), donde la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 339, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:340; la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:341; la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:342; la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:343; y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:344.

En una modalidad, el anticuerpo de IL-4R o fragmento de unión al antígeno de este para su uso en los métodos de la invención comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 335 o la SEQ ID NO: 337, y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 336 o la SEQ ID NO: 338.

En una modalidad, el anticuerpo de IL-4R o fragmento de unión al antígeno de este para su uso en los métodos de la invención comprende un par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR de las SEQ ID NO: 335/336 o las SEQ ID NO: 337/338.

En una modalidad relacionada, el antagonista de IL-4R para su uso en los métodos de la invención es dupilumab (SEQ ID NO:

337/338) o un bioequivalente de este.

En determinadas modalidades, el antagonista de IL-33 y el antagonista de IL-4R se administran en formulaciones separadas.

- 5 En determinadas modalidades, el antagonista de IL-33 y el antagonista de IL-4R se coformulan para su administración a un paciente que lo necesita.

En determinadas modalidades, el antagonista de IL-33 y el antagonista de IL-4R se administran al sujeto por vía
10 subcutánea, intravenosa, intramuscular o intranasal.

Los anticuerpos de IL-33 e IL-4R de la invención pueden ser de longitud completa (por ejemplo, un anticuerpo IgG1 o IgG4) o pueden comprender solamente una parte de unión al antígeno (por ejemplo, un fragmento Fab, F(ab')₂ o scFv), y se pueden
15 modificar para afectar la funcionalidad, por ejemplo, para eliminar las funciones efectoras residuales (Reddy et ál., 2000, J. Immunol. 164:1925-1933).

En una modalidad, los anticuerpos que se unen específicamente a interleucina-33 humana o IL-4R humana son anticuerpos
20 monoclonales aislados completamente humanos.

En un sexto aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humano recombinante o fragmento de este, o una trampa, que se une específicamente a IL-33, o un anticuerpo que se une específicamente a IL-4R y

un portador farmacéuticamente aceptable. En un aspecto relacionado, la invención presenta una composición que es una combinación de un anticuerpo anti-IL-33 o una trampa de IL-33, o un anticuerpo que se une específicamente a IL-4R y uno o más agentes terapéuticos adicionales. En una modalidad, los agentes terapéuticos son cualquier agente que se combine de manera ventajosa con cualquiera o ambos del antagonista de IL-33 y/o el antagonista de IL-4R. Los ejemplos de agentes que pueden combinarse de manera ventajosa con un antagonista de IL-33 y/o un antagonista de IL-4R incluye, de modo no taxativo, otros agentes que inhiban la actividad de IL-33 y/o la actividad de IL-4 (inclusive otros anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos, inhibidores de péptidos, antagonistas de moléculas pequeñas, etc.) y/o agentes que no se unan de manera directa a IL-33, IL-4 o IL-4R, pero que interfieran de otra manera, bloqueen o atenúen la señalización mediada por IL-33 o IL-4. En una modalidad, el o los agentes terapéuticos adicionales se pueden seleccionar del grupo que consiste en un antiinflamatorio no esteroideo (AINE), un corticosteroide (por ejemplo, un corticosteroide inhalado), un broncodilatador, un antihistamínico, epinefrina, un descongestivo, un antagonista de linfopoyetina estromal tímica (TSLP, por sus siglas en inglés), un antagonista de IL-1, un antagonista de IL-8, un

antagonista de IL-13, un antagonista de IL-4 diferente, un antagonista dual de IL-4/IL-13, un antagonista de dual de IL-33/IL-13, un antagonista de IL-5, un antagonista de IL-6, un antagonista de IL-12/23, un antagonista de IL-22, un antagonista de IL-25, un antagonista de IL-17, un antagonista de IL-31, un inhibidor de TNF, un inhibidor de IgE, un inhibidor de leucotrieno, un inhibidor de PDE4 oral, metilxantina, nedocromil sodio, cromolín sodio, un agonista beta 2 de acción prolongada (LABA, por sus siglas en inglés), un agonista muscarínico de acción prolongada (LAMA), un corticosteroide inhalado (ICS) y otro antagonista de IL-33 o IL-4 o un anticuerpo diferente de IL-33, IL-4 o IL-4R y otro antagonista de IL-33.

En determinadas modalidades, el antagonista de citocina puede ser un inhibidor de molécula pequeña (derivada de forma sintética o natural) o una proteína (por ejemplo, un anticuerpo) que interactúa ya sea con la citocina en sí o con un receptor para la citocina, o un complejo que comprende tanto la citocina como sus receptores. Se describen en otras partes de la presente terapias adicionales de combinación y formulaciones conjuntas que implican los anticuerpos anti-IL-33 de la presente invención y/o los anticuerpos de IL-4R. En otro aspecto adicional, la invención proporciona métodos terapéuticos para inhibir la actividad de señalización de IL-

4 y/o IL-33 mediante el uso de un antagonista anti-IL-33 (tal como un anticuerpo de IL-33 o una trampa de IL-33) y un anticuerpo de IL-4R o parte de unión al antígeno de un o más anticuerpos de la invención, donde los métodos terapéuticos
5 comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de IL-33 o una trampa de IL-33, ya sea solo o en combinación con un antagonista de IL-4R o un fragmento de unión al antígeno de uno o más anticuerpos de la invención. El
10 trastorno tratado es cualquier enfermedad o afección que se mejore, alivie, inhiba o prevenga mediante la eliminación, inhibición o reducción de la señalización de IL-33 y/o IL-4. Los antagonistas anti-IL-33 y IL-4R de la invención, cuando se utilizan juntos, pueden servir para bloquear la
15 interacción entre IL-33 y un compañero de unión de IL-33, e IL-4 y un compañero de unión de IL-4 o inhibir de otro modo la actividad de señalización tanto de IL-33 como de IL-4. En una modalidad, el antagonista de IL-4R es un anticuerpo que se une a IL-4R α y al hacer esto previene tanto la
20 señalización de IL-4 como la de IL-13 a través de receptores tanto de tipo I como de tipo II. En una modalidad, el antagonista de IL-4R α es dupilumab o un bioequivalente de este. Dada la actividad de bloqueo dual de dupilumab tanto para IL-4 como para IL-13, se cree que cuando se utiliza en

combinación con los antagonistas de IL-33 de la invención, el régimen de tratamiento combinado dará como resultado una inhibición mejorada de la actividad inflamatoria no deseada que surge como resultado en parte de la señalización a través de las vías de señalización de IL-4, IL-13 e IL-33, que puede ocurrir durante la inflamación.

En una modalidad, el antagonista de IL-33 es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente a IL-33 y bloquea la interacción de IL-33 y su receptor ST2 (también conocido como IL1RL1).

En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente a IL-33 comprende tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) que se encuentran dentro de una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada (HCVR) que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 y 308; y comprende tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera (LCVR) que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298 y 316.

En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al

antígeno que se une específicamente a IL-33 comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114,
 5 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 y 308.

En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se une específicamente a IL-33 comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que
 10 consiste en las SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298 y 316.

En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente a IL-33 comprende:

15 (a) un dominio HCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292 y 310;

(b) un dominio HCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos
 20 que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294 y 312;

(c) un dominio HCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 8,

24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296 y 314;

(d) un dominio LCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO:
 5 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284 y 318;

(e) un dominio LCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO:
 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206,
 10 222, 238, 254, 270, 286 y 320;

(f) un dominio LCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO:
 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288 y 322.

15 En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente a IL-33 comprende un par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: SEQ ID
 NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122,
 20 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298 y 308/316.

La presente invención incluye además el uso de un antagonista de IL-33 solo o en combinación con un antagonista de IL-4R en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un

trastorno o enfermedad relacionada con la actividad o señalización de IL-33 y/o IL-4 o causada por estas en un paciente. En una modalidad, el trastorno o enfermedad relacionada con la actividad de IL-33 y/o la actividad de IL-4, o causada por estas, en un paciente es un trastorno o enfermedad inflamatoria, donde el trastorno o enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en asma (eosinofílica o no eosinofílica), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), síndrome de superposición asma-EPOC (ACOS, por sus siglas en inglés), dermatitis atópica, pólipos nasales, una respuesta alérgica, bronquitis crónica, enfisema, rinosinusitis crónica con o sin pólipos nasales, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, neumonitis por hipersensibilidad, esclerosis múltiple, artritis (inclusive osteoartritis, artritis reumatoide y artritis psoriásica), rinitis alérgica, fibrosis, esofagitis eosinofílica, vasculitis, urticaria, síndrome de Churg Strauss, dolor inflamatorio y psoriasis. La presente invención también incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de IL-33 combinada con una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de IL-4R para su uso en el tratamiento de un trastorno o enfermedad inflamatoria, donde la administración del antagonista de IL-33 en combinación con el antagonista de IL-

4R da como resultado una eficacia terapéutica mejorada en comparación con la observada con la administración del antagonista de IL-33 solo o con el antagonista de IL-4R solo. Cualquiera de los métodos discutidos en la presente también
5 comprende el uso de los antagonistas de IL-33 y/o IL-4R (por ejemplo, anticuerpos) para tratar las enfermedades, trastornos y/o síntomas discutidos en conexión con los métodos.

Otras modalidades serán evidentes luego de revisar la
10 descripción detallada que sigue a continuación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra cuatro ejemplos de disposiciones de los componentes individuales de los antagonistas de IL-33 unos
15 con respecto a los otros. El **Panel A** muestra una disposición en la que un primer dominio de unión a IL-33 (D1) se une al extremo N de un primer dominio de multimerización (M1) y un segundo dominio de unión a IL-33 (D2) se une al extremo N de un segundo dominio de multimerización (M2). D1 se muestra
20 como un recuadro blanco y D2 se muestra como un recuadro negro para indicar que D1 y D2 derivan de distintas proteínas de unión a IL-33. El **Panel B** muestra una disposición en la que un primer dominio de unión a IL-33 (D1) se une al extremo N de un primer dominio de multimerización (M1) y un segundo

dominio de unión a IL-33 (D2) se une al extremo C de un segundo dominio de multimerización (M2). D1 se muestra como un recuadro blanco y D2 se muestra como un recuadro negro para indicar que D1 y D2 derivan de distintas proteínas de unión a IL-33. Los **Paneles C y D** muestran disposiciones que comprenden cuatro dominios de unión a IL-33, D1, D2, D3 y D4. En estas disposiciones, D3-D1-M1 y D4-D2-M2 se unen en tándem, donde D3 se une al extremo N de D1 y D1 se une al extremo N de M1; y D4 se une al extremo N de D2 y D2 se une al extremo N de M2. En el Panel **C**, D3 y D4 son idénticos o básicamente idénticos entre sí y D1 y D2 son idénticos o básicamente idénticos entre sí. En el Panel **D**, D1 y D4 son idénticos o básicamente idénticos entre sí y D3 y D2 son idénticos o básicamente idénticos entre sí.

La Figura 2 muestra que la exposición a HDM induce aumentos similares de eosinófilos activados en los pulmones de ratones de tipo salvaje y humanizados con por triplicado con IL-33, IL-4 e IL-4R α . La significación estadística se determinó mediante ANOVA de dos vías con una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Los siguientes símbolos se utilizaron para indicar diferencias estadísticamente significativas: El asterisco "*" indica comparaciones entre ratones expuestos a solución salina y HDM del mismo genotipo; et "&" indica comparaciones con grupos de ratones de tipo salvaje expuestos

a solución salina o HDM. Los números en aumento de los
 símbolos indican un aumento de la significación: 1x= $p \leq 0.05$;
 2x= $p \leq 0.01$; 3x= $p \leq 0.001$; 4x= $p \leq 0.0001$. Abreviaturas: WT = sigla
 en inglés de tipo salvaje. Todos los ratones tenían
 5 antecedentes mixtos de C57BL/6NTac / 129S6SvEvTac.

La **Figura 3** muestra que la administración combinada de
 REGN3500 y dupilumab bloquea el aumento inducido por la
 exposición a HDM del peso relativo del pulmón. El peso
 relativo del pulmón se expresa como la proporción del peso
 10 húmedo del pulmón (en mg) respecto al peso corporal (en g).
 La significación se determinó mediante ANOVA de una vía de
 Kruskal-Wallis con una prueba post hoc de comparación
 múltiple de Dunn. Los siguientes símbolos se utilizaron para
 indicar diferencias estadísticamente significativas: Los
 15 asteriscos “*” indican comparaciones entre los grupos de
 exposición a HDM por 19 semanas; y los numerales “#” indican
 la comparación de animales expuestos sin tratamiento,
 expuestos a solución salina, con los demás grupos. Los
 números en aumento de los símbolos indican un aumento de la
 20 significación: 1x= $p \leq 0.05$; 2x= $p \leq 0.01$; 3x= $p \leq 0.001$.
 Abreviaturas: wk = semana; IgG4^P = anticuerpo isotipo de
 control, REGN1945.

Las **Figuras 4A y 4B** muestran el efecto de REGN3500 y
 dupilumab, solos y en combinación, sobre la infiltración

eosinofílica pulmonar inducida por la exposición a HDM. La significación se determinó mediante ANOVA de una vía de Kruskal-Wallis con una prueba post hoc de comparación múltiple de Dunn. Los siguientes símbolos se utilizaron para

5 indicar diferencias estadísticamente significativas: Los asteriscos “*” indican comparaciones entre los grupos de exposición a HDM por 19 semanas; los numerales “#” indican la comparación de animales expuestos sin tratamiento, expuestos a solución salina, con los demás grupos; y un signo de más

10 “+” indica la comparación de animales sin tratamiento, expuestos a HDM por 11 semanas con los demás grupos. Los números en aumento de los símbolos indican un aumento de la significación: 1x= $p \leq 0.05$; 2x= $p \leq 0.01$; 3x= $p \leq 0.001$; 4x= $p \leq 0.0001$. Abreviaturas: wk = semana; IgG4^P = anticuerpo

15 isotipo de control, REGN1945.

La **Figura 5** muestra que REGN3500, solo o en combinación con dupilumab, bloquea la infiltración pulmonar de linfocitos T CD4⁺ ST2⁺ inducida por HDM. La significación estadística se determinó mediante ANOVA de una vía con una prueba post hoc

20 de comparaciones múltiples de Tukey. Los siguientes símbolos se utilizaron para indicar diferencias estadísticamente significativas: Los asteriscos “*” indican comparaciones entre los grupos de exposición a HDM por 19 semanas; los numerales “#” indican la comparación de animales expuestos

sin tratamiento, expuestos a solución salina, con los demás grupos; y un signo de más "+" indica la comparación de animales sin tratamiento, expuestos a HDM por 11 semanas con los demás grupos. Los números en aumento de los símbolos indican un aumento de la significación: 1x= $p \leq 0.05$; 2x= $p \leq 0.01$; 3x= $p \leq 0.001$; 4x= $p \leq 0.0001$. Abreviaturas: wk = semana; IgG4^P = anticuerpo isotipo de control, REGN1945.

La **Figura 6** muestra que la administración combinada de REGN3500 y dupilumab bloquea aumentos inducidos por la exposición a HDM de los niveles de proteína en el pulmón MPO, un marcador de infiltración neutrofílica. La significación se determinó mediante ANOVA de una vía de Kruskal-Wallis con una prueba post hoc de comparación múltiple de Dunn. Los siguientes símbolos se utilizaron para indicar diferencias estadísticamente significativas: Los asteriscos "*" indican comparaciones entre los grupos de exposición a HDM por 19 semanas; y los numerales "#" indican la comparación de animales expuestos sin tratamiento, expuestos a solución salina, con los demás grupos. Los números en aumento de los símbolos indican un aumento de la significación: 1x= $p \leq 0.05$; 2x= $p \leq 0.01$; 3x= $p \leq 0.001$. Abreviaturas: wk = semana; IgG4^P = anticuerpo isotipo de control, REGN1945.

Las **Figuras 7A y 7B** muestran el efecto de REGN3500 y dupilumab, solos o en combinación, sobre el aumento inducido

por la exposición a HDM de los niveles de proteína IL-5 e IL-6 en el pulmón. Se extrajeron los pulmones (lóbulos superior y medio del pulmón derecho) y se midieron los niveles de proteína IL-5 (A) e IL-6 (B) mediante inmunoensayo multiplexado. Los niveles de proteína IL-5 e IL-6 en tejido pulmonar se expresan como cantidad de proteína (pg) por lóbulo pulmonar. La significación se determinó mediante ANOVA de una vía de Kruskal-Wallis con una prueba post hoc de comparación múltiple de Dunn. Los siguientes símbolos se utilizaron para indicar diferencias estadísticamente significativas: Los asteriscos "*" indican comparaciones entre los grupos de exposición a HDM por 19 semanas; y los numerales "#" indican la comparación de animales expuestos sin tratamiento, expuestos a solución salina, con los demás grupos. Los números en aumento de los símbolos indican un aumento de la significación: 1x= $p \leq 0.05$; 2x= $p \leq 0.01$; 3x= $p \leq 0.001$. Abreviaturas: wk = semana; IgG4^P = anticuerpo isotipo de control, REGN1945.

La **Figura 8** muestra que REGN3500, solo o en combinación con dupilumab, bloquea el aumento inducida por HDM de los niveles de proteína SAA circulante. Cuatro días después de última inyección de anticuerpo, se extrajo sangre entera mediante punción cardíaca y se aisló el suero. Los niveles de proteína SAA circulante se midieron mediante el uso de un kit de ELISA

disponible en el mercado. Los niveles de proteína SAA circulante se expresan como cantidad de proteína SAA (μg) por mL de suero. La significación se determinó mediante ANOVA de una vía de Kruskal-Wallis con una prueba post hoc de comparación múltiple de Dunn. Los siguientes símbolos se utilizaron para indicar diferencias estadísticamente significativas: Los asteriscos "*" indican comparaciones entre los grupos de exposición a HDM por 19 semanas; y los numerales "#" indican la comparación de animales expuestos sin tratamiento, expuestos a solución salina, con los demás grupos. Los números en aumento de los símbolos indican un aumento de la significación: 1x= $p \leq 0.05$; 2x= $p \leq 0.01$; 3x= $p \leq 0.001$. Abreviaturas: wk = semana; IgG4^P = anticuerpo isotipo de control, REGN1945.

La **Figura 9** muestra que los niveles de proteína IgE circulante aumentan en respuesta a la exposición a HDM. Se recogió sangre entera mediante punción cardíaca y se aisló suero. Los niveles de proteína IgE circulante se midieron mediante el uso de un kit de ELISA disponible en el mercado.

Los niveles de proteína IgE circulante se expresan como cantidad de proteína IgE (μg) por mL de suero. La significación se determinó mediante ANOVA de una vía de Kruskal-Wallis con una prueba post hoc de comparación múltiple de Dunn. Los siguientes símbolos se utilizaron para

indicar diferencias estadísticamente significativas: Los asteriscos "*" indican comparaciones entre los grupos de exposición a HDM por 19 semanas; y los numerales "#" indican la comparación de animales expuestos sin tratamiento, expuestos a solución salina, con los demás grupos. Los números en aumento de los símbolos indican un aumento de la significación: 1x= $p \leq 0.05$; 2x= $p \leq 0.01$; 3x= $p \leq 0.001$. Abreviaturas: wk = semana; IgG4^P = anticuerpo isotipo de control, REGN1945.

10

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Antes de describir la presente invención, se debe entender que esta invención no se limita a los métodos particulares y las condiciones experimentales descritas, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en la presente tiene el fin de describir solamente modalidades particulares y no pretende ser taxativa, dado que el alcance de la presente invención estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Tal como se usa en la presente, la expresión "alrededor de", cuando se

usa en referencia a un valor numérico particular mencionado, significa que el valor puede variar del valor mencionado en no más que 1 %. Por ejemplo, tal como se usa en la presente, la expresión "alrededor de 100" incluye 99 y 101 y todos los
5 valores intermedios (por ejemplo, 99.1, 99.2, 99.3, 99.4, etc.).

Si bien en la práctica o evaluación de la presente invención se puede utilizar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente, a continuación,
10 se describen los métodos y materiales preferidos. Todas las patentes, solicitudes y publicaciones que no son patentes mencionadas en la presente memoria descriptiva se incorporan a la presente mediante referencia en su totalidad.

15 **Definiciones**

Los términos "interleucina-33", "IL-33" y similares, tal como se usan en la presente, se refieren a una proteína IL-33 humana y abarcan IL-33 sin procesar de longitud completa de 270 aminoácidos (véase, por ejemplo, la SEQ ID NO: 348, o el
20 número de acceso UniProtKB 095760), así como cualquier forma de IL-33 que surja del procesamiento en la célula (véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 349, que contiene los residuos de aminoácidos 112-270 de la proteína de longitud completa). Otras formas procesadas de IL-33 se describen en Lefrançois,

et ál., (Lefrançois, et ál., (2012), Proc. Natl. Acad. Sci. 109(5):1693-1678). El término también abarca variantes de origen natural de IL-33, por ejemplo, variantes por corte y empalme (véase, por ejemplo, Hong, et ál., (2011), J. Biol. Chem. 286(22):20078-20086) o variantes alélicas, o cualquier otra isoforma de IL-33, tal como las descritas en WO2016/156440. Todas las referencias a las proteínas, polipéptidos y fragmentos de proteína de la presente pretenden referirse a la versión humana de la proteína, polipéptido o fragmento de proteína respectivos, a menos que se especifique explícitamente que es de una especie no humana.

Tal como se usa en la presente, la expresión "antagonista de IL-33" significa cualquier agente que sea capaz de bloquear, atenuar o interferir de otro modo con la señalización de IL-33 y/o la interacción entre IL-33 y un receptor de la superficie celular (por ejemplo, ST2, también conocido como IL1RL1) o un correceptor (por ejemplo, IL1-RAcP) o un complejo de estos. Por ejemplo, un "antagonista de IL-33", también mencionado como un "inhibidor de IL-33", o un "bloqueador de IL-33" incluye cualquiera de los siguientes: (1) un agente que se une o interactúa con IL-33; o (2) un agente que se une o interactúa con el receptor de IL-33 (mencionado a menudo como "supresión de tumorigenicidad" o

"ST2"; también conocido como "IL1RL1"); o (3) un agente que se une o interactúa con el correceptor de IL-33 (proteína accesoria del receptor de interleucina-1 o IL1-RAcP); o (4) un agente que se une con un complejo de IL-33/ST2; o (5) un agente que se une o interactúa con ST2/IL-1RAcP. Cualquiera de los anteriores puede dar como resultado la inhibición o atenuación de al menos una actividad biológica de IL-33, tal como, de modo no taxativo, la función de señalización biológica que se produce ante la unión de IL-33 con su complejo correceptor/receptor.

En una modalidad, un "antagonista de IL-33" es un anticuerpo que se une específicamente o interactúa con IL-33 y previene la unión de IL-33 con ST2 y, al hacer esto, previene la interacción de ST2 con el correceptor IL-1RAcP. En una modalidad, un "antagonista de IL-33" es un anticuerpo que se une específicamente ya sea con ST2 o con el complejo de ST2/IL-1RAcP y previene la unión de IL-33 con ST2, o con el complejo de receptor ST2/IL1-RAcP. En una modalidad, un "antagonista de IL-33" es un anticuerpo que se une al complejo de IL-33/ST2 y entonces previene la interacción de ST2 con el correceptor IL-1RAcP. En una modalidad, un "antagonista de IL-33" es un anticuerpo que se une a IL-33 y puede permitir la unión de baja afinidad con ST2, pero, al mismo tiempo, dicha unión de baja afinidad puede prevenir la

subsiguiente interacción de ST2 con el correceptor IL-1RAcP.

Un "antagonista de IL-33" también puede ser un agente, tal como un receptor de ST2 soluble o una trampa basada en el receptor de IL-33, tal como los que se describen en US2014/0271642. Cualquier agente que bloquee la señalización mediada por IL-33 se considera un "antagonista de IL-33". El "antagonista de IL-33" puede ser una molécula orgánica pequeña, una proteína, tal como un anticuerpo o fragmento de este, o una trampa basada en el receptor de IL-33 soluble (tal como se describe en la presente) o un ácido nucleico, tal como una molécula antisentido o un ARNip. Tal como se usa en la presente, "un anticuerpo que se une a IL-33" o un "anticuerpo de IL-33" incluye anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen a una proteína IL-33 humana o un fragmento biológicamente activo de esta (por ejemplo, véanse las SEQ ID NO: 348, 349, 350 y 351).

La expresión "receptor de interleucina-4" o "IL-4R", tal como se usa en la presente, se refiere a un receptor de IL-4R α humana que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 347.

Tal como se usa en la presente, un "antagonista de IL-4R (también mencionado en la presente como un "inhibidor de IL-4R" o un "antagonista de IL-4R α ", un "bloqueador de IL-4R", un "bloqueador de IL-4R α ", etc.) es cualquier agente que se

una o interactúe con IL-4R α o un ligando de IL-4R e inhiba o atenúe la función de señalización biológica normal de un receptor de IL-4 de tipo 1 y/o tipo 2. Un receptor de IL-4 de tipo 1 es un receptor dimérico que comprende una cadena de IL-4R α y una cadena de γ c. Un receptor de IL-4 de tipo 2 es un receptor dimérico que comprende una cadena de IL-4R α y una cadena de IL-13R α 1. Los receptores de IL-4 de tipo 1 interactúan con IL-4 y son estimulados por esta, mientras que los receptores de IL-4 de tipo 2 interactúan tanto con IL-4 como con IL-13 y son estimulados por estas. Por lo tanto, los antagonistas de IL-4R que pueden utilizarse en los métodos de la presente invención pueden funcionar al bloquear la señalización mediada por IL-4, señalización mediada por IL-13 o tanto la señalización mediada por IL-4 como por IL-13. Los antagonistas de IL-4R de la presente invención pueden, por lo tanto, prevenir la interacción de IL-4 y/o IL-13 con un receptor de tipo 1 o de tipo 2. Los ejemplos no taxativos de categorías de antagonistas de IL-4R incluyen inhibidores de IL-4R de molécula pequeña, aptámeros anti-IL-4R, inhibidores de IL-4R basados en péptidos (por ejemplo, moléculas de "peptidocuerpo"), "cuerpos receptores" (por ejemplo, moléculas modificadas genéticamente que comprenden un dominio de unión a ligandos de un componente de IL-4R) y anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos

que se unen específicamente con IL-4R α humana. Tal como se usa en la presente, los antagonistas de IL-4R también incluye proteínas de unión al antígeno que se unen específicamente con IL-4 y/o IL-13.

5 El término "anticuerpo", tal como se usa en la presente, significa cualquier molécula de unión al antígeno o complejo molecular que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) que se une específicamente a un antígeno en particular o interactúa con este (por ejemplo, 10 IL-33 o IL-4R). El término "anticuerpo" incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro, así como multímeros de estas (por ejemplo, IgM). Cada cadena pesada 15 comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como HCVR o V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios: C_H1, C_H2 y C_H3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente 20 como LCVR o V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio (C_L1). Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están

más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En distintas
5 modalidades de la invención, las FR del anticuerpo anti-IL-33 (o de la parte de unión al antígeno de este) o el anticuerpo anti-IL-4R pueden ser iguales a las secuencias de líneas germinales humanas o pueden ser modificadas de forma natural o artificial. Es posible definir una secuencia de consenso
10 de aminoácidos en función de un análisis comparativo de dos o más CDR.

El término "anticuerpo", tal como se usa en la presente, también incluye fragmentos de unión al antígeno de moléculas de anticuerpo completas. Las expresiones "porción de unión
15 al antígeno" de un anticuerpo, "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo y similares, tal como se usan en la presente, incluyen cualquier glicoproteína o polipéptido de origen natural, que puede ser obtenido enzimáticamente, sintético o genéticamente modificado que se une
20 específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los fragmentos de unión al antígeno de un anticuerpo pueden derivar, por ejemplo, de moléculas de anticuerpo completas mediante cualquier técnica estándar adecuada tal como digestión proteolítica o técnicas de modificación genética

recombinante que implican la manipulación y la expresión de ADN que codifica dominios variables y opcionalmente constantes de anticuerpos. Tal ADN es conocido y/o se encuentra fácilmente disponible en, por ejemplo, fuentes
5 comerciales, bibliotecas de ADN (que incluyen, por ejemplo, bibliotecas de anticuerpos-fagos), o puede ser sintetizado. Es posible secuenciar y manipular el ADN químicamente o mediante técnicas de biología molecular, por ejemplo, para ordenar uno o más dominios variables y/o constantes en una
10 configuración adecuada, o para introducir codones, crear residuos de cisteína, modificar, agregar o eliminar aminoácidos, etc.

Ejemplos no taxativos de fragmentos de unión al antígeno incluyen: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos F(ab')₂; (iii)
15 fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas de Fv de cadena simple (scFv); (vi) fragmentos dAb y (vii) unidades de reconocimiento mínimas que consisten en residuos aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (por ejemplo, una región determinante de complementariedad (CDR)
20 tal como un péptido CDR3), o un péptido FR3-CDR3-FR4 limitado. Otras moléculas modificadas, tales como los anticuerpos de dominio específico, anticuerpos de dominio único, anticuerpos de dominios eliminados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos injertados en CDR, diacuerpos,

triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, nanocuerpos (por ejemplo, nanocuerpos monovalentes, nanocuerpos bivalentes, etc.), componentes inmunofarmacéuticos de módulo pequeño (SMIP) y dominios IgNAR variables de tiburón también están
5 comprendidas por la expresión "fragmento de unión al antígeno" tal como se usa en la presente.

Normalmente, un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo comprenderá al menos un dominio variable. El dominio variable puede tener cualquier tamaño o composición
10 de aminoácidos y, por lo general, comprende al menos una CDR adyacente a una o más secuencias de marco o enmarcada por ellas. En fragmentos de unión al antígeno con un dominio V_H asociado con un dominio V_L , los dominios V_H y V_L pueden ubicarse uno respecto a otro en cualquier disposición
15 adecuada. Por ejemplo, la región variable puede ser dimérica y contener los dímeros V_H-V_H , V_H-V_L o V_L-V_L . De manera alternativa, el fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo puede contener un dominio monomérico V_H o V_L .

En determinadas modalidades, un fragmento de unión al
20 antígeno de un anticuerpo puede contener al menos un dominio variable enlazado en forma covalente a al menos un dominio constante. Ejemplos no taxativos de configuraciones de dominios variables y constantes que pueden ser encontradas en un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de la

presente invención incluyen: (i) V_H-C_{H1} ; (ii) V_H-C_{H2} ; (iii) V_H-C_{H3} ; (iv) $V_H-C_{H1}-C_{H2}$; (v) $V_H-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$; (vi) $V_H-C_{H2}-C_{H3}$; (vii) V_H-C_L ; (viii) V_L-C_{H1} ; (ix) V_L-C_{H2} ; (x) V_L-C_{H3} ; (xi) $V_L-C_{H1}-C_{H2}$; (xii) $V_L-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$; (xiii) $V_L-C_{H2}-C_{H3}$; y (xiv) V_L-C_L .

5 En cualquier configuración de dominios variables y constantes que incluyen cualquiera de las configuraciones de ejemplo mencionadas anteriormente, los dominios constantes y variables pueden enlazarse directamente entre sí o pueden enlazarse mediante una región enlazadora o bisagra parcial.

10 Una región bisagra puede consistir en al menos 2 (por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 40, 60 o más) aminoácidos, lo que produce un enlace flexible o semiflexible entre dominios variables y/o constantes adyacentes en una única molécula de polipéptido. Además, un fragmento de unión al antígeno de un

15 anticuerpo de la presente invención puede comprender un homodímero o un heterodímero (u otro multímero) de cualquiera de las configuraciones de dominio variable y constante mencionadas anteriormente en asociación no covalente con otro y/o con uno o más dominios V_H o V_L monoméricos (por ejemplo,

20 mediante enlace o enlaces disulfuro).

Tal como con moléculas de anticuerpo completas, los fragmentos de unión al antígeno pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos). Normalmente, un fragmento de unión al antígeno multiespecífico de un

anticuerpo comprende al menos dos dominios variables diferentes, donde cada dominio variable es capaz de unirse específicamente a un antígeno independiente o a un epítipo diferente del mismo antígeno. Cualquier formato de anticuerpo multiespecífico, que incluye los ejemplos de formatos de anticuerpo biespecíficos descritos en la presente, puede adaptarse para utilizarse en el contexto de un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de la presente invención mediante técnicas de rutina disponibles en la técnica. Por ejemplo, la presente invención incluye métodos que comprenden el uso de anticuerpos biespecíficos, donde una extremidad de una inmunoglobulina es específica para IL-4R α humana o fragmento de esta, o una inmunoglobulina específica para IL-33 o un fragmento de esta, y la otra extremidad de la inmunoglobulina es específica para un segundo objetivo terapéutico o está conjugado a un resto terapéutico. Los ejemplos de formatos biespecíficos que pueden utilizarse en el contexto de la presente invención incluyen, de forma no taxativa, por ejemplo, formatos basados en scFv o biespecíficos de diacuerpo, fusiones IgG-scFv, dominio variable dual (DVD)-Ig, Quadroma, botones en ojales, cadena ligera común (por ejemplo, cadenas ligeras comunes con botones en ojales, etc.), CrossMab, CrossFab, (SEED)body, cremallera de leucina, Duobody, IgG1/IgG2, Fab de actuación

dual (DAF) -IgG y formatos biespecíficos de Mab² (véase, por ejemplo, Klein et ál. 2012, mAbs 4:6, 1-11, y referencias citadas en estos, para una reseña de los formatos anteriores). Los anticuerpos biespecíficos también pueden
5 construirse utilizando una conjugación de péptidos/ácidos nucleicos, por ejemplo, donde se usan aminoácidos no naturales con reactividad química ortogonal para generar conjugados de anticuerpos-oligonucleótidos específicos del sitio que luego se autoensamblan en complejos multiméricos
10 con una composición, valencia y geometría definida. (Véase, por ejemplo, Kazane et ál., *J. Am. Chem. Soc.* [Epub: 4 de diciembre de 2012]).

En determinadas modalidades de la invención, los anticuerpos anti-IL-33 e IL-4R de la invención son anticuerpos humanos.
15 La expresión "anticuerpo humano", tal como se usa en la presente, pretende incluir anticuerpos con regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos aminoácidos no codificados
20 por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR y, en particular, en CDR3. Sin embargo, tal como se usa a continuación, la

expresión "anticuerpo humano" no pretende incluir anticuerpos en los que se injertaron en secuencias FR humanas las secuencias de CDR derivadas de líneas germinales de otra especie de mamífero, tal como un ratón. La expresión incluye
5 anticuerpos producidos de forma recombinante en un mamífero no humano o en células de un mamífero no humano. La expresión no pretende incluir anticuerpos aislados de un sujeto humano o generados en este.

Los anticuerpos de la invención pueden, en algunas
10 modalidades, ser anticuerpos humanos recombinantes. La expresión "anticuerpo humano recombinante", tal como se usa en la presente, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan a través de medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados
15 mediante el uso de un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedadora (se describe más adelante), anticuerpos aislados de una genoteca de anticuerpos humanos recombinantes combinada (se describe más adelante), anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un
20 ratón) transgénico para genes de inmunoglobulina humana (ver, por ejemplo, Taylor et ál. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados a través de cualquier otro medio que involucra el empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana en

otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes presentan regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Sin embargo, en determinadas modalidades, tales anticuerpos humanos recombinantes pueden ser sometidos a mutagénesis *in vitro* (o mutagénesis somática *in vivo* cuando se utiliza un animal transgénico para secuencias Ig humanas) y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivan de las secuencias V_H y V_L de la línea germinal humana y se relacionan con ella, pueden no existir naturalmente dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpo humano *in vivo*.

Los anticuerpos humanos pueden existir en dos formas que se asocian con la heterogeneidad de la bisagra. En una forma, una molécula de inmunoglobulina comprende una construcción estable de cuatro cadenas de aproximadamente 150-160 kDa en la cual los dímeros se mantienen unidos mediante un enlace disulfuro de cadena pesada entre las cadenas. En una segunda forma, los dímeros no se enlazan mediante enlaces disulfuro entre las cadenas y se forma una molécula de alrededor de 75-80 kDa compuesta por una cadena pesada y ligera acoplada de forma covalente (medio anticuerpo). Ha sido extremadamente difícil la separación de estas formas, incluso luego de la

purificación por afinidad.

La frecuencia de aparición de la segunda forma en diversos isotipos de IgG intactos se debe, de modo no taxativo, a diferencias estructurales asociadas con el isotipo de región bisagra del anticuerpo. Una única sustitución de aminoácido en la región bisagra de la bisagra de IgG4 humana puede reducir significativamente la aparición de la segunda forma (Angal et ál. (1993) Molecular Immunology 30:105) hasta niveles que comúnmente se observan con la bisagra de IgG1 humana. La presente invención abarca anticuerpos que poseen una o más mutaciones en la región bisagra, C_H2 o C_H3 que puede ser deseable, por ejemplo, en la producción, para mejorar el rendimiento de la forma de anticuerpo deseada.

Los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos aislados. Tal como se usa en la presente, un "anticuerpo aislado" significa un anticuerpo que se ha identificado y separado, y/o recuperado, de al menos un componente de su entorno natural. Por ejemplo, un anticuerpo que se separó o eliminó de al menos un componente de un organismo, o de un tejido o célula en la que existe naturalmente o se produce de forma natural, es un "anticuerpo aislado" a fines de la presente invención. Un anticuerpo aislado también incluye un anticuerpo *in situ* dentro de una célula recombinante. Los anticuerpos aislados son anticuerpos que se sometieron a al

menos una etapa de aislación o purificación. De acuerdo con determinadas modalidades, un anticuerpo aislado puede carecer sustancialmente de otro material celular y/o químicos.

La presente invención incluye anticuerpos anti-IL-33 y anticuerpos de IL-4R neutralizantes y/o bloqueadores. Un anticuerpo "neutralizante" o "bloqueador", tal como se usa en la presente, se pretende que se refiera a un anticuerpo cuya unión a la molécula objetivo, ya sea IL-33 o IL-4R: (i) interfiera con la interacción entre la molécula objetivo y ya sea su receptor (en el caso de anticuerpos de IL-33) o su ligando (en el caso de anticuerpos de IL-4R); y/o (ii) de como resultado la inhibición de al menos una función biológica de la molécula objetivo, por ejemplo, señalización. La inhibición provocada por un anticuerpo de bloqueador o neutralizante de IL-33 o IL-4R no precisa ser completa, siempre y cuando sea detectable mediante el uso de un ensayo adecuado.

Los anticuerpos descritos en la presente pueden comprender una o más sustituciones, inserciones y/o eliminaciones de aminoácidos en las regiones marco y/o CDR de los dominios variables de cadena ligera y pesada, en comparación con las secuencias de líneas germinales correspondientes de las cuales se derivaron los anticuerpos. Tales mutaciones pueden ser determinadas fácilmente al comparar las secuencias de

aminoácidos divulgadas en la presente con secuencias de líneas germinales disponibles, por ejemplo, en bases de datos públicas de secuencias de anticuerpos. La presente invención incluye anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de
5 ellos que derivan de cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en la presente y en las que uno o más aminoácidos en una o más regiones marco y/o regiones CDR se transforman en el o los residuos correspondientes de la secuencia de línea germinal de la que deriva el anticuerpo, o
10 en el o los residuos correspondientes de otra secuencia de línea germinal humana, o en una sustitución conservativa de aminoácido del o de los residuos de línea germinal correspondientes (en la presente se hace referencia a tales cambios en la secuencia como "mutaciones en la línea
15 germinal"). Un experto en la técnica puede producir gran cantidad de anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno que comprenden una o más mutaciones individuales de línea germinal particular o combinaciones de ellas a partir de las secuencias de región variable de cadena ligera y pesada que
20 se divulgan en la presente. En determinadas modalidades, todos los residuos de CDR y/o de marco comprendidos en los dominios V_H y/o V_L vuelven a mutar en los residuos encontrados en la secuencia de línea germinal original a partir de la cual se derivó el anticuerpo. En otras modalidades, solo

determinados residuos vuelven a mutar en la secuencia de línea germinal original, por ejemplo, solo los residuos que experimentaron mutación que se encuentran entre los primeros 8 aminoácidos de FR1 o entre los últimos 8 aminoácidos de FR4, o únicamente los residuos que experimentaron mutación que se encuentran dentro de CDR1, CDR2 o CDR3. En otras modalidades, uno o más de los residuos de CDR y/o de marco se transforman en el o los residuos correspondientes de una secuencia de línea germinal diferente (es decir, una secuencia de línea germinal que difiere de la secuencia de línea germinal de la que se derivó originalmente el anticuerpo). Además, los anticuerpos de la presente invención puede contener cualquier combinación de dos o más mutaciones de línea germinal en las regiones marco y/o CDR, por ejemplo, donde determinados residuos individuales se transforman en el residuo correspondiente de una secuencia de línea germinal particular, mientras que otros residuos determinados que difieren de la secuencia de línea germinal original se mantienen o se transforman en el residuo correspondiente de una secuencia de línea germinal diferente. Una vez que se obtienen, los anticuerpos y los fragmentos de unión al antígeno que contienen una o más mutaciones de línea germinal pueden ser analizados fácilmente para determinar la presencia de una o más propiedades deseadas tales como mejor

especificidad de unión, mayor afinidad de unión, mejores propiedades biológicas antagonistas o agonísticas (según sea el caso), reducción de inmunogenicidad, etc. La presente invención comprende los anticuerpos y los fragmentos de unión
5 al antígeno obtenidos en esta forma general.

La presente invención también incluye anticuerpos que comprenden variantes de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR descritas en la presente con una o más sustituciones conservativas. Por ejemplo, la
10 presente invención incluye anticuerpos con secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR con, por ejemplo, 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o menos, etc. sustituciones conservativas de aminoácidos respecto a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR descritas en
15 la presente.

El término "epítopo" se refiere a un determinante antigénico que interactúa con un sitio de unión al antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocida como parátopo. Un único antígeno puede tener más de un
20 epítopo. Por lo tanto, diferentes anticuerpos pueden unirse a diferentes áreas en un antígeno y pueden tener diferentes efectos biológicos. Los epítopos pueden ser conformacionales o lineales. Un epítopo conformacional se produce mediante yuxtaposición espacial de aminoácidos de distintos segmentos

de la cadena de polipéptidos lineal. Un epítipo lineal es uno que se produce mediante residuos de aminoácidos adyacentes en una cadena de polipéptidos. En determinadas circunstancias, un epítipo puede incluir restos de sacáridos, grupos fosforilo o grupos sulfonilo en el antígeno.

Cuando hacen referencia a un ácido nucleico o a un fragmento de este, las expresiones "identidad sustancial" o "sustancialmente idéntico" indican que, cuando se alinea de forma óptima con inserciones o eliminaciones adecuadas de nucleótidos con otro ácido nucleico (o su cadena complementaria), hay una identidad de secuencia de nucleótidos en al menos alrededor de 95 %, y más preferentemente al menos alrededor de 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de las bases de nucleótidos, tal como se mide mediante cualquier algoritmo conocido de identidad de secuencia, tal como FASTA, BLAST o Gap, tal como se mencionó anteriormente. Una molécula de ácido nucleico con identidad sustancial respecto a una molécula de ácido nucleico de referencia puede, en determinadas circunstancias, codificar un polipéptido con la misma secuencia de aminoácidos o una secuencia sustancialmente similar que la del polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de referencia. Tal como se utiliza con respecto a polipéptidos, las expresiones "similitud sustancial" o "sustancialmente

similar" significan dos secuencias de péptidos que, cuando se alinean en forma óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT con pesos de huecos por defecto, comparten al menos 95 % de identidad de secuencia, incluso más preferentemente al menos 98 % o 99 % de identidad de secuencia. Preferentemente, las posiciones de residuos que no son idénticas difieren en las sustituciones de aminoácidos conservadoras. Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es una en la que el residuo aminoácido se sustituye con otro residuo aminoácido que presenta una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución conservadora de aminoácidos no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en los que dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí en sustituciones conservadoras, el porcentaje o grado de similitud de identidad de secuencia se puede ajustar hacia arriba para corregirse en vista de la naturaleza conservadora de la sustitución. Los expertos en la técnica conocen los medios para realizar este ajuste. Véase, por ejemplo, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307:-331, que se incorpora a la presente mediante esta referencia. Los ejemplos de grupos aminoácidos que presentan cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen (1)

cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; (2) cadenas laterales hidroxialifáticas: serina y treonina; (3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; (4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; (5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; (6) cadenas laterales ácidas: aspartato y glutamato y (7) cadenas laterales que contienen azufre: cisteína y metionina. Los grupos de sustitución conservadora de aminoácidos que se prefieren son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina. De manera alternativa, un reemplazo conservador es cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz PAM250 de probabilidad logarítmica que se describe en Gonnet et ál. (1992) Science 256: 1443:-1445, que se incorpora a la presente mediante esta referencia. Un reemplazo "moderadamente conservador" es cualquier cambio con un valor no negativo en la matriz PAM250 de probabilidad logarítmica.

La similitud de secuencia de los polipéptidos, que también se denomina identidad de secuencia, típicamente se mide mediante el uso de software de análisis de secuencias. El software de análisis de proteínas empareja secuencias similares utilizando medidas de similitud asignadas a diversas

sustituciones, eliminaciones y otras modificaciones que incluyen sustituciones conservadoras de aminoácidos. Por ejemplo, el software GCG contiene programas tales como Gap y Bestfit, que pueden utilizarse con parámetros por defecto para determinar la homología de secuencia o identidad de secuencia de polipéptidos estrechamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos, o de una proteína de tipo salvaje y una mutante de ella. Ver, por ejemplo, GCG Versión 6.1. Las secuencias de polipéptidos también pueden compararse mediante el uso de FASTA, un programa en GCG versión 6.1, con parámetros por defecto o recomendados. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineación y porcentaje de identidad de secuencia de las regiones con mejor solapamiento entre la secuencia investigada y la secuencia que se busca (Pearson (2000) supra). Otro algoritmo preferido al comparar una secuencia de la invención con una base de datos que contiene una gran cantidad de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, especialmente BLASTP o TBLASTN, con parámetros por defecto. Véase, por ejemplo, Altschul et ál. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 y Altschul et ál. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402, que se incorporan a la presente mediante esta referencia.

Un "trastorno o enfermedad", tal como se usa en la presente,

es cualquier afección que pueda tratarse con los antagonistas de IL-33 e IL-4 de la invención. Un "trastorno o enfermedad inflamatoria", tal como se usa en la presente, se refiere a una enfermedad, trastorno o afección patológica en la cual la patología surja, en su totalidad o en parte, de, por ejemplo, un cambio en la cantidad, cambio en la tasa de migración o cambio en la activación de células del sistema inmunitario. Las células del sistema inmunitario incluyen, por ejemplo, linfocitos T, linfocitos B, monocitos o macrófagos, células linfoides innatas, células presentadoras de antígenos (APC, por sus siglas en inglés), células dendríticas, microglías, células NK, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos o cualquier otra célula que se asocie específicamente con la inmunología, por ejemplo, células epiteliales o endoteliales que producen citocina. Tal como se usa en la presente, en una modalidad, el "trastorno o en una modalidad inflamatoria" es un trastorno o afección inflamatoria que se selecciona del grupo que consiste en asma (inclusive asma resistente a esteroides), asma sensible a esteroides, asma eosinofílica y asma no eosinofílica), alergia, anafilaxis, esclerosis múltiple, trastorno intestinal inflamatorio (por ejemplo, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC, que puede o no estar relacionado, causado en parte o surgir de la exposición a humo de cigarro

directo o indirecto), síndrome de superposición de asma y EPOC (ACOS), esofagitis eosinofílica, bronquitis crónica, enfisema, rinosinusitis crónica con o sin pólipos nasales, lupus, dermatitis atópica, psoriasis, escleroderma y otras enfermedades fibróticas, síndrome de sjogren, vasculitis (enfermedad de behcet, arteritis de células gigantes, púrpura de Henoch-Schonlein y síndrome de Curg Strauss), dolor inflamatorio y artritis. En una modalidad, la artritis se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, osteoartritis y artritis psoriásica.

En una modalidad, el "trastorno o enfermedad inflamatoria" es un trastorno o afección inflamatoria que comprende una respuesta de tipo 1 y/o una respuesta de tipo 2.

Una "respuesta inmunitaria de tipo 1" está definida por linfocitos T auxiliares 1 (T_H1) y linfocitos T_H17 , linfocitos T citotóxicos, células linfoides innatas (ILC, por sus siglas en inglés) del grupo 1 y del grupo 3 e inmunoglobulina M (IgM), IgA y clases de anticuerpo IgG específicas y citocinas, inclusive, por ejemplo, TNF, IL- 1β e IL-6. Esta respuesta efectora media la inmunidad a muchos microorganismos, inclusive bacterias, virus, hongos y protozoarios. Los elementos de inmunidad del tipo 1 también ayudan a mantener la vigilancia inmunitaria contra tumores.

Una "respuesta inmunitaria de tipo 2" se caracteriza por

linfocitos T auxiliares 2 CD4+ (T_H2), células linfoides innatas (ILC) del grupo 2, eosinófilos, basófilos, mastocitos, macrófagos activados por IL-4 y/o IL-13, la subclase de anticuerpo IgE y citocinas, inclusive, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, linfopoyetina estromal tímica, IL-25 e IL-33. La inmunidad del tipo 2 proporciona protección contra parásitos extracelulares grandes al potenciar las defensas de barreras. Los elementos de la respuesta inmunitaria del tipo 2 también ayudan a mantener la homeostasis metabólica y a promover la remodelación de tejidos después de una lesión. Este tipo de respuesta también puede iniciarse en respuesta a alérgenos.

La expresión "inhibe o atenúa la señalización mediada por IL-33", tal como se usa en la presente, se refiere al grado al cual IL-33 estimula la transducción de señal a través de su receptor, ST2 y el correceptor, IL-1RAcP, que disminuye en presencia de un antagonista, tal como un anticuerpo de IL-33, o una trampa de IL-33, tal como se usa en la presente, en relación con el grado al cual IL-33 estimula la transducción de señal a través de ST2 e IL-1RAcP en ausencia del antagonista, tal como un anticuerpo de IL-33 o trampa de IL-33, tal como se describe en la presente. La expresión "inhibe o atenúa la señalización mediada por IL-4R", tal como se usa en la presente, se refiere al grado al cual IL-4 estimula la

transducción de señal a través de un receptor de IL-4 de tipo 1 y/o tipo 2, que disminuye en presencia de un antagonista, tal como un anticuerpo de IL-4 o un anticuerpo de IL-4R, tal como se usa en la presente, en relación con el grado al cual IL-4 estimula la transducción de señal a través de un receptor de IL-4 de tipo 1 y/o tipo 2 en ausencia del antagonista, tal como un anticuerpo de IL-4 o IL-4R, tal como se describe en la presente. Para examinar la extensión de la inhibición, se trata una muestra con un inhibidor/antagonista potencial y se compara con una muestra de control sin el inhibidor/antagonista. A las muestras de control, es decir, sin tratar con un antagonista, se les asigna un valor de actividad relativa del 100 %. La inhibición se logra cuando el valor de actividad relativa con respecto al control es de alrededor de 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 %, 60 %, 55 %, 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 % o 20 % o menos. Un criterio de valoración de la inhibición puede comprender una cantidad o porcentaje predeterminado, por ejemplo, de un indicador de inflamación, o desgranulación, secreción o activación celular, tal como la liberación de una citocina. La inhibición de la transducción de señal de IL-33 a través de ST2 e IL-1RAcP puede determinarse mediante un ensayo para la transducción de señal de IL-33 en un ensayo *in vitro*, tal como los conocidos por los expertos en la técnica. Además,

pueden utilizarse ensayos *in vivo* para determinar si una molécula es un antagonista de IL-33. Por ejemplo, puede utilizarse un ensayo *in vivo* para evaluar el efecto de un anticuerpo de IL-33 sobre la inflamación pulmonar en animales
5 sensibles a alérgenos que sean homocigotos para la expresión de IL-33 humana. Luego de la sensibilización de los animales con el alérgeno, un subconjunto de los animales se trató ya sea con animal anti-IL-33 de la invención o un animal de control de isotipo negativo. Posteriormente, los animales se
10 sacrifican y se extraen los pulmones para evaluar los infiltrados celulares, así como mediciones de citocina (IL-4 e IL-5). Un anticuerpo de IL-33 que sea eficaz como antagonista debería presentar una tendencia hacia la reducción de células inflamatorias en el pulmón, así como una
15 tendencia hacia la reducción de citocinas, tales como IL-4 e IL-5. Pueden realizarse ensayos similares para evaluar la capacidad de un antagonista de IL-4R de bloquear la transducción de señal después de la unión de IL-4 a un receptor de tipo 1 y/o un receptor de tipo 2 *in vitro* o *in*
20 *vivo*. Además, cualquiera de los ensayos mencionados anteriormente puede modificarse para comparar los efectos de utilizar un antagonista de IL-33 solo, un antagonista de IL-4 o IL-4R solo o el efecto de utilizar tanto el antagonista de IL-33 como el antagonista de IL-4 o IL-4R en conjunto.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para reducir la incidencia o recurrencia de asma o EPOC, o una exacerbación de asma o EPOC, en un sujeto que lo necesita que lo necesite administrarle una composición farmacéutica que comprende un antagonista del receptor de interleucina-4 (IL-4R) al sujeto en combinación con una composición farmacéutica que comprende un antagonista de IL-33. Tal como se usa en la presente, la expresión "exacerbación de asma o EPOC" significa un aumento de la gravedad, frecuencia y/o duración de uno o más síntomas o indicios de asma o EPOC. Una "exacerbación de asma o EPOC" también incluye cualquier deterioro de la salud respiratoria de un sujeto que requiere y/o se puede tratar mediante una intervención terapéutica para el asma o EPOC (tal como, tratamiento con esteroides, tratamiento con corticosteroides inhalados, hospitalización, etc.).

Una "reducción de la incidencia o recurrencia" de una exacerbación de asma o EPOC significa que un sujeto que ha recibido composiciones farmacéuticas de la presente invención experimenta menos exacerbaciones de asma o EPOC (es decir, al menos una exacerbación menos) después del tratamiento que antes del tratamiento, o no experimenta ninguna exacerbación de asma o EPOC durante al menos 4 semanas (por ejemplo 4, 6, 8, 12, 14 o más semanas) después de iniciar el tratamiento

con una composición farmacéutica de la presente invención. Una "reducción en la incidencia o recurrencia" de una exacerbación de asma o EPOC significa, de manera alternativa, que, después de la administración de una composición farmacéutica de la presente invención, la probabilidad de que un sujeto experimente una exacerbación de asma o EPOC disminuye al menos 10 % (por ejemplo, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 % o más) en comparación con un sujeto que no recibió una composición farmacéutica de la presente invención.

Un "trastorno o enfermedad fibrótica", tal como se usa en la presente, se refiere a afecciones que implican un exceso de tejido conjuntivo fibroso en un tejido u órgano. "Fibrosis" se refiere a un proceso patológico, que incluye la formación de cicatriz y sobreproducción de matriz extracelular por el tejido conjuntivo en respuesta al daño de tejidos. Tal como se usa en la presente, los ejemplos de "trastornos o enfermedades fibróticas" que pueden tratarse mediante la administración del antagonista anti-IL-33 y de IL-4R de la invención incluyen fibrosis pulmonar (por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, fibrosis pulmonar inducida por asbestos y síndrome de bronquiolitis obliterante), asma crónica, fibrosis asociada a lesiones pulmonares agudas y síndrome de

dificultad respiratoria aguda (por ejemplo, fibrosis inducida por neumonía bacteriana, fibrosis inducida por traumatismo, fibrosis inducida por neumonía viral, fibrosis inducida por ventilador, fibrosis inducida por sepsis no pulmonar y
5 fibrosis inducida por aspiración), silicosis, fibrosis inducida por radiación, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC, que puede estar o no relacionada, causada en parte o surgir de la exposición directa o indirecta al humo de cigarro), escleroderma, fibrosis ocular, fibrosis de la
10 piel (por ejemplo, escleroderma), fibrosis hepática (por ejemplo, cirrosis, fibrosis hepática inducida por alcohol, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), lesión del ducto biliar, cirrosis biliar primaria, fibrosis hepática inducida por infección o virus, hepatitis autoinmunitaria, fibrosis de
15 riñón (renal), fibrosis cardíaca, aterosclerosis, restenosis del stent y mielofibrosis. Si bien se el asma y EPOC se consideran afecciones inflamatorias, también se conoce que cada uno presenta propiedades de trastornos fibróticos.

Una "respuesta" de un paciente o la "capacidad de respuesta"
20 de un paciente al tratamiento o terapia, por ejemplo, tratamiento que comprende un antagonista de IL-33 (por ejemplo, un antagonista de unión de ST2 o IL-33) o un antagonista de IL-4, se refiere a el beneficio clínico terapéutico proporcionado a un paciente que tenga riesgo de

desarrollar o que ya tenga un trastorno mediado por IL-33 (por ejemplo, asma, EPOC, ACOS, pólipos nasales o fibrosis pulmonar, por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática) a partir del tratamiento o como resultado de este. Dicho beneficio

5 puede incluir respuestas celulares o biológicas, una respuesta completa, una respuesta parcial, una enfermedad estable (sin evolución ni recidiva), o una respuesta con una recidiva posterior del paciente a partir del tratamiento con el antagonista o como resultado de este. Un experto en la

10 técnica rápidamente estará en posición de determinar si un paciente está respondiendo. Por ejemplo, un paciente que padece asma que responde a un tratamiento que comprende un antagonista de IL-33 y/o un antagonista de IL-4 puede presentar una reducción observable y/o mensurable o la

15 ausencia de uno o más de los siguientes ejemplos de síntomas: silbido en el pecho, tos, problemas para respirar, opresión del pecho, síntomas que se producen o empeoran a la noche, síntomas que se activan por aire frío, ejercicio o exposición a alérgenos.

20 Además, una "eficacia terapéutica mejorada" puede determinarse mediante la evaluación de si el tratamiento con la combinación de un antagonista de IL-33 más un antagonista de IL-4R da como resultado una mejora considerable de al menos un síntoma del trastorno o enfermedad, o una mejora de al

menos uno de los parámetros biológicos, según se mide en la presente (por ejemplo, inflamación pulmonar, liberación de citocina, etc.) cuando se compara con los resultados obtenidos cuando el antagonista de IL-33 o el antagonista de IL-4R se utiliza solo. Cualquiera de las mediciones biológicas de eficacia, tal como se describe en la presente solicitud, puede utilizarse para determinar la eficacia terapéutica o mejora de esta.

Antagonistas de IL-33 y antagonistas de IL-4R

Los métodos de la presente invención comprenden administrarle a un paciente que padece un trastorno o enfermedad inflamatoria una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de IL-33 en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de IL-4R.

15

Antagonistas de IL-33

La expresión "interleucina-33 humana", "IL-33 humana", "hIL-33" o "IL-33" se refiere a IL-33 sin procesar de longitud completa de 270 aminoácidos (véase, por ejemplo, la SEQ ID NO: 348, o el número de acceso UniProtKB O95760), o un fragmento biológicamente activo de esta, así como cualquier forma de IL-33 que surja del procesamiento en la célula (véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 349, que contiene los residuos de aminoácidos 112-270 de la proteína de longitud

completa). El término también abarca variantes de origen natural de IL-33, por ejemplo, variantes por corte y empalme (véase, por ejemplo, Hong, et ál., (2011), J. Biol. Chem. 286(22):20078-20086) o variantes alélicas, o cualquier otra
5 isoforma de IL-33, tal como las formas oxidadas o reducidas de IL-33 descritas en WO2016/156440. La actividad de IL-33 que puede neutralizarse, inhibirse, bloquearse, impedirse, atenuarse, reducirse o interferirse mediante un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este de la inhibir, o
10 mediante una trampa de IL-33 de la invención, incluye, de modo no taxativo, inhibición de la señalización mediada por el receptor de IL-33 o inhibición de la inflamación mediada por IL-33.

Tal como se usa en la presente, un "antagonista de IL-33"
15 (también mencionado en la presente como un "inhibidor de IL-33" o un "bloqueador de IL-33", etc.) es cualquier agente que inhiba la interacción de IL-33 con uno o más de sus compañeros de unión y al hacer esto pueda inhibir la señalización mediada por IL-33. Por ejemplo, un "antagonista
20 de IL-33" puede unirse y/o interactuar con IL-33, con el receptor de IL-33 mencionado como "supresión de la tumorigenicidad" ("ST2"), con el correceptor de IL-33, mencionado como "proteína accesoria del receptor de interleucina-1" ("IL-1RAcP") o con un complejo de cualquiera

de las siguientes: IL-33/ST2 o ST2/IL-1RAcP y, al hacer esto, puede inhibir la señalización mediada por IL-33.

Los ejemplos no taxativos de las categorías de antagonistas de IL-33 incluyen inhibidores de IL-33 de molécula pequeña, antagonistas del receptor, ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones rigurosas con secuencias de ácido nucleico que codifican ya sea IL-33 o un receptor o correceptor de IL-33 (por ejemplo, ARN interferente pequeño (ARNip) o ARN de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (CRISPR-ARN o ARNcr); inclusive ARN guía simple (ARNgs) con una secuencia de ARNcr o ARNtracr, tal como se describe en Mali et ál. (Science. 339: 823-26, 2013), que se incorpora en su totalidad a la presente mediante referencia). Otros antagonistas de IL-33 incluyen proteínas que comprenden una parte de unión al ligando de un receptor de IL-33 (por ejemplo, ST2), moléculas de la estructura de unión a IL-33 (por ejemplo, DARPins, proteínas de repetición HEAT, proteínas de repetición ARM, proteínas de repetición de tetratricopéptido, construcciones de estructura basada en fibronectina y otras proteínas de repetición de origen natural, etc., [véase, por ejemplo, Boersma y Pluckthun, 2011, *Curr. Opin. Biotechnol.* 22:849-857, y las referencias citadas en este]), y aptámeros anti-IL-33 o partes de estos.

Anticuerpos de IL-33

De acuerdo con determinadas modalidades, los antagonistas o inhibidores de IL-33 que pueden utilizarse en el contexto de la presente invención son anticuerpos anti-IL-33 o fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos que se unen específicamente a IL-33 humana. Los identificadores de secuencia de aminoácidos para los ejemplos de anticuerpos anti-IL-33 para su uso en los métodos descritos en la presente se muestran en la Tabla 1 y los identificadores de secuencia de ácido nucleico que codifican estos anticuerpos de IL-33 se muestran en la Tabla 2.

En una modalidad, los anticuerpos anti-IL-33 descritos en la presente para su uso en los métodos de la invención se describen en US9,453,072, que se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad.

De acuerdo con determinadas modalidades, los anticuerpos anti-IL-33 utilizados en los métodos de la presente invención se unen específicamente a IL-33. La expresión "se une específicamente", o similares, significa que un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este forma un complejo con un antígeno que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. Son conocidos en la técnica métodos para determinar si dos un anticuerpo se une específicamente con un antígeno, e incluyen, por ejemplo, diálisis de equilibrio, resonancia de plasmones superficiales y similares. Por

ejemplo, un anticuerpo que "se une específicamente" a IL-33, tal como se usa en el contexto de la presente invención, incluye anticuerpos que se unen a IL-33 o una parte biológicamente activa de esta, con una K_D menor que alrededor de 1000 nM, menor que alrededor de 500 nM, menor que alrededor de 300 nM, menor que alrededor de 200 nM, menor que alrededor de 100 nM, menor que alrededor de 90 nM, menor que alrededor de 80 nM, menor que alrededor de 70 nM, menor que alrededor de 60 nM, menor que alrededor de 50 nM, menor que alrededor de 40 nM, menor que alrededor de 30 nM, menor que alrededor de 20 nM, menor que alrededor de 10 nM, menor que alrededor de 5 nM, menor que alrededor de 4 nM, menor que alrededor de 3 nM, menor que alrededor de 2 nM, menor que alrededor de 1 nM o menor que alrededor de 0.5 nM, según se mide en un ensayo de resonancia de plasmones superficiales. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a IL-33 humana puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con respecto a otros antígenos, tales como moléculas de IL-IL-33 de otras especies (no humanas).

De acuerdo con determinados ejemplos de modalidades de la presente invención, el antagonista de IL-33 es un anticuerpo anti-IL-33, o fragmento de unión al antígeno de este que comprende una región variable de cadena pesada (HCVR), región variable de cadena ligera (LCVR) y/o regiones determinantes

de la complementariedad (CDR) que comprenden cualquiera de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos anti-IL-33, tal como se establece en la patente estadounidense n.º 9,453,072 y en la Tabla 1 descrita en la presente. En

5 determinadas modalidades, el antagonista de IL-33 es un anticuerpo anti-IL-33 que tiene características de unión del anticuerpo de referencia descrito en US9,453,072. En determinados ejemplos de modalidades, el anticuerpo anti-IL-33 o fragmento de unión al antígeno de este que puede

10 utilizarse en el contexto de los métodos de la invención comprende las regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada (HCDR) de una región variable de cadena pesada (HCVR) de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 274 y las regiones determinantes de la complementariedad de

15 cadena ligera (LCDR) de una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 282. De acuerdo con determinadas modalidades, el anticuerpo de IL-33 o fragmento de unión al antígeno de este comprende tres HCDR (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) y tres LCDR

20 (LCDR1, LCDR2 y LCDR3), donde la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 276; la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 278; la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 280; la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:

284; la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 286; y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 288. En todavía otras modalidades, el anticuerpo anti-IL-33 o fragmento de unión al antígeno de este comprende
5 una HCVR que comprende la SEQ ID NO: 274 y una LCVR que comprende la SEQ ID NO: 282.

En una modalidad, el antagonista de IL-33 es un anticuerpo de IL-33 mencionado como REGN3500, que comprende una HCVR que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 274 y una
10 LCVR que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 282, y regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada (HCDR1-HCDR2-HCDR3) que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 276-278-280, respectivamente, y regiones determinantes de la
15 complementariedad de cadena ligera (LCDR1-LCDR2-LCDR3) que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 284-286-288, respectivamente.

Otros anticuerpos anti-IL-33 y fragmentos de unión al antígeno de estos que pueden utilizarse en los métodos
20 descritos en la presente se describen en EP1725261, US8187596, WO2011031600, WO2015099175, WO2015106080 (ANB020), US2016/0168242, WO2016/077381, WO2016/077366 o WO2016/156440, donde cada una de las cuales se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad.

Trampas de IL-33

De acuerdo con determinadas modalidades, los antagonistas o inhibidores de IL-33 que pueden utilizarse en el contexto de la presente invención son trampas de IL-33 basadas en receptor, tales como las descritas en la presente.

Las trampas de IL-33 descritas en la presente comprenden al menos un dominio de unión a IL-33, que comprende una parte de unión a IL-33 de una proteína receptora de IL-33, denominada ST2. En determinadas modalidades, una trampa de IL-33 comprende además una parte extracelular de un receptor de IL-33, denominada proteína accesoria del receptor de IL-1, o IL-1RAcP. La trampa de IL-33 también puede contener al menos un componente de multimerización que funciones para conectar los diversos componentes de la trampa entre sí. Los diversos componentes de las trampas de IL-33 se describen más adelante y en la Figura 1.

En una modalidad, las trampas de IL-33 descritas en la presente para su uso en los métodos de la invención se describen en US2014/0271642 y WO2014/152195, que se incorporan a la presente mediante esta referencia en su totalidad.

A grandes rasgos, las trampas de IL-33 comprenden un primer dominio de unión a IL-33 (D1) unido a un dominio de

multimerización (M). En determinadas modalidades, los antagonistas de IL-33 de la invención comprenden un segundo dominio de unión a IL-33 (D2) unido a D1 y/o M. De acuerdo con determinadas modalidades, D1 comprende una parte de unión a IL-33 de una proteína ST2. De acuerdo con determinadas modalidades, D2 comprende una parte extracelular de una proteína IL-1RAcP.

Los componentes individuales de las trampas de IL-33 se pueden disponer unos con respecto a los otros de diversas maneras que dan como resultado moléculas antagonistas funcionales que pueden unirse a IL-33. Por ejemplo, D1 y/o D2 se pueden unir al extremo N de M. En otras modalidades, D1 y/o D2 se unen al extremo C de M. En aun otras modalidades, D1 se une al extremo N de D2, y D2 se une al extremo N de M, lo que da como resultado una fusión en línea, del extremo N a C, de una molécula antagonista representada por la fórmula D1-D2-M. En otra parte de la presente en la Figura 1 se describen otras orientaciones de los componentes individuales.

Los ejemplos no taxativos de las trampas de IL-33 para su uso en los métodos de la invención se muestran en las Tablas 3a y 3b e incluyen las trampas de IL-33 denominadas "hST2-hFc," "hST2-mFc," "hST2-hIL1RAcP-mFc," "hST2-hIL1RAcP-hFc" y "mST2-mIL1RAcP-mFc". Estas corresponden a las SEQ ID NO:

323, 324, 325, 326 y 327, respectivamente. La presente invención incluye trampas basadas en el receptor de IL-33 que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a cualquiera de los ejemplos de trampas basadas en el receptor de IL-33 establecidos en la presente (por ejemplo, las SEQ ID NO: 323, 324, 325, 326 y 327).

Las técnicas biológicas moleculares estándar (por ejemplo, tecnología de ADN recombinante) se pueden utilizar para construir cualquiera de las trampas de IL-33 de la invención o variantes de estas.

Las trampas de IL-33 para su uso en los métodos de la presente invención comprenden al menos un dominio de unión a IL-33 (denominado algunas veces en la presente mediante la denominación "D" o "D1", "D2", etc.). En determinadas modalidades, el dominio de unión a IL-33 comprende una parte de unión a IL-33 de una proteína ST2. Una parte de unión a IL-33 de una proteína ST2 puede comprender o consistir en la totalidad o una parte del dominio extracelular de una proteína ST2. En determinadas modalidades, una proteína ST2 es una proteína ST2 humana. Una "proteína ST2 humana", tal como se usa en la presente, se refiere a una proteína ST2 tal como se muestra en la secuencia de aminoácidos 1-556 del número de acceso NP_057316.3, que también se muestra en la

SEQ ID NO: 352. En determinadas modalidades, la proteína ST2 es una proteína ST2 de una especie no humana (por ejemplo, ST2 de ratón, ST2 de mono, etc.). Un ejemplo de parte de unión a IL-33 de una proteína ST2 se establece en la presente

5 como la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 328 (correspondiente al dominio extracelular de ST2 humana [K19-S328 del n.º de acceso de NCBI NP_057316.3]). Otros ejemplos de una parte de unión a IL-33 de una proteína ST2 se establece en la presente como la secuencia de aminoácidos de

10 la SEQ ID NO:329 (correspondiente al dominio extracelular de ST2 de ratón [S27-R332 del n.º de acceso de NCBI P14719]).

En determinadas modalidades, el dominio de unión a IL-33 comprende una parte extracelular de una proteína IL-1RAcP. En determinadas modalidades, una proteína IL-1RAcP es una

15 proteína IL-1RAcP humana. Una "proteína IL-1RAcP humana", como se usa en la presente, se refiere a una proteína IL-1RAcP que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:353. En determinadas modalidades, la proteína IL-1RAcP es una proteína IL-1RAcP de una especie no humana (por ejemplo,

20 IL-1RAcP de ratón, IL-1RAcP de mono, etc.). Un ejemplo de una parte extracelular de una proteína IL-1RAcP se establece en la presente como la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:330 (que corresponde al dominio extracelular de IL-1RAcP humana [S21-E359 de NCBI, N.º de acceso Q9NPH3]). Otro

ejemplo de una parte extracelular de una proteína IL-1RAcP se establece en la presente como la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:331 (que corresponde al dominio extracelular de IL-1RAcP de ratón [S21-E359 de NCBI, N.º de acceso Q61730]).

5 La presente invención incluye trampas de IL-33 que comprenden componentes de D1 y/o D2 que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a cualquiera de los ejemplos de secuencias de aminoácidos de componentes
10 del dominio de unión a IL-33 que se establecen en la presente (por ejemplo, las SEQ ID NO: 328, 329, 330 y 331).

Los antagonistas de IL-33 de la presente invención también comprenden al menos un dominio de multimerización (denominado algunas veces en la presente mediante la abreviatura "M",
15 "M1", "M2", etc.). En términos generales, el o los dominios de multimerización de la presente invención funcionan para conectar los varios componentes de los antagonistas de IL-33 (por ejemplo, el o los dominios de unión a IL-33) entre sí. Como se usa en la presente, un "dominio de multimerización"
20 es cualquier macromolécula que tenga la capacidad de asociarse (covalente o no covalentemente) con una segunda macromolécula de la misma estructura o constitución o una similar. Por ejemplo, un dominio de multimerización puede ser un polipéptido que comprende un dominio C_{H3} de

inmunoglobulina. Un ejemplo no taxativo de un dominio de multimerización es una parte Fc de una inmunoglobulina, por ejemplo, un dominio Fc de una IgG seleccionada de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, así como cualquier alotipo
5 dentro de cada grupo de isotipo.

Los ejemplos no taxativos de dominios de multimerización que se pueden utilizar en los antagonistas de IL-33 de la presente invención incluyen Fc de IgG1 humana (SEQ ID NO:332) o Fc de IgG2a de ratón (SEQ ID NO:333). La presente
10 invención incluye antagonistas de IL-33 que comprenden componentes de M con una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a cualquiera de los ejemplos de secuencias de aminoácidos de componentes de M que se
15 establecen en la presente (por ejemplo, SEQ ID NO:332 o 333). En determinadas modalidades, los antagonistas de IL-33 de la presente invención comprenden dos dominios de multimerización, M1 y M2, donde M1 y M2 son idénticos entre sí. Por ejemplo, M1 puede ser un dominio Fc con una
20 secuencia de aminoácidos particular y M2 es un dominio Fc con la misma secuencia de aminoácidos que M1.

Los componentes individuales de los antagonistas de IL-33 de la presente invención (por ejemplo, D1, D2, M, etc.) se pueden disponer unos con respecto a otros de diversas

maneras. Los ejemplos no taxativos de las disposiciones mencionadas anteriormente se ilustran de forma esquemática en la Figura 1.

Los ejemplos ilustrativos no taxativos de trampas de IL-33 para su uso en los métodos de la invención que comprenden dos dominios de multimerización (M1 y M2) y cuatro dominios de unión a IL-33 (D1, D2, D3 y D4) se muestran en la Figura 1, disposiciones C y D).

Los componentes individuales de las trampas de IL-33 de la presente invención (por ejemplo, D1, D2, M1, M2, etc.) se pueden unir entre sí directamente (por ejemplo, D1 y/o D2 se pueden unir directamente a M, etc.); de manera alternativa, los componentes individuales se pueden unir entre sí mediante un componente enlazador (por ejemplo, D1 y/o D2 se pueden unir a M mediante un enlazador orientado entre los componentes individuales; D1 se puede unir a D2 mediante un enlazador; etc.). En cualquiera de las disposiciones descritas en la presente, donde se describe un componente como "unido" a otro componente, la unión puede realizarse mediante un enlazador (incluso si no se designa específicamente de este modo). Como se usa en la presente, un "enlazador" es cualquier molécula que una dos componentes de polipéptido.

Las características biológicas de las trampas de IL-33 para

su uso en los métodos de la invención se describen en US2014/0271642 y en WO2014/152195, que se incorporan a la presente mediante esta referencia en su totalidad.

5 Otros antagonistas de IL-33

Los polipéptidos que se unen a IL-33 y/o su receptor (ST2 y/o IL-1 RAcP) y bloquean la interacción entre ligando y receptor se consideran antagonistas de IL-33 y se describen en WO2014/152195, que se incorpora a la presente mediante esta
10 referencia en su totalidad. Otros agentes que pueden actuar como antagonista de IL-33 y que pueden utilizarse en los métodos de la invención incluyen inmunoadhesinas, peptidocuerpos y ST2 soluble, o derivados de estos; anticuerpos contra el receptor de IL-33 (por ejemplo, anticuerpos contra
15 ST2, por ejemplo, AMG-282 (Amgen) o STLM15 (Janssen) o cualquiera de los anticuerpos contra ST2 descritos en WO2012/113813, WO 2013/173761, WO 2013/165894, US8,444,987 o US7,452,980, que se incorporan a la presente mediante esta referencia en su totalidad. Otros antagonistas de IL-33 para
20 su uso en los métodos de la invención incluyen proteínas ST2-Fc, tales como las descritas en WO2013/173761 o WO 2013/165894, cada una de las cuales se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad.

Antagonistas de IL-4R

Tal como se usa en la presente, un "antagonista de IL-4R (también mencionado en la presente como un "inhibidor de IL-4R" o un "antagonista de IL-4R α ", un "bloqueador de IL-4R", un "bloqueador de IL-4R α ", etc.) es cualquier agente que se una o interactúe con IL-4R α o un ligando de IL-4R e inhiba o atenúe la función de señalización biológica normal de un receptor de IL-4 de tipo 1 y/o tipo 2. La expresión "IL-4R humana" o "hIL-4R", tal como se usa en la presente, se refiere a IL-4R que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 347 o un fragmento biológicamente activo de esta. Un receptor de IL-4 de tipo 1 es un receptor dimérico que comprende una cadena de IL-4R α y una cadena de γ c. Un receptor de IL-4 de tipo 2 es un receptor dimérico que comprende una cadena de IL-4R α y una cadena de IL-13R α 1. Los receptores de IL-4 de tipo 1 interactúan con IL-4 y son estimulados por esta, mientras que los receptores de IL-4 de tipo 2 interactúan tanto con IL-4 como con IL-13 y son estimulados por estas. Por lo tanto, los antagonistas de IL-4R que pueden utilizarse en los métodos de la presente invención pueden funcionar al bloquear la señalización mediada por IL-4, señalización mediada por IL-13 o tanto la señalización mediada por IL-4 como por IL-13. Los antagonistas de IL-4R de la presente invención pueden, por lo

tanto, prevenir la interacción de IL-4 y/o IL-13 con un receptor de tipo 1 o de tipo 2.

Los ejemplos no taxativos de categorías de antagonistas de IL-4R incluyen antagonistas de IL-4R de molécula pequeña, inhibidores basados en ácido nucleico de la expresión o actividad de IL-4R (por ejemplo, ARNip o antisentido), moléculas basadas en péptidos que interactúan específicamente con IL-4R (por ejemplo, peptidocuerpos), "cuerpos receptores" (por ejemplo, moléculas modificadas genéticamente que comprenden un dominio de unión al ligando de un componente de IL-4R), moléculas de estructura de IL-4R (por ejemplo, DARPins, proteínas de repetición HEAT, proteínas de repetición ARM, proteínas de repetición de tetraricopéptido, construcciones de estructura basada en fibronectina y otras estructuras basadas en proteínas de repetición de origen natural, etc., [véase, por ejemplo, Boersma y Pluckthun, 2011, *Curr. Opin. Biotechnol.* 22:849-857, y las referencias citadas en este]), y aptámeros anti-IL-4R o partes de estos. De acuerdo con determinadas modalidades, los antagonistas de IL-4R que pueden utilizarse en el contexto de la presente invención son anticuerpos anti-IL-4R o fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos que se unen específicamente a IL-4R humana.

En una modalidad, el anticuerpo anti-IL-4R que se describe en

la presente para su uso en los métodos de la invención es dupilumab (véanse también las patentes estadounidenses n.º 7,605,237; 7,608,693 y 9,290,574).

5 Anticuerpos anti-IL-4R

De acuerdo con determinadas modalidades ilustrativas de la presente invención, el antagonista de IL-4R es un antagonista anti-IL-4R α o un fragmento de unión al antígeno de este, que se une específicamente a IL-4R α . La expresión "se une específicamente", o similares, significa que un anticuerpo o
10 fragmento de unión al antígeno de este forma un complejo con un antígeno que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. Son conocidos en la técnica métodos para determinar si dos un anticuerpo se une específicamente con un
15 antígeno, e incluyen, por ejemplo, diálisis de equilibrio, resonancia de plasmones superficiales y similares. Por ejemplo, un anticuerpo que "se une específicamente" a IL-4R α , tal como se usa en el contexto de la presente invención, incluye anticuerpos que se unen a IL-4R α o una parte
20 biológicamente activa de esta, con una K_D menor que alrededor de 1000 nM, menor que alrededor de 500 nM, menor que alrededor de 300 nM, menor que alrededor de 200 nM, menor que alrededor de 100 nM, menor que alrededor de 90 nM, menor que alrededor de 80 nM, menor que alrededor de 70 nM, menor que

alrededor de 60 nM, menor que alrededor de 50 nM, menor que
alrededor de 40 nM, menor que alrededor de 30 nM, menor que
alrededor de 20 nM, menor que alrededor de 10 nM, menor que
alrededor de 5 nM, menor que alrededor de 4 nM, menor que
5 alrededor de 3 nM, menor que alrededor de 2 nM, menor que
alrededor de 1 nM o menor que alrededor de 0.5 nM, según se
mide en un ensayo de resonancia de plasmones superficiales.
Un anticuerpo aislado que se une específicamente a IL-4R α
humana puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con
10 respecto a otros antígenos, tales como moléculas de IL-4R α de
otras especies (no humanas).

De acuerdo con determinados ejemplos de modalidades de la
presente invención, el antagonista de IL-4R es un anticuerpo
anti-IL-4R α , o fragmento de unión al antígeno de este que
15 comprende una región variable de cadena pesada (HCVR), región
variable de cadena ligera (LCVR) y/o regiones determinantes
de la complementariedad (CDR) que comprenden cualquiera de
las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos anti-IL-4R,
tal como se establece en las patentes estadounidenses n.º
20 7,605,237 y 7,608,693. En determinadas modalidades, el
antagonista de IL-4R es un anticuerpo anti-IL-4R que tiene
características de unión del anticuerpo de referencia
mencionado en la presente como dupilumab (véanse US7,605,237
y US7,608,693). En determinados ejemplos de modalidades, el

anticuerpo anti-IL-4R α o fragmento de unión al antígeno de este que puede utilizarse en el contexto de los métodos de la invención comprende las regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada (HCDR) de una región variable de cadena pesada (HCVR) de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 337 y las regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera (LCDR) de una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 338. De acuerdo con determinadas modalidades, el anticuerpo de IL-4R α o fragmento de unión al antígeno de este comprende tres HCDR (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) y tres LCDR (LCDR1, LCDR2 y LCDR3), donde la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 339; la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 340; la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 341; la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 342; la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 343; y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 344. En todavía otras modalidades, el anticuerpo anti-IL-4R o fragmento de unión al antígeno de este comprende una HCVR que comprende la SEQ ID NO: 337 y una LCVR que comprende la SEQ ID NO: 338. En todavía otras modalidades, el anticuerpo anti-IL-4R o fragmento de unión al antígeno de este comprende una

HCVR que comprende la SEQ ID NO: 335 y una LCVR que comprende la SEQ ID NO: 336. En aun otras modalidades, el anticuerpo anti-IL-4R o fragmento de unión al antígeno de este comprende una secuencia de aminoácidos cadena pesada (HC, por sus siglas en inglés) tal como se establece en la SEQ ID NO: 345 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera (LC, por sus siglas en inglés) tal como se establece en la SEQ ID NO: 346. De acuerdo con determinados ejemplos de modalidades, los métodos de la presente invención comprenden el uso del anticuerpo anti-IL-4R α mencionado y conocido en la técnica como dupilumab, o un bioequivalente de este. Dupilumab comprende una HCVR que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 337 y una LCVR que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 338, y regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada (HCDR1-HCDR2-HCDR3) que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 339-340-341, respectivamente, y regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera (LCDR1-LCDR2-LCDR3) que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 342-343-344, respectivamente.

Otros anticuerpos anti-IL-4R α que pueden utilizarse en el contexto de los métodos de la presente invención incluyen, por ejemplo, el anticuerpo mencionado y conocido en la técnica como AMG317 (Corren et ál., 2010, *Am J Respir Crit*

Care Med., 181(8):788-796), o MEDI 9314, o cualquiera de los anticuerpos anti-IL-4R α establecidos en la patente estadounidense n.º 7,186,809, patente estadounidense n.º 7,605,237, patente estadounidense n.º 7,638,606, patente estadounidense n.º 8,092,804, patente estadounidense n.º 8,679,487 o patente estadounidense n.º 8,877,189.

Características dependientes del pH de los anticuerpos anti-IL-4 y/o anti-IL-33

Los anticuerpos anti-IL-4R α y los anticuerpos anti-IL-33 utilizados en el contexto de los métodos de la presente invención pueden tener características dependientes del pH. Por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-4R α o un anticuerpo anti-IL-33 de la presente invención puede presentar una unión reducida a IL-4R α o a IL-33, respectivamente, con un pH ácido, en comparación con un pH neutro. De manera alternativa, un anticuerpo anti-IL-4R α de la invención o un anticuerpo anti-IL-33 de la invención puede presentar una unión mejorada a su antígeno con un pH ácido, en comparación con un pH neutro. La expresión "pH ácido" incluye valores de pH menores que alrededor de 6.2, por ejemplo, aproximadamente 6.0, 5.95, 5.9, 5.85, 5.8, 5.75, 5.7, 5.65, 5.6, 5.55, 5.5, 5.45, 5.4, 5.35, 5.3, 5.25, 5.2, 5.15, 5.1, 5.05, 5.0, o menor. Tal como se usa en la presente, la expresión "pH

neutro" se refiere a un pH de alrededor de 7,0 a alrededor de 7,4. La expresión "pH neutro" incluye valores de pH de alrededor de 7.0. 7.05. 7.1. 7.15. 7.2. 7.25. 7.3. 7.35 y 7.4.

5 En determinadas instancias, "unión reducida a IL-4R α con pH ácido en comparación con pH neutro", o "unión reducida a IL-33 con pH ácido en comparación con pH neutro" se expresa en términos de la proporción entre el valor de K_D de la unión del anticuerpo con IL-4R α o IL-33, respectivamente, con pH
10 ácido y el valor de K_D de la unión del anticuerpo a IL-4R α o IL-33, respectivamente, a pH neutro (o viceversa). Por ejemplo, puede considerarse que un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este presenta una "unión reducida a IL-4R α con un pH ácido en comparación con pH neutro" o "unión
15 reducida a IL-33 con pH ácido en comparación con pH neutro", a los fines de la presente invención, si el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este presenta una proporción de K_D ácida/neutra de alrededor de 3.0 o mayor. En determinados ejemplos de modalidades, la relación de K_D
20 ácida/neutra de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la presente invención puede ser de alrededor de 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0, 11.5, 12.0, 12.5, 13.0, 13.5, 14.0, 14.5, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 40.0, 50.0, 60.0, 70.0,

100.0 o mayor.

Pueden obtenerse anticuerpos con características de unión dependientes de pH, por ejemplo, al analizar una población de anticuerpos en búsqueda de una unión reducida (o potenciada) a un antígeno en particular a pH ácido en comparación con pH neutro. Además, las modificaciones del dominio de unión al antígeno en el nivel del aminoácido pueden proporcionar anticuerpos con características de dependencia del pH. Por ejemplo, al sustituir uno o más aminoácidos de un dominio de unión al antígeno (por ejemplo, dentro de una CDR) con un residuo de histidina, puede obtenerse un anticuerpo con menor unión al antígeno a un pH ácido con respecto al pH neutro. Tal como se usa en la presente, la expresión "pH ácido" significa un pH de 6.0 o menor.

15

Efectos biológicos de los antagonistas de IL-33 e IL-4R utilizados en terapia de combinación

La presente invención incluye el uso de un antagonista de IL-33 en combinación con un antagonista de IL-4R para tratar una afección inflamatoria. En una modalidad, el uso de un anticuerpo anti-IL-33 en comparación con un anticuerpo anti-IL-4R en un modelo animal de fibrosis e inflamación de pulmón demuestra una eficacia mejorada en comparación con los resultados obtenidos cuando cada anticuerpo se utiliza solo

como monoterapia.

Por ejemplo, el modelo animal descrito en la presente (mencionado como un modelo de ácaro del polvo doméstico (HDM, por sus siglas en inglés) de fibrosis e inflamación pulmonar), el nivel de determinadas citocinas en los pulmones se encuentra significativamente elevado. Esto incluye aumento de IL-4, IL-5, IL-6, IL-1 β y MCP-1. También hubo una tendencia a niveles aumentados de IL-13 y TNF α en los pulmones de ratones después de la administración de alérgeno de ácaro del polvo doméstico. Sin embargo, cuando se evaluó en este modelo, el uso combinado del anticuerpo de IL-33 y el anticuerpo de IL-4R dio como resultado niveles reducidos de citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, IL-1 β , MCP-1 y TNF α en los pulmones de los ratones tratados. El efecto sobre los niveles de citocina en el pulmón observados con la combinación de anticuerpos anti-IL-33 y anti-IL-4R fue mayor que el tratamiento con cualquiera de los tratamientos individuales cuando se utilizaron solos, tal como se muestra en el Ejemplo 4.

Además, los niveles de genes de citocina, genes de quimiocina y genes de colágeno, inclusive *Il4*, *Il13*, *Il6*, *Ccl2*, *Tgfb1*, *Il13ra2* y *Col24a1*, fueron elevados en ratones que recibieron un alérgeno de ácaro del polvo doméstico. Hubo una tendencia a niveles elevados de *Il5*, *Il9*, *Ccl11*,

Ccl24, *Tnf*, *Il1rl1* y *Col15a1* en este modelo. Después del tratamiento con la combinación de anticuerpo anti-IL-33 y el anticuerpo anti-IL-4R, hubo una reducción significativa en la expresión de *Il6*, *Ccl2*, *Ccl11* y *Ccl24*, en comparación con los
5 niveles observados con el tratamiento con cualquiera de los anticuerpos solo. Hubo además una tendencia a niveles reducidos de *Il4*, *Il5*, *Il13*, *Il9*, *Tnf*, *Tgfb1*, *Il1rl1*, *Il13ra2*, *Col15a1* y *Col24a1* cuando los ratones fueron tratados con el anticuerpo anti-IL-33 más el anticuerpo anti-IL-4R, en
10 comparación con el tratamiento con cualquiera de los anticuerpos solo.

Se observó otro efecto biológico asociado con el uso combinado del anticuerpo anti-IL-33 más el anticuerpo anti-IL-4R cuando se realizó un análisis de infiltrados celulares
15 en el modelo de ácaro del polvo doméstico. Tal como se muestra en el Ejemplo 4, la frecuencia de eosinófilos, linfocitos B activados, linfocitos CD8 activados, linfocitos T ST2+CD4+ y proporción entre linfocitos T CD4/CD8 fue significativamente mayor en ratones que recibieron el
20 alérgeno de ácaro del polvo doméstico. También hubo una tendencia a un aumento de frecuencia de linfocitos T CD4+ activados en los pulmones de ratones que recibieron alérgeno de ácaro del polvo doméstico. Hubo una tendencia a una frecuencia reducida de eosinófilos, linfocitos B activados,

linfocitos CD8 activados, linfocitos T ST2+CD4+ y proporción entre linfocitos T CD4/CD8 en ratones tratados con el anticuerpo anti-IL-33 más el anticuerpo anti-IL-4R en comparación con la observada cuando se utilizó cualquiera de
5 anticuerpos solo.

Además, los ratones que recibieron el alérgeno de ácaro del polvo doméstico también presentaron un aumento de metaplasia de células caliciformes en los pulmones. De manera similar, también hubo un aumento en la consolidación pulmonar
10 (acumulación de material líquido o sólido en el espacio alveolar) y fibrosis subepitelial (un exceso de depósito de colágeno intersticial debajo del epitelio pulmonar) en este modelo de ratón. El tratamiento de estos ratones con un anticuerpo anti-IL-33 en combinación con un anticuerpo anti-
15 IL-4R dio como resultado una reducción de metaplasia de células caliciformes y espesor del colágeno subepitelial y una reducción significativa de la consolidación pulmonar, en comparación con los resultados observados cuando se utilizó cualquiera de los anticuerpos solo.

20 Los ratones que recibieron alérgeno de ácaro del polvo doméstico también presentaron un aumento de los niveles en circulación de IgE, así como una tendencia a un aumento en IgG1 específica de ácaros del polvo domésticos (HDM). La administración de ambos anticuerpos anti-IL-33 y anti-IL-4R

dio como resultado una disminución significativa de los niveles de IgE en suero y una tendencia a una disminución de IgG1 específica de HDM en comparación con los niveles de IgE e IgG1 específica de HDM observados cuando se utilizó
5 cualquiera de los anticuerpos solo.

Un antagonista de IL-33 y un antagonista de IL-4R, tal como los anticuerpos descritos en la presente para su uso como terapia de combinación para tratar trastornos o afecciones pulmonares inflamatorias, puede inhibir o atenuar la
10 señalización mediada por IL-33 y la señalización mediada por IL-4R y pueden presentar una o más propiedades biológicas observadas en el modelo de HDM descrito en la presente, por ejemplo, (1) una reducción de los niveles de citocina que están elevados en un mamífero como resultado de la exposición
15 a un alérgeno, por ejemplo, IL-4 o IL-5; (2) inhibición de la inflamación pulmonar que resulta de exposición aguda o crónica a un alérgeno (por ejemplo, ácaros del polvo domésticos (HDM)); (3) una disminución de la infiltración pulmonar celular que resulta de exposición aguda o crónica a
20 un alérgeno (por ejemplo, ácaros del polvo doméstico (HDM)); (4) mejora en una macropatología pulmonar compuesta.

La inhibición de señalización mediada por IL-33 o de la señalización mediada por IL-4R puede medirse en un bioensayo a base de células y significa que un anticuerpo anti-IL-33 o

un fragmento de unión al antígeno de este, o un anticuerpo anti-IL-4R o un fragmento de unión al antígeno de este inhibe o reduce la señal producida en células que expresan un receptor de IL-33 o un receptor de IL-4 y un elemento
5 reportero que produce una señal detectable en respuesta a la unión de IL-33 o la unión de IL-4. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos fragmentos de unión al antígeno de estos que bloquean la señalización mediada por IL-33 o la señalización mediada por IL-4 en células que expresan ST2
10 humana, o en células que expresan un receptor de IL-4, respectivamente, con una IC_{50} menor que alrededor de 2 nM, menor que alrededor de 1 nM, menor que alrededor de 900 pM, menor que alrededor de 800 pM, menor que alrededor de 700 pM, menor que alrededor de 600 pM, menor que alrededor de 500 pM,
15 menor que alrededor de 400 pM, menor que alrededor de 350 pM, menor que alrededor de 300 pM, menor que alrededor de 250 pM, menor que alrededor de 200 pM, menor que alrededor de 150 pM, menor que alrededor de 100 pM, menor que alrededor de 90 pM, menor que alrededor de 80 pM, menor que alrededor de 70 pM,
20 menor que alrededor de 60 pM, menor que alrededor de 50 pM, menor que alrededor de 40 pM, menor que alrededor de 30 pM, menor que alrededor de 20 pM o menor que alrededor de 10 pM, según se mide en un bioensayo de inhibición o bloqueo basado en células.

Los anticuerpos de la presente invención pueden presentar uno o más de los efectos biológicos antemencionados, o cualquier combinación de estos. Otros efectos biológicos de los anticuerpos de la presente invención serán evidentes para un experto en la técnica a partir de una revisión de la presente descripción que incluye los Ejemplos funcionales de la presente. El uso de otros antagonistas de IL-33 en combinación con un antagonista de IL-4 puede presentar efectos similares.

10

Administración y composiciones farmacéuticas

La invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los antagonistas de IL-33 y/o antagonistas de IL-4R de la presente invención. Los antagonistas de IL-33 y los antagonistas IL-4R pueden formularse en composiciones separadas o pueden coformularse en una composición. Las composiciones farmacéuticas de la invención se formulan con portadores, excipientes y otros agentes adecuados que proporcionan mejoras en la transferencia, administración, tolerancia y similares. Pueden encontrarse múltiples formulaciones apropiadas en el recetario conocido por todo químico farmacéutico: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, ungüentos, gelatinas,

ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos) (como LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones de aceite en agua y de agua en
5 aceite, emulsiones carbowax (polietilenglicoles de varios pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen carbowax. Véase también, Powell et ál. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

10 La dosis de anticuerpo administrada a un paciente puede variar dependiendo de la edad y el tamaño del paciente, enfermedad objetivo, afecciones, vía de administración y similares. La dosis preferida se calcula generalmente de acuerdo con el peso corporal o el área de superficie
15 corporal. Cuando se usa un anticuerpo de la presente invención para tratar una afección o una enfermedad asociada con la actividad de IL-33 y/o IL-4 en un paciente adulto, puede ser favorable administrar por vía intravenosa el anticuerpo de la presente invención normalmente en una dosis
20 única de alrededor de 0.01 a alrededor de 20 mg/kg de peso corporal, más preferentemente alrededor de 0.02 a alrededor de 7, alrededor de 0.03 a alrededor de 5, o alrededor de 0.05 a alrededor de 3 mg/kg de peso corporal. Se puede ajustar la frecuencia y la duración del tratamiento, dependiendo de la

gravedad de la afección. Los cronogramas y dosificaciones eficaces para la administración de los anticuerpos anti-IL-33 pueden determinarse de manera empírica; por ejemplo, se puede controlar la evolución del paciente mediante evaluación
5 periódica y se puede ajustar la dosis en consecuencia. Además, se puede realizar un ajuste de la dosificación entre especies mediante el uso de métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, Mordenti et ál., 1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351).

10 Se conocen varios sistemas de administración que pueden utilizarse para administrar la composición farmacéutica de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes que pueden expresar los virus mutantes, endocitosis mediada por
15 receptores (véase, por ejemplo, Wu et ál., 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432). Los métodos de introducción incluyen, de modo no taxativo, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. La composición se puede administrar por
20 cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, rectal e intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos.

La administración puede ser sistémica o local.

Se puede administrar de forma subcutánea o intravenosa una composición farmacéutica de la presente invención con una aguja y una jeringa estándar. Además, respecto a la
5 administración subcutánea, los dispositivos de administración tipo lapicera pueden aplicarse con facilidad a la administración de una composición farmacéutica de la presente invención. Dicho dispositivo de administración tipo lapicera puede reutilizarse o ser descartable. En general, los
10 dispositivos de administración tipo lapicera reutilizables usan cartuchos reemplazables que contienen una composición farmacéutica. Una vez que toda la composición farmacéutica del cartucho se administró y que el cartucho está vacío, este puede descartarse fácilmente y reemplazarse con un nuevo
15 cartucho que contiene la composición farmacéutica. Luego se puede reutilizar el dispositivo de administración tipo pluma.

En un dispositivo de administración tipo pluma descartable no hay cartuchos reemplazables. En cambio, el dispositivo de administración tipo pluma descartable se proporciona con la
20 composición farmacéutica dentro de un depósito en el dispositivo. Una vez que la composición farmacéutica se vacía del dispositivo, se descarta todo el dispositivo.

Se pueden aplicar diferentes tipos de dispositivos reutilizables de auto inyección y tipo pluma para la

administración subcutánea de una composición farmacéutica de la presente invención. Los ejemplos incluyen, de modo no taxativo, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, Reino Unido), el dispositivo DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Suiza), el dispositivo HUMALOG MIX 75/25™, el dispositivo HUMALOG™, el dispositivo HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II y III (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen Dinamarca), el dispositivo BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ y OPTICLIK™ (Sanofi-aventis, Frankfurt, Alemania), entre otros. Los ejemplos de dispositivos de administración descartables tipo pluma aplicables para la administración de una composición farmacéutica de la presente invención incluyen, de modo no taxativo, la pluma SOLOSTAR™ (Sanofi-aventis), el FLEXPEN™ (Novo Nordisk), y el KWIKPEN™ (Eli Lilly), el autoinyector SURECLICK™ (Amgen, Thousands Oaks, CA), el PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Alemania), el EPIPEN (Dey, L.P.) y el dispositivo HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, IL), entre otros.

En determinadas situaciones, la composición farmacéutica puede administrarse en un sistema de liberación controlada. En una modalidad, se puede usar una bomba (véase, Langer,

supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). En otra modalidad, se pueden usar materiales poliméricos, véase, Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. En aun otra
5 modalidad, puede colocarse un sistema de liberación controlada próximo al objetivo de la composición, lo que requiere solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, 1984, en Medical Applications of Controlled Release, supra, tomo 2, pp. 115-138). Se establecen otros
10 sistemas de liberación controlada en la reseña de Langer, 1990, Science 249:1527-1533.

Las preparaciones inyectables pueden incluir formas de dosificación para inyecciones intravenosas, subcutáneas, intracutáneas e intramusculares, infusiones por goteo, etc.
15 Estas preparaciones inyectables pueden prepararse mediante métodos ampliamente conocidos. Por ejemplo, las preparaciones inyectables se pueden preparar, por ejemplo, mediante la disolución, suspensión o emulsión del anticuerpo o su sal descrita anteriormente en un medio acuoso estéril o
20 un medio de aceite usado convencionalmente en inyecciones. Pueden ser medios acuosos para inyecciones, por ejemplo, una solución salina fisiológica, una solución isotónica con glucosa y otros agentes auxiliares, etc., que se pueden utilizar junto con un agente solubilizante apropiado, como un

alcohol (por ejemplo, etanol), un polialcohol (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol), un tensioactivo no iónico [por ejemplo, polisorbato 80, HCO-50 (aducto de polioxietileno (50 mol) de aceite de ricino hidrogenado)],
5 etc. Puede utilizarse como medio oleoso, por ejemplo, aceite de sésamo, aceite de soja, etc., que se pueden utilizar junto con un agente solubilizante como benzoato de bencilo, alcohol de bencilo, etc. Preferentemente, la inyección preparada mediante este método se llena en una ampolla apropiada.

10 Convenientemente, las composiciones farmacéuticas para uso oral o parenteral descritas anteriormente se preparan en formas de dosificación en una dosificación unitaria adecuada para una dosis de los ingredientes activos. Dichas formas de dosificación en una dosis unitaria incluyen, por ejemplo,
15 comprimidos, píldoras, cápsulas, inyecciones (ampollas), supositorios, etc. La cantidad del antagonista antes mencionado contenida suele ser de entre alrededor de 5 y alrededor de 500 mg por forma de dosificación en dosis unitaria; se prefiere, especialmente en forma de inyección,
20 que los antagonistas antemencionados se encuentren en una cantidad de alrededor de 5 a alrededor de 100 mg y en alrededor de 10 a alrededor de 250 mg para las otras formas de dosificación.

Dosificación

La cantidad de antagonista de IL-33 y antagonista de IL-4R administrada a un sujeto de acuerdo con los métodos de la presente invención es generalmente una cantidad terapéuticamente eficaz. Tal como se usa en la presente, la frase "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de antagonista de IL-33 y antagonista de IL-4R que, cuando se utilizan en combinación, da como resultado un cambio significativo de uno o más de los siguientes: (a) prevención de la inflamación; (b) tratamiento o reducción de la gravedad de la inflamación; (c) una reducción de la frecuencia de uno o más de los siguientes: eosinófilos, linfocitos B activados, linfocitos T CD8 activados o proporción entre linfocitos T CD4/CD8 en los pulmones; (d) una reducción de uno o más de los siguientes: niveles de interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6), interleucina-13 (IL-13), proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) o factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) en el pulmón; (e) reducción de la expresión génica de uno o más de los siguientes: *Il4*, *Il5*, *Il6*, *Il9*, *Il13*, *Il1rl1*, *Il13ra2*, *tnf*, *Tgfb1*, *Ccl2*, *Ccl11*, *Ccl24*, *Col15a1* o *Col24a1* en el pulmón; (f) una reducción de los niveles de IgE en suero; (g) una reducción de metaplasia de células caliciformes en el pulmón;

o (h) una reducción de la consolidación pulmonar, tal como se describe en la presente. Si bien la administración ya sea del antagonista de IL-33 solo o del antagonista de IL-4R solo puede dar como resultado un efecto terapéutico positivo, según se mide mediante el uso de uno o más de los parámetros antemencionados, el uso los antagonistas de IL-33 e IL-4R en combinación presentará una mejora significativa (por ejemplo, un efecto aditivo o sinérgico) en cualquiera de los parámetros en comparación con la observada mediante el uso de monoterapia ya sea con el antagonista de IL-33 solo o el antagonista de IL-4R solo.

En el caso de un antagonista de IL-33 o un antagonista de IL-4R, una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser de alrededor de 0.05 mg a alrededor de 600 mg, por ejemplo, alrededor de 0.05 mg, alrededor de 0.1 mg, alrededor de 1.0 mg, alrededor de 1.5 mg, alrededor de 2.0 mg, alrededor de 10 mg, alrededor de 20 mg, alrededor de 30 mg, alrededor de 40 mg, alrededor de 50 mg, alrededor de 60 mg, alrededor de 70 mg, alrededor de 80 mg, alrededor de 90 mg, alrededor de 100 mg, alrededor de 110 mg, alrededor de 120 mg, alrededor de 130 mg, alrededor de 140 mg, alrededor de 150 mg, alrededor de 160 mg, alrededor de 170 mg, alrededor de 180 mg, alrededor de 190 mg, alrededor de 200 mg, alrededor de 210 mg, alrededor de 220 mg, alrededor de 230 mg, alrededor de

240 mg, alrededor de 250 mg, alrededor de 260 mg, alrededor de 270 mg, alrededor de 280 mg, alrededor de 290 mg, alrededor de 300 mg, alrededor de 310 mg, alrededor de 320 mg, alrededor de 330 mg, alrededor de 340 mg, alrededor de 350 mg, alrededor de 360 mg, alrededor de 370 mg, alrededor de 380 mg, alrededor de 390 mg, alrededor de 400 mg, alrededor de 410 mg, alrededor de 420 mg, alrededor de 430 mg, alrededor de 440 mg, alrededor de 450 mg, alrededor de 460 mg, alrededor de 470 mg, alrededor de 480 mg, alrededor de 490 mg, alrededor de 500 mg, alrededor de 510 mg, alrededor de 520 mg, alrededor de 530 mg, alrededor de 540 mg, alrededor de 550 mg, alrededor de 560 mg, alrededor de 570 mg, alrededor de 580 mg, alrededor de 590 mg o alrededor de 600 mg. En determinadas modalidades, se administran 75 mg, 150 mg, 200 mg o 300 mg de un antagonista de IL-4R a un sujeto en combinación con un antagonista de IL-33. En determinadas modalidades, se administran 75 mg, 150 mg, 200 mg o 300 mg de un antagonista de IL-33 a un sujeto en combinación con un antagonista de IL-4R.

La cantidad del antagonista de IL-33 o del antagonista de IL-4R que contienen las dosis individuales puede expresarse en términos de miligramos de antagonista por kilogramo de peso corporal del paciente (es decir, mg/kg). Por ejemplo, el antagonista de IL-33 o el antagonista de IL-4R se puede

administrar a un paciente en una dosis de alrededor de 0.0001 mg/kg a alrededor de 25 mg/kg de peso corporal del paciente. En determinadas modalidades, cada uno de los antagonistas de IL-4R e IL-33 se puede administrar en dosis de alrededor de
5 0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg, 1.0 mg/kg, 3.0 mg/kg o 10 mg/kg.

La combinación del antagonista de IL-33 y el antagonista de IL-4R se puede administrar al sujeto por vía subcutánea, intravenosa, intramuscular o intranasal. Se pueden administrar de forma concurrente o secuencial.

10

Usos terapéuticos de los anticuerpos

Los experimentos que utilizan un sistema de modelo de ratón, tales como los llevados a cabo por los inventores de la presente, han contribuido a la identificación de diversas
15 enfermedades y afecciones que se pueden tratar, prevenir y/o mejorar mediante el antagonismo combinado de IL-33 e IL-4R. Por ejemplo, en un modelo de ácaro del polvo doméstico de fibrosis e inflamación pulmonar, el tratamiento con una combinación de un anticuerpo de IL-33 y un anticuerpo de IL-
20 4R dio como resultado una reducción de los niveles de citocina en el pulmón, una resultado de infiltrados celulares pulmonares en el pulmón (eosinófilos, linfocitos B activados, linfocitos T CD8 activados, linfocitos T ST2+CD4+ y proporción entre linfocitos T CD4/CD8), así como una mejora

en la consolidación pulmonar y fibrosis subepitelial, en comparación con los resultados obtenidos cuando cada anticuerpo se utilizó solo como monoterapia.

Los anticuerpos de la invención son útiles, entre otros, para
5 el tratamiento, prevención y/o mejora de cualquier trastorno o enfermedad asociada con la expresión, señalización o actividad de IL-33 y la expresión de IL-4 o mediado por estas, o que se puede tratar mediante el bloqueo de la interacción entre IL-33 y el receptor de IL-33 (por ejemplo,
10 ST2) , o el bloqueo de la invención entre IL-4 y el receptor de IL-4, o bien mediante la inhibición de la actividad y/o señalización de IL-33 e IL-4. En determinadas modalidades, el antagonista de IL-4R es un antagonista que se une o interactúa con IL-4R α y, al hacer esto, bloquea las vías de
15 señalización de IL-4 e IL-13 a través de los receptores de IL-4R de tipo 1 y tipo 2. En sí, el uso del antagonista dual de IL-4 e IL-13 en combinación con un antagonista de IL-33 puede proporcionar beneficios clínicos adicionales cuando se administra a pacientes que tienen una afección inflamatoria
20 mediada por las tres vías de señalización. Por ejemplo, la presente invención proporciona métodos para tratar el asma (asma alérgica, asma no alérgica, asma refractaria grave, exacerbaciones del asma, asma resistente a esteroides o refractario esteroideo, asma sensible a esteroides, asma

eosinofílica o asma no eosinofílica, etc.), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y exacerbaciones de EPOC, síndrome de superposición de asma y EPOC (ACOS), bronquitis crónica, enfisema, neumonitis por hipersensibilidad, dermatitis atópica, urticaria, psoriasis, alergia, rinitis alérgica, rinosinusitis crónica con o sin pólipos nasales, esofagitis eosinofílica, anafilaxis, enfermedad cardiovascular, enfermedad del sistema nervioso central, dolor (inclusive dolor inflamatorio), artritis (por ejemplo, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis psoriásica, etc.), arteritis de células gigantes, vasculitis (enfermedad de behcet y síndrome de Churg Strauss), púrpura de Henoch-Schonlein, esclerosis múltiple, trastorno inflamatorio del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa), lupus, síndrome de sjogren y otros trastornos y enfermedades inflamatorias mediadas en parte por la señalización de IL-33 y/o IL-4.

Los anticuerpos de la presente invención son útiles además para el tratamiento, prevención y/o mejora de uno o más trastornos o enfermedades fibróticas. Los ejemplos de trastornos o enfermedades fibróticas que pueden tratarse mediante la administración del antagonista anti-IL-33 e IL-4R de la invención incluyen fibrosis pulmonar (por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis pulmonar inducida por

bleomicina, fibrosis pulmonar inducida por asbestos y
síndrome de bronquiolitis obliterante), fibrosis asociada a
lesiones pulmonares agudas y síndrome de dificultad
respiratoria aguda (por ejemplo, fibrosis inducida por
5 neumonía bacteriana, fibrosis inducida por traumatismo,
fibrosis inducida por neumonía viral, fibrosis inducida por
ventilador, fibrosis inducida por sepsis no pulmonar y
fibrosis inducida por aspiración), silicosis, fibrosis
inducida por radiación, escleroderma, fibrosis ocular,
10 fibrosis de la piel (por ejemplo, escleroderma), fibrosis
hepática (por ejemplo, cirrosis, fibrosis hepática inducida
por alcohol, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), lesión
del ducto biliar, cirrosis biliar primaria, fibrosis hepática
inducida por infección o virus, hepatitis autoinmunitaria,
15 fibrosis de riñón (renal), fibrosis cardíaca, aterosclerosis,
restenosis del stent y mielofibrosis.

En el contexto de los métodos de tratamiento descritos en la
presente, el anticuerpo anti-IL-33 y el anticuerpo anti-IL-4R
pueden administrarse juntos (es decir, como el único régimen
20 terapéutico) o en combinación con uno o más agentes
terapéuticos adicionales (cuyos ejemplos se describen en otra
parte de la presente).

Terapias de combinación

La presente invención incluye el uso de composiciones y

formulaciones terapéuticas que comprenden cualquiera de los antagonistas anti-IL-33 y antagonista de IL-4R descritos en la presente en combinación con uno o más componentes terapéuticamente activos adicionales y métodos de tratamiento

5 que comprenden la administración de dichas combinaciones a los sujetos que lo necesitan. Tal como se usa en la presente, la expresión "en combinación con" significa que los agentes terapéuticos adicionales se administran antes, después o al mismo tiempo que la composición farmacéutica que

10 comprende el antagonista de IL-33 y el antagonista de IL-4R. La expresión "en combinación con" incluye además la administración secuencial o concomitante de un antagonista de IL-4R y un antagonista de IL-33 y uno o más agentes terapéuticos adicionales. La presente invención incluye

15 composiciones farmacéuticas en las que un antagonista de IL-33 y un antagonista de IL-4R de la presente invención se formula conjuntamente con uno o más componentes terapéuticamente activos adicionales.

Por ejemplo, cuando se administra "antes" de las

20 composiciones farmacéuticas que comprenden el antagonista de IL-33 y el antagonista de IL-4R, el agente terapéutico adicional puede administrarse alrededor de 72 horas, alrededor de 60 horas, alrededor de 48 horas, alrededor de 36 horas, alrededor de 24 horas, alrededor de 12 horas,

alrededor de 10 horas, alrededor de 8 horas, alrededor de 6 horas, alrededor de 4 horas, alrededor de 2 horas, alrededor de 1 hora, alrededor de 30 minutos, alrededor de 15 minutos o alrededor de 10 minutos antes de la administración de las composiciones farmacéuticas que comprenden el antagonista de IL-33 y el antagonista de IL-4R. Cuando se administra "después" de las composiciones farmacéuticas que comprenden el antagonista de IL-33 y el antagonista de IL-4R, el agente terapéutico adicional se puede administrar alrededor de 10 minutos, alrededor de 15 minutos, alrededor de 30 minutos, alrededor de 1 hora, alrededor de 2 horas, alrededor de 4 horas, alrededor de 6 horas, alrededor de 8 horas, alrededor de 10 horas, alrededor de 12 horas, alrededor de 24 horas, alrededor de 36 horas, alrededor de 48 horas, alrededor de 60 horas o alrededor de 72 horas después de la administración de las composiciones farmacéuticas que comprenden el antagonista de IL-33 y el antagonista de IL-4R. La administración "simultánea" o con la composición farmacéutica que comprende el antagonista de IL-33 y el antagonista de IL-4R significa que el agente terapéutico adicional se administra al sujeto en una forma de dosificación separada dentro de menos de 5 minutos (antes, después o al mismo tiempo) de la administración de la composición farmacéutica que comprende el antagonista de IL-33 y el antagonista de IL-4R, o que se

administra al sujeto como una única formulación de dosificación combinada que comprende tanto el agente terapéutico adicional como el antagonista de IL-33 y el antagonista de IL-4R.

5 El terapéutico adicional puede ser otro anticuerpo de IL-33, otro antagonista de IL-4R, un antagonista de IL-1 (inclusive, por ejemplo, un antagonista de IL-1, tal como se establece en US 6,927,044), un antagonista de IL-6, un antagonista de IL-6R (inclusive, por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-6R, tal
10 como se establece en US 7,582,298), un antagonista de IL-13, un antagonista de TNF, un antagonista de IL-8, un antagonista de IL-9, un antagonista de IL-17, un antagonista de IL-5 (por ejemplo mepolizumab, o NUCALA®), un antagonista de IgE (por ejemplo omalizumab o XOLAIR®), un antagonista de CD48, un
15 antagonista de IL-31 (inclusive, por ejemplo, tal como se establece en US7,531,637), un antagonista de linfopoyetina estromal tímica (inclusive, por ejemplo, tal como se establece en US 2011/027468), interferón-gamma (IFN γ), antibióticos, corticosteroides (inclusive corticosteroides
20 inhalados o ICS), agonistas adrenérgicos β 2 de acción prolongada (LABA), agonistas muscarínicos de acción prolongada (LAMA), tacrolimus, pimecrolimus, ciclosporina, azatioprina, metotrexato, cromolín sodio, inhibidores de proteínasa, antihistamínicos o combinaciones de estos.

Regímenes de administración

De acuerdo con determinadas modalidades de la presente invención, se pueden administrar múltiples dosis de un antagonista de IL-33 y un antagonista de IL-4R (o una composición farmacéutica que comprenda una combinación de un antagonista de IL-33, antagonista de IL-4R y cualquiera de los agentes terapéuticamente activos adicionales mencionados en la presente) a un sujeto durante un período de tiempo definido. Los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención comprenden administrarle secuencialmente a un sujeto múltiples dosis de un antagonista de IL-33 y un antagonista de IL-4R de la invención. Tal como se usa en la presente, "administrar secuencialmente" significa que cada dosis de un antagonista de IL-33 y antagonista de IL-4R se administra al sujeto en un momento distinto, por ejemplo, en distintos días separados por un intervalo predeterminado (por ejemplo, horas, días, semanas o meses). La presente invención incluye métodos que comprenden administrarle secuencialmente al paciente una única dosis inicial de un antagonista de IL-33 y un antagonista de IL-4R, seguida de una o más dosis secundarias del antagonista de IL-33 y el antagonista de IL-4R, y opcionalmente seguida de una o más dosis terciarias del antagonista de IL-33 y el antagonista de

IL-4R.

Los términos "dosis inicial", "dosis secundarias" y "dosis terciarias", se refieren a la secuencia temporal de administración del antagonista de IL-33 y el antagonista de IL-4R de la invención. Por lo tanto, la "dosis inicial" es la dosis que se administra al principio del régimen de tratamiento (también denominada "dosis de referencia"), las "dosis secundarias" son las dosis que se administran después de la dosis inicial; y las "dosis terciarias" son las dosis que se administran después de las dosis secundarias. Las dosis inicial, secundaria y terciaria pueden contener la misma cantidad del antagonista de IL-33 y antagonista de IL-4R, pero por lo general pueden diferir entre sí con respecto a la frecuencia de administración. En determinadas modalidades, sin embargo, la cantidad de antagonista de IL-33 y antagonista de IL-4R que contiene la dosis inicial, secundaria y/o terciaria varía de una a otra (por ejemplo, se aumenta o disminuye, según corresponda) durante el transcurso del tratamiento. En determinadas modalidades, se administran dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4 o 5) dosis al comenzar el régimen de tratamiento como "dosis de carga" seguidas por dosis posteriores que se administran con menor frecuencia (por ejemplo, "dosis de mantenimiento").

En determinados ejemplos de modalidades de la presente

invención, cada dosis secundaria y/o terciaria se administra entre 1 y 26 (por ejemplo, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 5 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½, o más) semanas después de la dosis inmediatamente anterior. La frase "dosis inmediatamente anterior", tal como se usa en la presente se refiere, en una secuencia de múltiples administraciones, a la dosis del antagonista de IL-10 33 y antagonista de IL-4R que se administra a un paciente antes de administrarle la dosis inmediatamente posterior en la secuencia, sin dosis intermedias.

Los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención pueden comprender administrarle a un paciente cualquier 15 cantidad de dosis secundarias y/o terciarias de un antagonista de IL-33 y un antagonista de IL-4R. Por ejemplo, en determinadas modalidades, se administra al paciente una única dosis secundaria. En otras modalidades, se administran al paciente dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 20 más) dosis secundarias. De manera similar, en determinadas modalidades, se administra al paciente una única dosis terciaria. En otras modalidades, se administran al paciente dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más) dosis terciarias.

En modalidades que suponen múltiples dosis secundarias, cada dosis secundaria se puede administrar con la misma frecuencia que las otras dosis secundarias. Por ejemplo, cada dosis secundaria puede administrarse al paciente entre 1 y 2
5 semanas o 1 y 2 meses después de la dosis inmediatamente anterior. De forma similar, en modalidades que suponen múltiples dosis terciarias, cada dosis terciaria se puede administrar con la misma frecuencia que las otras dosis terciarias. Por ejemplo, cada dosis terciaria puede
10 administrarse al paciente entre 2 y 12 semanas después de la dosis inmediatamente anterior. En determinadas modalidades de la invención, la frecuencia a la que se administran las dosis secundarias y/o terciarias a un paciente puede variar durante el régimen de tratamiento. Un médico también puede
15 ajustar la frecuencia de administración durante el tratamiento según las necesidades del paciente individual, tras una evaluación clínica.

La presente invención incluye regímenes de administración en los cuales se administran 2 a 6 dosis de carga a un paciente
20 en una primera frecuencia (por ejemplo, una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez al mes, una vez cada dos meses, etc.), seguido de la administración de dos o más dosis de mantenimiento al paciente con menor frecuencia. Por ejemplo, de acuerdo con

este aspecto de la invención, si las dosis de carga se administran con una frecuencia de una vez al mes, las dosis de mantenimiento pueden administrarse al paciente una vez cada seis semanas, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, etc.).

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una descripción completa de cómo usar y elaborar los métodos y composiciones de la invención, y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran es su invención. Se han llevado a cabo esfuerzos para asegurar la exactitud de los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes por peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura se proporciona en grados centígrados y la presión es atmosférica o similar.

Ejemplo 1. Generación de anticuerpos humanos anti-IL-33 humano

Los anticuerpos humanos anti-IL-33 se generaron como se describe en la patente estadounidense n.º 9,453,072. La Tabla 1 establece los pares de secuencias de aminoácidos de

región variable de cadena ligera y pesada, y secuencias de CDR, de los anticuerpos anti-IL-33 seleccionados y sus identificadores de anticuerpos correspondientes. La Tabla 2 establece las secuencias de ácido nucleico que codifican los pares de secuencias de aminoácidos de región variable de
5 cadena ligera y pesada, y secuencias de CDR, de los anticuerpos anti-IL-33 seleccionados y sus identificadores de anticuerpos correspondientes.

Tabla 1 Identificadores de secuencias de aminoácidos

		SEQ ID NO:							
	Denominación de anticuerpos	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
5	H1M9559N	2	4	6	8	10	12	14	16
	H1M9566N	18	20	22	24	26	28	30	32
	H1M9568N	34	36	38	40	42	44	46	48
10	H4H9629P	50	52	54	56	58	60	62	64
	H4H9633P	66	68	70	72	74	76	78	80
	H4H9640P	82	84	86	88	90	92	94	96
	H4H9659P	98	100	102	104	106	108	110	112
	H4H9660P	114	116	118	120	122	124	126	128
15	H4H9662P	130	132	134	136	138	140	142	144
	H4H9663P	146	148	150	152	154	156	158	160
	H4H9664P	162	164	166	168	170	172	174	176
	H4H9665P	178	180	182	184	186	188	190	192
	H4H9666P	194	196	198	200	202	204	206	208
20	H4H9667P	210	212	214	216	218	220	222	224
	H4H9670P	226	228	230	232	234	236	238	240
	H4H9671P	242	244	246	248	250	252	254	256
	H4H9672P	258	260	262	264	266	268	270	272
	H4H9675P	274	276	278	280	282	284	286	288
	H4H9676P	290	292	294	296	298	300	302	304
	H1M9565N	308	310	312	314	316	318	320	322

Tabla 2 Identificadores de secuencias de ácido nucleico

		SEQ ID NO:							
	Denominación de anticuerpos	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCD R3
5	H1M9559N	1	3	5	7	9	11	13	15
	H1M9566N	17	19	21	23	25	27	29	31
	H1M9568N	33	35	37	39	41	43	45	47
10	H4H9629P	49	51	53	55	57	59	61	63
	H4H9633P	65	67	69	71	73	75	77	79
	H4H9640P	81	83	85	87	89	91	93	95
	H4H9659P	97	99	101	103	105	107	109	111
	H4H9660P	113	115	117	119	121	123	125	127
15	H4H9662P	129	131	133	135	137	139	141	143
	H4H9663P	145	147	149	151	153	155	157	159
	H4H9664P	161	163	165	167	169	171	173	175
	H4H9665P	177	179	181	183	185	187	189	191
	H4H9666P	193	195	197	199	201	203	205	207
20	H4H9667P	209	211	213	215	217	219	221	223
	H4H9670P	225	227	229	231	233	235	237	239
	H4H9671P	241	243	245	247	249	251	253	255
	H4H9672P	257	259	261	263	265	267	269	271
	H4H9675P	273	275	277	279	281	283	285	287
	H4H9676P	289	291	293	295	297	299	301	303
	H1M9565N	307	309	311	313	315	317	319	321

Típicamente, los anticuerpos se mencionan según la siguiente nomenclatura: prefijo Fc (por ejemplo, "H1M" o "H4H"), seguido por un identificador numérico (por ejemplo, "9559", "9566" o "9629", tal como se muestra en la Tabla 1) seguido por un sufijo "P" o "N". Por lo tanto, de acuerdo con esta nomenclatura, un anticuerpo se puede indicar en la presente, por ejemplo, como H1M9559N," "H1M9566N," "H4H9629P," etc. Los prefijos H1M y H4H en las denominaciones de anticuerpos que se utilizan en la presente indican el isotipo de región Fc particular del anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo "H1M" tiene una Fc de IgG1 de ratón, mientras que un anticuerpo "H4H" tiene una Fc de IgG4 humana. Tal como comprenderán los expertos en la técnica, un anticuerpo con un isotipo de Fc en particular pueden convertirse en un anticuerpo con un isotipo de Fc distinto (por ejemplo, un anticuerpo con una Fc de IgG1 de ratón puede convertirse en un anticuerpo con una IgG4 humana, etc.), pero en todo caso, los dominios variables (inclusive las CDR) - que se indican mediante los identificadores numéricos que se muestran en la Tabla 1 - siguen siendo los mismo, y se espera que las propiedades de unión sean idénticas o sustancialmente similares sin importar la naturaleza del dominio Fc.

Ejemplo 2: Construcción de antagonistas de IL-33 (trampas de

IL-33)

Las trampas anti-IL-33 humanas se generaron tal como se describe en la publicación de patente estadounidense n.º 2014/0271642. La Tabla 3a establece un resumen de los
5 identificadores de secuencia de aminoácidos para los diversos componentes de las trampas de IL-33 y la Tabla 3b establece las secuencias de aminoácidos de longitud completa de las trampas.

Se construyeron cinco ejemplos de antagonistas de IL-33
10 distintos de la invención utilizando las técnicas biológicas moleculares estándar. El primer antagonista de IL-33 (hST2-hFc, SEQ ID NO:323) consiste en la región extracelular soluble de ST2 humana (SEQ ID NO:328) fusionada en su extremo C con el extremo N de una región Fc de IgG1 humana (SEQ ID
15 NO:332). El segundo antagonista de IL-33 (hST2-mFc, SEQ ID NO:324) consiste en la región extracelular soluble de ST2 humana (SEQ ID NO:328) fusionada en su extremo C con el extremo N de una región Fc de IgG2a de ratón (SEQ ID NO:333). El tercer antagonista de IL-33 (hST2-hIL1RAcP-mFc, SEQ ID NO:
20 325) consiste en una fusión en línea con ST2 humana (SEQ ID NO:328) en su extremo N, seguido de la región extracelular de IL-1RAcP humano (SEQ ID NO:330), seguido por una Fc de IgG2a de ratón (SEQ ID NO:333) en su extremo C. El cuarto antagonista de IL-33 (mST2-mIL1RAcP-mFc, SEQ ID NO: 326)

consiste en una fusión en línea con ST2 de ratón (SEQ ID NO:329) en su extremo N, seguido de la región extracelular de IL-1RAcP de ratón (SEQ ID NO:331), seguido de una Fc de IgG2a de ratón (SEQ ID NO:333) en su extremo C. El quinto

5 antagonista de IL-33 (hST2-hIL1RAcP-hFc, SEQ ID NO:327) consiste en una fusión en línea con ST2 humana de la SEQ ID NO: 328 en su extremo N, seguido de la región extracelular de IL-1RAcP humano (SEQ ID NO: 330) seguido de una Fc de IgG1 humana (SEQ ID NO: 332) en su extremo C. La Tabla 3a

10 establece una descripción resumida de los distintos antagonistas de IL-33 y sus partes constitutivas. La Tabla 3b establece las secuencias de aminoácidos de los antagonistas de IL-33 y sus partes constitutivas.

15

20

Tabla 3a: Resumen de los antagonistas de IL-33 y de las partes componentes

5	Antagonista de IL-33	Secuencia de aminoácidos de molécula antagonista total	Componente D1	Componente D2	Componente M
	hST2-hFc	SEQ ID NO:323	extracelular de ST2 humana (SEQ ID NO:328)	Ausente	Fc de IgG1 humana (SEQ ID NO:332)
10	hST2-mFc	SEQ ID NO:324	extracelular de ST2 humana (SEQ ID NO:328)	Ausente	Fc de IgG2a de ratón (SEQ ID NO:333)
15	hST2-hIL1RAcP-mFc	SEQ ID NO:325	extracelular de ST2 humana (SEQ ID NO:328)	extracelular de IL-1RAcP humano (SEQ ID NO:330)	Fc de IgG2a de ratón (SEQ ID NO:333)
20	mST2-mIL1RAcP-mFc	SEQ ID NO:326	extracelular de ST2 de ratón (SEQ ID NO:329)	extracelular de IL-1RAcP de ratón (SEQ ID NO:331)	Fc de IgG2a de ratón (SEQ ID NO:333)
	hST2-hIL1RAcP-hFc	SEQ ID NO: 327	extracelular de ST2 humana (SEQ ID NO:328)	extracelular de IL-1RAcP humano (SEQ ID NO:330)	Fc de IgG1 humana (SEQ ID NO:332)

Tabla 3b: Secuencias de aminoácidos

Identificado r	Secuencia
5 SEQ ID NO:323 (hST2-hFc)	KFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTVDWYYSQTNKSIPTQERNRVFASGQLL KFLPAAVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQSDCNVPDYLMYSTVSGSE KNSKIYCPTIDLYNWTAPLEWFKNCQALQGSRYRAHKSFLVIDNVMTE DAGDYT CKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSLFVPVIGAPAQNEIKEVEIGKNANLT CSACFGKGTQFLAAVLWQLNGTKITDFGEPRIQQEEGQNQSFSNGLACLDMLR IADVKEEDLLLQYDCLALNLHGLRRHTVRLSRKNPIDHHSDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
15 SEQ ID NO:324 (hST2-mFc)	KFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTVDWYYSQTNKSIPTQERNRVFASGQLL KFLPAAVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQSDCNVPDYLMYSTVSGSE KNSKIYCPTIDLYNWTAPLEWFKNCQALQGSRYRAHKSFLVIDNVMTE DAGDYT CKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSLFVPVIGAPAQNEIKEVEIGKNANLT CSACFGKGTQFLAAVLWQLNGTKITDFGEPRIQQEEGQNQSFSNGLACLDMLR IADVKEEDLLLQYDCLALNLHGLRRHTVRLSRKNPIDHHSEPRGPTIKCPPCK CPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFN NV EVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTI SKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELN YKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRT PGK

5

10

15

20

SEQ ID	KFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTVDWYYSQTNKSIPTQERNRVFASGQLLKFLPA
NO:325	AVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQSDCNVPDYLMYSTVSGSEKNSKIYCPTI
(hST2-	DLYNWTAPLEWFKNCQALQGSRYRAHKSFLVIDNVMTEADAGDYTCFKFIHNENGANYSVT
hIL1RAc	ATRSFTVKDEQGFSLFPVIGAPAQNEIKEVEIGKNANLTCSACFGKGTQFLAAVLWQLN
P-mFc)	GTKITDFGEPRIQQEEGQNSFSNGLACLDMLVRIADVKEEDLLLQYDCLALNLHGLRR
	HTVRLSRKNPIDHSSERCDDWGLDTMRQIQVFEDEPARIKCPLFEHFLKFNYSTAHSA
	GLTLIYWTRQDRDLEEPINFRLPENRISKEKDVLFWRPTLLNDTGNYTCMLRNTTYCS
	KVAFPLEVVQKDSFCNSPMKLPVHKLYIEYGIQRITCPNVDGYFPSSVKPTITWYMGCY
	KIQNFNNVIPEGMNLISFLIALISNNGNYTCVVITYPENGRTFHLTRTLTVKVVGSPKNAV
	PPVIHSPNDHVVEKEPGEELLIPCTVYFSFLMDSRNEVWWTIDGKKPDDITIDVTINE
	SISHSRTEDETRTQILSIKKVTSEDLKRSYVCHARSAKGEVAKAAVKQKVPAPRYTVE
	SGE PRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMLISLSPIVTCVVVDVSEDDP
	DVQISWVFNNEVHTAQQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPA
	PIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTEL
	NYKNTEPVLDSGYSFYMSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
SEQ ID	SKSSWGLENEALIVRCPRQGRSTYPVEWYYSDTNESIPTQKRNRIFVSRDLKFLPARV
NO:326	EDSGIYACVIRSPNLNKTGYLNVTIHKKPPSCNIPDYLMYSTVRGSDKNFKITCPTIDL
(mST2-	YNWTAPVQWFKNCALQEPRFRAHRSYLFIDNVTHDDEGDYTCQFTHAENGNYIVTAT
mIL1RAc	RSFTVEEKGFMSFPVITNPPYNHTMEVEIGKPASIACSACFGKGSFLADVLWQINKTV
P-mFc)	VGNFGEARIQEEEGRNESSNDMDCLTSVLRITGVTEKDLSEYDCLALNLHGMIRHTI
	RLRRKQPIDHRSERCDDWGLDTMRQIQVFEDEPARIKCPLFEHFLKYNYSTAHSSGLTL
	IYWTRQDRDLEEPINFRLPENRISKEKDVLFWRPTLLNDTGNYTCMLRNTTYCSKVAF
	PLEVVQKDSFCNSAMRFPVHKMYIEHGIHKITCPNVDGYFPSSVKPSVTWYKGCTEIVD
	FHNVLPEGMNLISFFIPLVSNNNGNYTCVVITYPENGRLFHLTRTVTVKVVGSPKDALPPQI
	YSPNDRVVVEKEPGEELVIPCKVYFSFIMDSHNEVWWTIDGKKPDDVTVDITINESVSY
	SSTEDETRTQILSIKKVTPEDLRNRYVCHARNTKGEAEQAAVKQKVIIPRYTVE SGE P
	RGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMLISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQI
	SWVFNNEVHTAQQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIER
	TISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKN
	TEPVLDSGYSFYMSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

5

10

15

20

SEQ	ID	KFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTVDWYYSQTNKSIPTQERNRVFASGQ
NO:327		LLKFLPAAVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQSDCNVPDYLMYSTV
(hST2-		SGSEKNSKIYCPTIDLYNWTAPLEWFKNCQALQGSRYRAHKSFLVIDNMTE
hIL1RAcP-		DAGDYTCFKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSLFVPVIGAPAQNEIKEVE
hFc)		IGKNANLTCSACFGKGTQFLAAVLWQLNGTKITDFGEPRIQQEEGQNQSFSN
		GLACLDMVLRIADVKEEDLLLQYDCLALNLHGLRRHTVRLSRKNPIDHHSSE
		RCDDWGLDTMRQIQVFEDEPARIKCPLFEHFLKFNYSTAHSAGLTLIWYWTR
		QDRDLEEPINFRLPENRISKEKDVLWFRPTLLNDTGNYTCMLRNTTYCSKVA
		FPLEVVQKDSCFNSPMKLPVHKLYIEYGIQRITCPNVDGYFPSSVKPTITWY
		MGCYKIQNFNNVIPEGMNLISFLIALISNNGNYTCVVVYPENGRTFHLTRTLT
		VKVVGSPKNAVPPVIHSPNDHVVEKEPGEELLIPCTVYFSFLMSRNEVWW
		TIDGKKPDDITIDVTINESISHSRTEDETRTQILSIKKVTSEDLKRSYVCHA
		RSAGEVAKAAKVQKVPAPRYTVEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
		KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
		YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
		PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
		FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ	ID	KFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTVDWYYSQTNKSIPTQERNRVFASGQ
NO:328		LLKFLPAAVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQSDCNVPDYLMYSTV
(dominio		SGSEKNSKIYCPTIDLYNWTAPLEWFKNCQALQGSRYRAHKSFLVIDNMTE
extracelul		DAGDYTCFKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSLFVPVIGAPAQNEIKEVE
ar de ST2		IGKNANLTCSACFGKGTQFLAAVLWQLNGTKITDFGEPRIQQEEGQNQSFSN
humana)		GLACLDMVLRIADVKEEDLLLQYDCLALNLHGLRRHTVRLSRKNPIDHHS
SEQ	ID	SKSSWGLENEALIVRCPRQGRSTYPVEWYYSDTNESIPTQKRNRIFVSRDRL
NO:329		KFLPARVEDSGIYACVIRSPNLNKTGYLNVTIHKKPPSCNIPDYLMYSTVRG
(dominio		SDKNFKITCPTIDLYNWTAPVQWFKNCKALQEPRFRAHRSYLFIDNVTHDDE
extracelul		GDYTCQFTHAENGNTNYIVTATRSFTVEEKGFMSFPVITNPPYNHTMEVEIGK
ar de ST2		PASIACSACFGKGSFLADVLWQINKTVVGNFGGEARIQEEEGRNESSSNDMD
de ratón)		CLTSVLRLITGVTEKDLSLEYDCLALNLHGMIRHTIRLRKQPIDHR

5

SEQ ID	SERCDDWGLDTMRQIQVFEDEPARIKCPLFEHFLKFNYSTAHSAGLTLIW
NO:330	YWTRQDRDLEEPINFRLPENRISKEKDVWFRPTLLNDTGNYTCMLRNTT
(dominio	YCSKVAFPLEVVQKDSCFNSPMKLPVHKLYIEYGIQRITCPNVDGYFPSS
extracelula	VKPTITWYMGCYKIQNFNVIPEGMNLISFLIALISNNGNYTCVVYPENG
r de	RTFHLTRTLTVKVVGSPKNAVPPVIHSPNDHVVEKEPGEELLIPCTVYF
IL1RAcP	SFLMDSRNEVWWTIDGKKPDDITIDVTINESISHSRTEDETRTQILSIKK
humana)	VTSEDLKRSYVCHARSAKGEVAKAAKVQKVPAPRYTVE
SEQ ID	SERCDDWGLDTMRQIQVFEDEPARIKCPLFEHFLKYNYSTAHSSGLTLIW
NO:331	YWTRQDRDLEEPINFRLPENRISKEKDVWFRPTLLNDTGNYTCMLRNTT
(dominio	YCSKVAFPLEVVQKDSCFN SAMRFPVHKMYIEHGIHKITCPNVDGYFPSS
extracelula	VKPSVTWYKGCTEIVDFHNVLPEGMNL SFFIPLVSNNGNYTCVVYPENG
r de	RLFHLTRTVTVKVVGSPKDALPPQIYSPNDRVVYEKEPGEELVIPCKVYF
IL1RAcP de	SFIMDSHNEVWWTIDGKKPDDVTVDITINESVSYSSSTEDETRTQILSIKK
ratón)	VTPEDLRRNYVCHARNTKGEAEQAAKVQKVI PPRTVE
SEQ ID	DKHTCPCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
NO:332	PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
(Fc de IgG1	CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
humana)	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
	NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID	EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVL MISLSPIVTCVVV
NO:333	DVSEDDPDVQISW FVNNEVHTAQ TQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWM
(Fc de	SGKEFKCKVNNKDL PAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVT
IgG2a de	LTCMVTD FMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEK
ratón)	KNWVERN SYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
SEQ ID	SITGISPITESLASLSTYNDQSITFALEDES YEIYVEDLKKDKKKDKVLL
NO:334	SYYESQHPSSES GDGVDGKMLMVTLSPTKDFWLQANNKEHSVELHKCEKP
(M.	LPDQAFFVLHNRSFNCVSFECKTDPGVFIGVDNHLALIKVDYSEN LGSE
fasciculari	NILFKLSEILEHHHHHH
s IL-33-	
6His)	

10

15

20

Ejemplo 3: Anticuerpos antagonistas de IL-4R

Los anticuerpos anti-IL-4R humana se generaron como se describe en la patente estadounidense n.º 7,608,693. El ejemplo de anticuerpo de IL-4R utilizado en el siguiente ejemplo es un anticuerpo de ratón específico para IL-4R de ratón y tiene las siguientes secuencias de aminoácidos: una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la SEQ ID NO: 335 y un dominio variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la SEQ ID NO: 336. El anticuerpo anti-IL-4R humana, mencionado en la presente como dupilumab, se une específicamente a IL-4R α y comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la SEQ ID NO: 337 y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la SEQ ID NO: 338, una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 1 (HCDR1) que comprende la SEQ ID NO: 339, una HCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 340, una HCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 341, una región determinante de la complementariedad de cadena ligera 1 (LCDR1) que comprende la SEQ ID NO: 342, una LCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 343 y una LCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 344. La cadena pesada de longitud completa de dupilumab se muestra como la SEQ ID NO 345 y la cadena ligera de longitud completa se muestra como la SEQ ID NO: 346.

Ejemplo 4: Un modelo de inflamación pulmonar grave y fibrosis inducidas por ácaro del polvo doméstico (HDM) crónico para estudiar el papel de IL-33 en la inflamación pulmonar - Comparación de eficacia de un anticuerpo anti-IL-33, un anticuerpo de IL-4R o una combinación de ambos

Las enfermedades inflamatorias crónicas de las vías respiratorias son una consecuencia de episodios recurrentes de inflamación de las vías respiratorias, de manera predominante debido a exposición reiterada a alérgenos y otros patógenos. En los seres humanos, dichas agresiones crónicas induce una amplia variedad de patologías que incluyen la infiltración pulmonar por células inmunitarias, aumento de la producción de citocina, producción de mucosa y deposición de colágeno (Hirota, (2013) Chest. 144(3):1026-32.; Postma, (2015), N Engl J Med., 373(13):1241-9). Este aumento de las citocinas inflamatorias e infiltrados de células inmunitarias, acompañado por una remodelación intensa de las vías respiratorias, lleva a un estrechamiento de las vías respiratorias, hiperreactividad a activadores inhalados, tales como alérgenos o patógenos, obstrucción de las vías respiratorias y pérdida de la función pulmonar.

Para determinar el efecto de la inhibición anti-IL-33 en un modelo in vivo relevante, se llevó a cabo un modelo de

remodelación e inflamación pulmonar grave y fibrosis inducidas por extracto de ácaro del polvo doméstico HDM crónico en ratones que eran homocigotos para la expresión de IL-33 humana en lugar de IL-33 de ratón (ratones IL-33 HumIn; véanse las publicaciones de patente estadounidense n.º 2015/0320021 and 2015/0320022). La exposición a extracto de HDM crónico induce inflamación pulmonar grave, lo cual da como resultado una infiltración pulmonar significativa, expresión de citocina y remodelación. Se comparó la eficacia del anticuerpo anti-IL-33, un anticuerpo de IL-4R α anti-ratón o una combinación de ambos en este modelo. El anticuerpo de IL-4R α anti-ratón utilizado en este estudio se denomina M1M1875N y comprende el par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR de las SEQ ID NO: 335/336. El anticuerpo anti-IL-33 utilizado en este estudio se denomina H4H9675P y comprende el par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR de las SEQ ID NO: 274/282.

A los ratones IL-33 HumIN se les administraron por vía nasal ya sea 50 μ g de extracto de ácaro del polvo doméstico (HDM; Greer, #XPB70D3A2.5) diluido con 20 μ L de 1X solución salina amortiguada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) o 20 μ L de 1X PBS durante 3 días por semana durante 15 semanas. A un segundo grupo de ratones IL-33 HumIN se le administraron 50 μ g de extracto de HDM diluido con 20 μ L de 1X PBS durante

3 días por semana durante 11 semanas, para evaluar la gravedad de la enfermedad al comienzo del tratamiento con anticuerpo. A cuatro grupos de ratones expuestos a HDM se les inyectó por vía subcutánea 25 mg/kg ya sea de anticuerpo anti-IL-33 H4H9675P, anticuerpo de IL-4R α anti-ratón M1M1875N, una combinación de ambos anticuerpos, o un anticuerpo de isotipo de control, comenzando después de 11 semanas de la exposición a HDM y después dos veces por semana hasta el final de la exposición a HDM (4 semanas de tratamiento con anticuerpo). En el día 108 del estudio, los ratones fueron sacrificados y se les extrajeron los pulmones. La dosificación experimental y el protocolo de tratamiento para los grupos de ratones se muestra en la Tabla 4.

15

20

Tabla 4: Dosificación experimental y el protocolo de tratamiento para los grupos de ratones

Grupo	Ratones	Exposición intranasal	Duración de la exposición intranasal	Anticuerpo
1	Ratones IL-33 HumIn	1X PBS	15 semanas	Ninguna
2	Ratones IL-33 HumIn	50 µg de HDM en 20 µL de 1X PBS	11 semanas	Ninguna
3	Ratones IL-33 HumIn	50 µg de HDM en 20 µL de 1X PBS	15 semanas	Ninguna
4	Ratones IL-33 HumIn	50 µg de HDM en 20 µL de 1X PBS	15 semanas	Anticuerpo de control de isotipo
5	Ratones IL-33 HumIn	50 µg de HDM en 20 µL de 1X PBS	15 semanas	Anticuerpo anti-IL-33 (H4H9675P)
6	Ratones IL-33 HumIn	50 µg de HDM en 20 µL de 1X PBS	15 semanas	Anticuerpo anti-IL-4Rα (M1M1875N)
7	Ratones IL-33 HumIn	50 µg de HDM en 20 µL de 1X PBS	15 semanas	Anticuerpo anti-IL-33 (H4H9675P) + Anticuerpo anti-IL-4Rα (M1M1875N)

Extracción de pulmones para el análisis de citocina:

Los niveles elevados de mediadores clave, tales como las citocinas prototípicas de tipo 2 IL-4, IL-5 e IL-13, así como las citocinas más características de las respuestas inmunitarias del tipo 1, tales como IL-1 β o TNF α se han relacionado con el desarrollo de enfermedades pulmonares en seres humanos (Gandhi, (2016) Nat Rev Drug Discov ene;15(1):35-50.; Barnes, (2008), Nat Rev Immunol, mar;8(3):183-92. Los niveles en el pulmón de estas citocinas inflamatorias se midieron en el presente estudio.

Después de la extracción de sangre, los lóbulos superior y medio del pulmón derecho de cada ratón se extrajeron y colocaron en tubos que contenían una solución de reactivo de extracción de proteína de tejido (1X reactivo T-PER; Pierce, #78510) complementada con 1X cóctel inhibidor de proteasa Halt (Thermo Scientific, #87786). Todas las etapas adicionales se llevaron a cabo en hielo. El volumen de reactivo T-PER (que contenía el cóctel inhibidor de proteasa) se ajustó para cada muestra para coincidir con una proporción de 1:7 (p/v) entre tejido y T-PER. Las muestras de tejido se separaron mecánicamente mediante el uso de TissueLyser II (Qiagen #85300). Los lisados resultantes se centrifugaron para sedimentar los desechos. Los sobrenadantes que contenían los extractos de proteína soluble se transfirieron a tubos

nuevos y se almacenaron a 4°C hasta su análisis posterior.

El contenido total de proteína en los extractos de proteína en el pulmón se midió mediante el uso de un ensayo Bradford. Para el ensayo, se colocaron en placas de 96 pocillos 10µL de muestras de extracto diluido por duplicado y se mezclaron con 200µL de 1X reactivo de tinte (Biorad, #500-0006). Se utilizaron diluciones en serie de albúmina de suero bovino (BSA; Sigma, #A7979), comenzando a 700µg/mL en 1X reactivo T-Per como estándar para determinar la concentración de proteína de los extractos. Después de una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 595nm en un lector de placa SpectraMax M5 de Molecular Devices. El análisis de los datos para determinar el contenido de proteína de extracto pulmonar total basado en el estándar de BSA se realizó mediante el uso del software GraphPad Prism™.

Las concentraciones de citocina en los extractos de proteína en el pulmón se midieron mediante el uso de un kit de inmunoensayo multiplexado de panel proinflamatorio 1 (ratón) (MesoScale Discovery, # K15048G-2) y un kit de inmunoensayo de ratón personalizado 6plex Multi-Spot® (MesoScale Discovery, #K152A41-4), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A grandes rasgos, se agregaron 50µL/pocillo de calibradores y muestras (diluidas con diluyente 41) a las

placas precubiertas con anticuerpos de captura y se incubaron a temperatura ambiente mientras se agitaban a 700 rpm durante 2 horas. Las placas se lavaron entonces 3 veces con 1X PBS que contenía Tween-20 al 0.05 % (p/v), seguido por la
 5 adición de 25µL de solución de anticuerpo de detección diluida con diluyente 45. Después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente con agitación, la placa se lavó 3 veces y se agregaron 150µL de 2X amortiguador de lectura a cada pocillo. La electroquimioluminiscencia se midió
 10 inmediatamente con un instrumento MSD Spector®. Se realizó el análisis de datos mediante el uso del software GraphPad Prism.

Cada concentración de citocina en los extractos de proteína total pulmonar de todos los ratones en cada grupo se
 15 normalizó al contenido de proteína total de los extractos medidos mediante el ensayo de Bradford, y se expresaron para cada grupo como promedio de pg de citocina por mg de proteínas en el pulmón totales (pg/mg de proteína en el pulmón, ± SD) tal como se muestra en la Tabla 5.

20

Análisis de citocinas pulmonares:

Tal como se muestra en la tabla 5, el nivel de citocinas y quimiocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-1β y MCP-1 liberadas en los pulmones de ratones IL-33 HumIN que recibieron HDM durante 15

semanas, con o sin tratamiento con anticuerpo de control de isotipo, fue significativamente mayor que en ratones IL-33 HumIn expuestos a 1X PBS sola. De manera similar, hubo una tendencia a un aumento de la liberación de las citocinas IL-13 y $\text{TNF}\alpha$ en los pulmones de ratones IL-33 que recibieron HDM durante 15 semanas. En contraste, hubo una reducción significativa en los niveles de IL-6, IL-13 y MCP-1 en los pulmones de ratones IL-33 HumIn tratados con una combinación de anticuerpos anti-IL-33 e IL-4R α anti-ratón durante al menos cuatro semanas de la exposición a HDM crónico en comparación con los ratones IL-33 HumIn a los que se les administró HDM con un anticuerpo de control de isotipo durante este período de tiempo. Hubo una tendencia a niveles reducidos de IL-4, IL-5, IL-1 β y $\text{TNF}\alpha$ en los pulmones de ratones IL-33 HumIn tratados con una combinación de anticuerpos anti-IL-33 e IL-4R α anti-ratón durante al menos cuatro semanas de la exposición a HDM crónico en comparación con los ratones IL-33 HumIn a los que se les administró HDM con un anticuerpo de control de isotipo durante este período de tiempo. Los efectos sobre las citocinas pulmonares observados con la combinación de anticuerpos anti-IL-33 e IL-4R α de anti-ratón fue mayor que el tratamiento con cualquiera de los anticuerpos solo.

Tabla 5: Concentración de citocina en extractos de proteínas en el pulmón

5	Grupo experimental	Promedio [IL-4] en extractos pulmonares (pg/mg de proteína en el pulmón) ($\pm$ SD)	Promedio [IL-5] en extractos pulmonares (pg/mg de proteína en el pulmón) ($\pm$ SD)	Promedio [IL-13] en extractos pulmonares (pg/mg de proteína en el pulmón) ($\pm$ SD)	Promedio [IL-6] en extractos pulmonares (pg/mg de proteína en el pulmón) ($\pm$ SD)	Promedio [IL-1 β] en extractos pulmonares (pg/mg de proteína en el pulmón) ($\pm$ SD)	Promedio [TNF α] en extractos pulmonares (pg/mg de proteína en el pulmón) ($\pm$ SD)	Promedio [MCP-1] en extractos pulmonares (pg/mg de proteína en el pulmón) ($\pm$ SD)
15	1. Exposición a 1X PBS (n=5)	0.13 ($\pm$ 0.17)	0.80 ($\pm$ 1.41)	ND	4.75 ($\pm$ 3.39)	1.97 ($\pm$ 1.67)	2.86 ($\pm$ 1.01)	4.12 ($\pm$ 1.12)
20	2. Exposición a HDM 11 semanas (n=4)	5.71 ($\pm$ 3.76) *	7.31 ($\pm$ 3.67)	0.20 ($\pm$ 0.03)	293.1 ($\pm$ 139.3) *	181.8 ($\pm$ 131.0) *	17.39 ($\pm$ 8.90)	43.06 ($\pm$ 24.21)
	3. Exposición a HDM 15 semanas (n=4)	2.70 ($\pm$ 1.71)	5.13 ($\pm$ 3.20)	0.19 ($\pm$ 0.03)	308.3 ($\pm$ 390.1)	51.79 ($\pm$ 16.97)	15.38 ($\pm$ 8.11)	105.6 ($\pm$ 106.5) *

5	4. Exposición a HDM 15 semanas + anticuerpo de isotipo de control (n=4)	5.46 (±3.38) **	7.00 (±4.50)) *	0.22 (±0.02))	395.0 (±270.1) **	162.3 (±166.5) **	19.57 (±14.81)	141.7 (±126.3) **
	5. Exposición a HDM 15 semanas + anticuerpo anti-IL-33 (n=5)	1.15 (±1.38)	1.93 (±1.90))	0.20 (±0.02))	136.8 (±164.1)	122.9 (±194.1)	17.05 (±4.48) *	16.64 (±6.40)
	6. Exposición a HDM 15 semanas + anticuerpo de IL-4Rα anti-ratón (n=5)	2.88 (±2.43)	13.13 (±12.81) **	0.16 (±0.03))	18.24 (±12.43)	26.73 (±20.94)	7.85 (±4.89)	11.63 (±8.69)
	7. Exposición a HDM 15 semanas + anticuerpo anti-IL-33 + anticuerpo de IL-4Rα anti-ratón (n=5)	0.47 (±0.13)	0.73 (±0.37))	0.10 (±0.05)) ††	7.46 (±2.52)) †	3.722 (±1.59)	3.07 (±1.34)	4.62 (±1.27) ††

Nota: Se indica la significancia estadística determinada mediante ANOVA de una vía de Kruskal-Wallis con prueba post hoc de comparaciones múltiples de Dunn (*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, en comparación con los grupos 1: ratones IL33 HumIn, exposición a solución salina; † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, en comparación con el grupo 4: ratones IL33 Humin, exposición a

HDM de 15 semanas + anticuerpo de isotipo de control). ND: No determinado.

Extracción de pulmones para el análisis de expresión génica:

5 Después de extraer la sangre, se retiró el lóbulo accesorio del pulmón derecho de cada ratón, se colocó en tubos que contenían 400 μ L de RNA Later (Ambion, #AM7020) y se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento. Los tejidos se homogeneizaron en TRIzol y se utilizó cloroformo para la

10 separación de fase. La fase acuosa, que contenía el ARN total, se purificó mediante el uso de MagMAX™-96 para el kit de aislamiento total de ARN de micromatrices (Ambion de Life Technologies, #AM1839) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. El ADN genómico se retiró mediante el uso de

15 amortiguador DNasa MagMAX™Turbo™ y DNasa TURBO del kit MagMAX listado anteriormente. El ARNm (hasta 2.5 μ g) se transcribió de forma inversa en ADNc mediante el uso de SuperScript® VILO™ Master Mix (Invitrogen de Life Technologies, #11755500). El ADNc se diluyó hasta 2ng/ μ L y se amplificaron

20 10 ng de ADNc con TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems de Life Technologies, #4369542) y las sondas relevantes (Life Technologies; *B2m* de ratón: Mm00437762_m1; *I14* de ratón: Mm00445259_m1; *I15* de ratón: Mm00439646_m1; *I113* de ratón: Mm00434204_m1; *I19* de ratón: Mm00434305_m1;

Il6 de ratón: Mm00446190_m1; *Ccl2* de ratón: Mm00441242_m1;
Ccl11 de ratón: Mm00441238_m1 ; *Ccl24* de ratón:
Mm00444701_m1; *Tnf* de ratón: Mm00443258_m1; *Tgfb1* de ratón:
Mm01178820_m1; *Il1rl1* de ratón: Mm00516117_m1; *Il13ra2* de
5 ratón: Mm00515166_m1; *Col15a1* de ratón: Mm00456584_m1;
Col24a1 de ratón: Mm01323744_m1;) mediante el uso del sistema
de detección de secuencias ABI 7900HT (Applied Biosystems).
B2m se utilizó como genes de control interno para normalizar
cualquier diferencia de entrada de ADNc. El grupo de
10 referencia utilizado para la normalización de todas las
muestras fue el promedio de las muestras del Grupo 1
("exposición a 1XPBS"). La expresión de cada gen se normalizó
a la expresión de *B2m* dentro de la misma muestra y se expresó
en relación con su expresión normalizada en el grupo de
15 referencia (promedio $\pm$ SD), tal como se muestra en la tabla 6.

Análisis de expresión génica en el pulmón

Tal como se muestra en la tabla 6, el nivel de expresión de
las citocinas, quimiocinas y genes de colágeno *Il4*, *Il13*,
20 *Il6*, *Ccl2*, *Tgfb1*, *Il13ra2* y *Col24a1* en los pulmones de
ratones IL-33 HumIN que recibieron HDM durante 15 semanas,
con o sin tratamiento con anticuerpo de control de isotipo,
aumentó significativamente en comparación con ratones IL-33
HumIn expuestos a 1X PBS sola. De manera similar, hubo una

tendencia a un aumento de la expresión de los genes *Il5*, *Il9*, *Ccl11*, *Ccl24*, *Tnf*, *Il1rl1* y *Col15a1* en los pulmones de ratones IL-33 HumIn que recibieron HDM durante 15 semanas.

En contraste, hubo una reducción significativa en los niveles
5 de expresión de *Il6*, *Ccl2*, *Ccl11* y *Ccl24* en los pulmones de ratones IL-33 HumIn tratados con una combinación de anticuerpos anti-IL-33 e IL-4R α anti-ratón durante al menos cuatro semanas de la exposición a HDM crónico en comparación con los ratones IL-33 HumIn a los que se les administró HDM
10 con un anticuerpo de control de isotipo durante este período de tiempo. Hubo una tendencia a niveles reducidos de expresión de *Il4*, *Il5*, *Il13*, *Il9*, *Tnf*, *Tgfb1*, *Il1rl1*, *Il13ra2*, *Col15a1* y *Col24a1* en ratones tratados con una combinación de anticuerpos anti-IL-33 e IL-4R α anti-ratón
15 durante al menos cuatro semanas de la exposición a HDM crónico en comparación con los ratones IL-33 HumIn a los que se les administró HDM con un anticuerpo de control de isotipo durante este período de tiempo. Los efectos sobre la expresión génica observados con la combinación de anticuerpos
20 anti-IL-33 e IL-4R α anti-ratón fue mayor que el tratamiento con cualquiera de los anticuerpos solo.

Tabla 6: Expresión génica (TaqMan) en pulmones de ratón.

5	Grupo experimental	Promedio en relación con la expresión de <i>Il14</i> en el pulmón (±SD)	Promedio en relación con la expresión de <i>Il15</i> en el pulmón (±SD)	Promedio en relación con la expresión de <i>Il13</i> en el pulmón (±SD)	Promedio en relación con la expresión de <i>Il19</i> en el pulmón (±SD)	Promedio en relación con la expresión de <i>Il16</i> en el pulmón (±SD)	Promedio en relación con la expresión de <i>Ccl2</i> en el pulmón (±SD)	Promedio en relación con la expresión de <i>Ccl11</i> en el pulmón (±SD)	Promedio en relación con la expresión de <i>Ccl24</i> en el pulmón (±SD)
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
		Exposición a 1X PBS (n=5)	Exposición a HDM 11 semanas (n=4)	Exposición a HDM 15 semanas (n=4)					
		1.03 (±0.28)	12.78 (±8.45) *	6.27 (±3.39)	4.51 (±7.59)	15.91 (±34.81)	8.92 (±4.55)	22.61 (±13.37) *	4.58 (±1.91)
10		1.03 (±0.28)	12.78 (±8.45) *	6.27 (±3.39)	4.51 (±7.59)	15.91 (±34.81)	8.92 (±4.55)	22.61 (±13.37) *	4.58 (±1.91)
		1.05 (±0.33)	15.44 (±12.02)						
15		1.05 (±0.33)	15.44 (±12.02)						
20									

5	4. Exposición a HDM 15 semanas + anticuerpo de isotipo de control (n=4)	10.98 (±5.4 6) *	5.50 (±3.16)	92.51 (±75. 96) *	19.51 (±10. 29)	13.80 (±6.9 8) **	24.53 (±9.1 3) **	12.14 (±7.8 2)	12.41 (±8.7 3)
10	5. Exposición a HDM 15 semanas + anticuerpo anti-IL-33 (n=5)	2.80 (±3.1 1)	1.74 (±1.11)	12.91 (±12. 93)	0.00 (±0.0 0)	3.87 (±3.0 0)	5.20 (±2.4 4)	6.21 (±3.5 5)	1.45 (±2.0 9)
15	6. Exposición a HDM 15 semanas + anticuerpo de IL-4Rα anti-ratón (n=5)	1.87 (±1.0 3)	7.98 (±6.52)	69.56 (±66. 86) *	63.50 (±92. 04)	2.77 (±1.3 9)	2.97 (±1.8 6)	1.00 (±0.1 8)	0.44 (±0.3 4)
20	7. Exposición a HDM 15 semanas + anticuerpo anti-IL-33 + anticuerpo de IL-4Rα anti-ratón (n=5)	1.37 (±0.3 5)	1.56 (±0.97)	9.34 (±3.1 0)	0.57 (±1.2 7)	1.04 (±0.3 1) ††	1.08 (±0.2 4) †† s	0.72 (±0.2 8) †	0.15 (±0.1 0) ††

Continuación de Tabla 6: Expresión génica (TaqMan) en pulmones de ratón.

5	Grupo experimental	Promedio en relación con la expresión de <i>Tnf</i> en el pulmón (±SD)	Promedio en relación con la expresión de <i>Tgfb1</i> en el pulmón (±SD)	Promedio en relación con la expresión de <i>Il1r11</i> en el pulmón (±SD)	Promedio en relación con la expresión de <i>Il13ra2</i> en el pulmón (±SD)	Promedio en relación con la expresión de <i>Col15a1</i> en el pulmón (±SD)	Promedio en relación con la expresión de <i>Col24a1</i> en el pulmón (±SD)
10	1. Exposición a 1X PBS (n=5)	1.02 (±0.24)	1.00 (±0.11)	1.11 (±0.58)	1.59 (±1.96)	1.00 (±0.10)	1.02 (±0.16)
15	2. Exposición a HDM 11 semanas (n=4)	1.45 (±0.41)	1.40 (±0.27)	3.03 (±0.88) *	48.43 (±34.21)	2.75 (±0.96)	24.55 (±7.97) **
	3. Exposición a HDM 15 semanas (n=4)	1.58 (±0.43)	1.32 (±0.33)	2.53 (±0.79) *	32.07 (±13.45)	3.00 (±1.22)	17.25 (±5.29) *
20	4. Exposición a HDM 15 semanas + anticuerpo de isotipo de control (n=4)	1.59 (±0.78)	1.37 (±0.12) *	3.45 (±1.48) *	52.02 (±40.63)	3.80 (±0.96) *	23.58 (±6.18) ***

5	5. Exposición a HDM 15 semanas + anticuerpo anti-IL- 33 (n=5)	1.38 (±0.27)	1.22 (±0.24)	0.99 (±0.47)	13.54 (±12.25)	1.64 (±0.3 0)	10.58 (±5.4 2)
10	6. Exposición a HDM 15 semanas + anticuerpo de IL- 4Rα anti-ratón (n=5)	1.00 (±0.25)	1.13 (±0.20)	3.38 (±1.97)	1.89 (±0.59)	1.24 (±0.2 8)	7.08 (±4.5 6)
15	7. Exposición a HDM 15 semanas + anticuerpo anti-IL- 33 + anticuerpo de IL-4Rα anti-ratón (n=5)	0.68 (±0.08) §	1.09 (±0.12)	1.12 (±0.57)	1.89 (±0.27)	0.74 (±0.2 1) †† §	1.76 (±0.1 5) †

Nota: Se indica la significancia estadística determinada mediante ANOVA de una vía de Kruskal-Wallis con prueba post hoc de comparaciones múltiples de Dunn (*= p<0.05, **= p<0.01, ***= p<0.01, en comparación con los grupos 1: ratones IL33 HumIn, exposición a solución salina; §p<0.05, §§p<0.01, en comparación con el grupo 3: ratones IL33 Humin, exposición a HDM de 15 semanas; †p<0.05, ††p<0.01, en comparación con el grupo 4: ratones IL33 Humin, exposición a HDM de 15 semanas +

anticuerpo de isotipo de control).

Extracción de pulmones para análisis de infiltrado celular pulmonar

5 La infiltración pulmonar por células inmunitarias se observa en múltiples enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias, inclusive asma y EPOC. La inflamación pulmonar neutrofílica se ha asociado con una función pulmonar disminuida y remodelación grave del tejido en pacientes con
10 asma (Wenzel et ál., (2012), Nat Med 18(5):716-725) y con un aumento del daño pulmonar en pacientes con EPOC (Meijer, et ál., (2013), Expert Rev. Clin. Immunol. 9(11):1055-1068). La inflamación pulmonar eosinofílica es una característica distintiva de la inflamación tipo 2 usualmente observada en
15 enfermedades atópicas (Jacobsen, et ál., (2014), Clin. Exp., Allergy, 44(9):1119-1136). En seres humanos, se observaron proporciones elevadas entre CD4/CD8 en pacientes con enfermedades pulmonares granulomatosas y otras afecciones inflamatorias crónicas (Costabel, et ál., (1997), Eur. Respir. J. 10(12):2699-2700; Guo, et ál., (2011), Ann. Clin. Biochem, 48(Pt4):344-351). Se utilizó citometría de flujo en el presente estudio para determinar el nivel de infiltración celular en los pulmones de ratones expuestos a HDM.
20 Después de extraer la sangre, se retiró el lóbulo caudal del

pulmón derecho de cada ratón, se cortó en cubos que tenían un tamaño de aproximadamente 2 a 3 mm y luego se colocaron en un tubo que contenía 20 µg/mL de solución de DNasa (Roche, #10104159001) y 0.7 U/mL de Liberase TH (Roche, #05401151001) diluida en solución salina balanceada de Hank (HBSS, por sus siglas en inglés) (Gibco, #14025), que se incubó en un baño de agua a 37°C durante 20 minutos y se sometió a vórtice cada 5 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de ácido etilendiamintetraacético (EDTA, Gibco, #15575) a una concentración final de 10mM. Cada pulmón se disoció de forma subsiguiente mediante el uso de un gentleMACS dissociator® (Miltenyi Biotec, #130-095-937), luego se filtró a través de un filtro de 70 µm y se centrifugó. El sedimento pulmonar resultante se volvió a suspender en 1 mL de 1X de amortiguador de lisado de eritrocitos (Sigma, #R7757) para retirar los eritrocitos. Después de incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente, se agregaron 3 mL de 1X DMEM para desactivar el amortiguador de lisado de eritrocitos. Las suspensiones celulares entonces se centrifugaron y los sedimentos celulares resultantes se volvieron a suspender en 5 mL de amortiguador MACS (autoMACS Running Buffer; Miltenyi Biotec, #130-091-221). Las muestras resuspendidas se filtraron a través de un filtro de 70 µm y se colocaron 1×10^6 células por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo en

forma de V. Las células entonces se centrifugaron y los sedimentos se lavaron en 1X PBS. Después de una segunda centrifugación, los sedimentos celulares se volvieron a suspender en 100µL de tinte LIVE/DEAD® Fixable Blue Dead Cell Stain (Life Technologies, # L23105) diluido a 1:500 en 1X PBS para determinar la viabilidad celular y se incubaron durante 20 minutos a tecnología, mientras se protegían de la luz. Después de un lavado en 1X PBS, se incubaron las células en una solución de amortiguador MACS que contenía 10 µg/mL de bloque Fc de CD16/CD32 anti-ratón de rata purificado (clon: 2.4G2; BD Biosciences, #553142) durante 10 minutos a 4 °C. Las células se incubaron en 2x de mezcla de anticuerpo adecuada (descrita en la Tabla 7) diluida en amortiguador MACS durante 30 minutos a 4 °C, mientras se protegían de la luz. Después de la incubación del anticuerpo, las células se lavaron dos veces en amortiguador MACS, se volvieron en BD CytoFix (BD Biosciences, #554655) y entonces se incubaron durante 15 minutos a 4 °C mientras se protegían de la luz. Las células se lavaron posteriormente, se volvieron a suspender en amortiguador MACS y se transfirieron a tubos BD FACS (BD Biosciences, #352235) para analizar los infiltrados celulares mediante citometría de flujo.

Los linfocitos T CD4 y CD8 se definieron como células que eran CD45⁺, SSC^{Lo}, FSC^{Lo}, CD3⁺, CD19⁻, CD4⁺, CD8⁻ vivas y CD45⁺,

SSC^{Lo}, FSC^{Lo}, CD3⁺, CD19⁻, CD4⁻, CD8⁺, vivas, respectivamente. Los linfocitos T CD4 activados se definieron como células que eran CD45⁺, SSC^{Lo}, FSC^{Lo}, CD3⁺, CD19⁻, CD4⁺, CD8⁻ y CD69⁺ vivas. Los linfocitos T CD8 activados se definieron como células que

5 eran CD45⁺, SSC^{Lo}, FSC^{Lo}, CD3⁺, CD19⁻, CD4⁻, CD8⁺, and CD69⁺ vivas. Los linfocitos B activados se definieron como células que eran, CD45⁺, SSC^{Lo}, FSC^{Lo}, CD3⁻, CD19⁺ y CD69⁺ vivas. Los linfocitos T ST2⁺ CD4⁺ activados se definieron como células que eran CD45⁺, SSC^{Lo}, FSC^{Lo}, CD3⁺, CD19⁻, ST2⁺ y CD4⁺ vivas.

10 Los eosinófilos se definieron como CD45⁺, GR1⁻, CD11c^{Lo}, SiglecF^{Hi} vivas. Los macrófagos alveolares se definieron como CD45⁺, GR1⁻, CD11c^{Hi}, SiglecF^{Hi} vivas. Los datos para las células activadas se expresaron como frecuencia de células activadas (CD69⁺) dentro de la población original (CD4, $\pm$

15 SD). Los datos para linfocitos T ST2⁺ CD4⁺ se expresan como frecuencias de linfocitos T (definidos como células que eran CD45⁺, SSC^{Lo}, FSC^{Lo}, CD3⁺ y CD19⁻ vivas). Los datos de eosinófilos y macrófagos alveolares se expresan como frecuencias de células vivas. La proporción entre linfocitos

20 T CD4/CD8 se calculó como la proporción de la frecuencia de linfocitos T CD4 respecto a la de linfocitos T CD8 dentro de la población viva. Todos los datos se muestran en la Tabla 8.

Tabla 7: Anticuerpos utilizados para análisis de citometría de flujo

5	Anticuerpo	Fluorocromo	Fabricante	Número de catálogo	Dilución final
	CD45.2	PerCP-Cy5.5	eBioscience	45-0454	1/800
	Siglec-F	BV 421	BD	562681	1/200
10	F4/80	APC	eBioscience	17-4801-82	1/200
	Ly6G	BUV395	BD	563978	1/200
	Ly6C	PE-Cy7	BD	560593	1/100
15	CD11c	PE	eBioscience	12-0114-82	1/200
	CD11b	FITC	eBioscience	53-0112-82	1/200
	CD19	BV650	BD	562701	1/400
20	CD3	PE-Cy7	BD	552774	1/200
	CD4	BV421	BioLegend	100438	1/200
	CD8	BUV 395	BD	563786	1/400
	NKp46 (CD335)	FITC	eBioscience	11-3351	1/800
	CD69	PE	eBioscience	12-0691	1/200
	CD25	BV510	BioLegend	102042	1/200
	ST2	APC	BioLegend	145306	1/200

Análisis de infiltrado celular pulmonar

Tal como se muestra en la tabla 8, la frecuencia de eosinófilos, linfocitos B activados, linfocitos CD8 activados, linfocitos T ST2+Cd4+ y la proporción entre linfocitos T CD4/CD8 en los pulmones de ratones IL-33 HumIN que recibieron HDM durante 15 semanas, con o sin tratamiento con anticuerpo de control de isotipo, fue significativamente mayor que en ratones IL-33 HumIn expuestos a 1X PBS sola. De manera similar, hubo una tendencia a un aumento de la frecuencia de linfocitos T CD4 activados en los pulmones de ratones IL-33 que recibieron HDM durante 15 semanas. Hubo una tendencia a una frecuencia disminuida de macrófagos alveolares detectados mediante citometría de flujo en los pulmones de ratones IL-33 HumIn que recibieron HDM durante 15 semanas en ausencia o presencia de un tratamiento con anticuerpo de control de isotipo. La frecuencia de macrófagos alveolares aumentó significativamente en los pulmones de ratones IL-33 HumIn tratados con una combinación de anticuerpos anti-IL-33 e IL-4R α anti-ratón durante al menos cuatro semanas de la exposición a HDM crónico en comparación con los ratones IL-33 HumIn a los que se les administró HDM con un anticuerpo de control de isotipo durante este período

de tiempo. De manera similar, hubo una tendencia a una frecuencia reducida de eosinófilos, linfocitos T CD4 y CD8 activados, linfocitos B activados, linfocitos T ST2+CD4+ así como la proporción entre linfocitos T CD4/CD8 en los pulmones de ratones tratados con una combinación de anticuerpos anti-IL-33 e IL-4R α anti-ratón durante al menos cuatro semanas de la exposición a HDM crónico en comparación con los ratones IL-33 HumIn a los que se les administró HDM con un anticuerpo de control de isotipo durante este período de tiempo. Los efectos sobre la frecuencia de eosinófilo, macrófagos alveolares, linfocitos T CD8 activados, linfocitos T ST2+CD4+ y la proporción entre linfocitos T CD4/CD8 en el pulmón observados para la combinación de anticuerpos anti-IL-33 e IL-4R α anti-ratón muestran una tendencia a una mayor eficacia que el tratamiento con cualquiera de los anticuerpos solo.

Tabla 8: Frecuencia de infiltración celular pulmonar según se determina mediante citometría de flujo

5	Grupo experimental	Frecuencia promedio de eosinófilos en la población viva ($\pm$ SD)	Frecuencia promedio de macrófagos alveolares en la población viva ($\pm$ SD)	Proporción promedio entre linfocitos T CD4/CD8 ($\pm$ SD)	Frecuencia promedio de células activadas en la población de linfocitos T CD4 ($\pm$ SD)	Frecuencia promedio de células activadas en la población de linfocitos T CD8 ($\pm$ SD)	Frecuencia promedio de células activadas en la población de linfocitos B ($\pm$ SD)	Frecuencia promedio de ST2+CD4 + en la población de linfocitos T ($\pm$ SD)
10								
15	1. Exposición a 1X PBS (n=5)	1.45 ($\pm$ 0.92)	5.05 ($\pm$ 1.64)	3.00 ($\pm$ 1.48)	13.12 ($\pm$ 9.89)	3.26 ($\pm$ 1.64)	0.39 ($\pm$ 1.17)	3.25 ($\pm$ 4.15)
20	2. Exposición a HDM 11 semanas (n=4)	17.08 ($\pm$ 3.94) *	2.34 ($\pm$ 0.93)	6.42 ($\pm$ 2.71)	49.95 ($\pm$ 8.76)	9.58 ($\pm$ 7.44)	4.67 ($\pm$ 1.47) **	32.60 ($\pm$ 12.23))
	3. Exposición a HDM 15 semanas (n=4)	15.40 ($\pm$ 3.99) *	4.92 ($\pm$ 1.55)	6.95 ($\pm$ 0.71) **	58.53 ($\pm$ 5.76)	15.68 ($\pm$ 3.03) *	3.70 ($\pm$ 1.44) *	37.33 ($\pm$ 8.98) *

5	4. Exposición a HDM 15 semanas + anticuerpo de isotipo de control (n=4)	15.00 (±3.35) *	2.33 (±1.60)	7.49 (±1.28) *	57.75 (±7.64)	14.59 (±3.82)	3.90 (±1.48) *	37.96 (±16.71) *) *
	5. Exposición a HDM 15 semanas + anticuerpo anti-IL-33 (n=5)	8.51 (±7.52)	7.44 (±4.18)	4.03 (±1.28)	48.22 (±5.66)	13.86 (±5.21)	1.72 (±0.72)	19.24 (±5.72)
	6. Exposición a HDM 15 semanas + anticuerpo de IL-4Rα anti-ratón (n=5)	12.30 (±7.83)	9.93 (±5.18)	5.56 (±2.22)	53.42 (±6.52)	13.11 (±6.26)	2.14 (±1.23)	35.01 (±9.83) *
	7. Exposición a HDM 15 semanas + anticuerpo anti-IL-33 + anticuerpo de IL-4Rα anti-ratón (n=5)	3.78 (±1.60)	14.64 (±3.86) [†]	2.96 (±0.93)	42.52 (±9.79)	7.90 (±1.30)	1.74 (±0.91)	11.78 (±3.73)

Nota: Se indica la significancia estadística determinada mediante ANOVA de una vía de Kruskal-Wallis con prueba post hoc de comparaciones múltiples de Dunn (*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, en comparación con los grupos 1: ratones IL33 HumIn, exposición a solución salina; † $p < 0.05$, en comparación con el grupo 4: ratones IL33 Humin, exposición a HDM de 15 semanas + anticuerpo de isotipo de control).

Extracción de pulmón para la cuantificación de histopatología:

El patrón inflamatorio observado en este modelo está acompañado por cambios estructurales extendidos y graves en los pulmones expuestos a HDM, con evidencia de metaplasia de células caliciformes, aumentos de la deposición de colágeno subepitelial y consolidación pulmonar significativa. Estas patologías son características conocidas de las enfermedades respiratorias inflamatorias humanas que contribuyen a la disminución de la función pulmonar y a la hiperreactividad de las vías respiratorias (James, (2007) Eur Respir J., jul;30(1):134-55; Jeong, (2007) Radiographics may-jun;27(3):617-37).

Después de extraer la sangre, los pulmones izquierdos se retiraron y colocaron en placas que contenían 3 mL de solución de paraformaldehído al 4 % (p/v) (Boston

Bioproducts, # BM-155) en 1X solución salina amortiguada con fosfato y se almacenó a temperatura ambiente durante 3 días. Las muestras de pulmón se colocaron en envases y se transfirieron a tubos que contenían etanol al 70 % para análisis histológico. Las muestras se enviaron a Histoserv, Inc (Germantown, MD) para embeberlas en parafina, cortarlas en secciones y teñirlas mediante técnica Schiff (PAS) o hematoxilina y eosina (H&E).

Cuantificación de metaplasia de células caliciformes:

La metaplasia de células caliciformes e hipersecreción de mucosa son características distintivas de muchas enfermedades pulmonares, inclusive el asma, enfermedad obstructiva crónica y fibrosis quística (Boucherat, (2013) Exp Lung Res. 2013 may-jun;39(4-5):207-16). La producción excesiva de mucosa lleva a la obstrucción de las vías respiratorias y produce diversos resultados importantes, tales como la función pulmonar, la calidad de vida relacionada con la salud, exacerbaciones, hospitalizaciones y mortalidad en seres humanos (Ramos, FL, et ál., (2014), Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, ene. 24; 9:139-150). Las células caliciformes PAS positivas y células epiteliales totales se contaron en una longitud de milímetros del bronquio principal. La metaplasia de células caliciformes se expresa como la frecuencia de células PAS positivas en un milímetro de epitelio bronquial

(%, $\pm$ SD) tal como se muestra en la Tabla 9.

Cuantificación de la consolidación pulmonar:

La "consolidación pulmonar" se define como la acumulación de material sólido o líquido en el espacio alveolar. La consolidación pulmonar es un criterio de valoración compuesto que refleja posiblemente la combinación de infiltrado celular, hiperplasia y producción de mucosa, utilizado en la presente como una medición de macropatología. La fracción del área pulmonar ocupada por los cuerpos de cristal se cuantificó en secciones de pulmón embebidas en parafina, teñidas con Movat pentacrómica, mediante el uso del software ImageJ (NIH, Bethesda, MD). Mediante el uso de función de análisis de partículas, se midieron el área pulmonar total en la sección, así como el área consolidada en la sección. La fracción de área pulmonar consolidación está dada por la proporción entre ambas mediciones, tal como se muestra en la Tabla 9.

Cuantificación de fibrosis subepitelial

La "fibrosis subepitelial" se define como un exceso de deposición de colágeno intersticial debajo del epitelio pulmonar (Redington, et ál., (1997), Thorax, abril; 52(4):310-312). Se ha observado que un aumento de la fibrosis subepitelial está específicamente asociado con el asma en seres humanos (Boulet, et ál., (1997) Chest, julio;

112(1):45-52; James, AL and Wenzel, S., (2007), Eur Respir J, julio, 30(1):134-155). En el presente modelo, la fibrosis subepitelial se midió en secciones de pulmón embebidas en parafina y teñidas con Masson tricrómica, mediante el uso del software HaLo (Indica Labs, NM). Mediante el uso de la herramienta de "espesor de capa", se registró el espesor de la capa de colágeno debajo del epitelio bronquial múltiples veces, con intervalos de alrededor de 30 μm , a lo largo de un milímetro del bronquio principal. La fibrosis subepitelial se expresa como el espesor promedio de la capa de colágeno debajo del epitelio (μm , $\pm$ SD) tal como se muestra en la Tabla 9.

Análisis de histopatología del pulmón

Tal como se muestra en la Tabla 9, hubo una tendencia a un aumento de metaplasia de células caliciformes en los pulmones de ratones IL-33 HumIN que recibieron HDM durante 15 semanas, con o sin tratamiento con anticuerpo de control de isotipo en comparación con ratones IL-33 HumIn expuestos a 1X PBS sola. De manera similar, hubo un aumento significativo en la consolidación pulmonar, así como el espesor de colágeno subepitelial en ratones IL-33 HumIn que recibieron HDM durante 15 semanas.

En contraste, hubo una tendencia a una reducción de

metaplasia de células caliciformes y espesor de colágeno subepitelial, y una reducción significativa de la consolidación pulmonar en ratones IL-33 HumIn tratados con una combinación de anticuerpos anti-IL-33 e IL-4R α anti-ratón durante al menos cuatro semanas de la exposición a HDM crónico en comparación con los ratones IL-33 HumIn a los que se les administró HDM con un anticuerpo de control de isotipo durante este período de tiempo. Los efectos sobre la metaplasia de células caliciformes, consolidación pulmonar y espesor de colágeno subepitelial observados para la combinación de anticuerpos anti-IL-33 e IL-4R α anti-ratón presentaron una tendencia a una mayor eficacia en comparación con el tratamiento con cualquiera de los anticuerpos de manera individual.

15

20

Tabla 9: Cuantificación de la histopatología en pulmones de ratón

5	Grupo experimental	Metaplasia de células caliciformes (% de células PAS positivas) ($\pm$ SD)	Consolidación pulmonar promedio (% $\pm$ SD)	Espesor de colágeno subepitelial promedio (μ m) ($\pm$ SD)
	1. Exposición a 1X PBS (n=5)	32.94 ($\pm$ 43.61)	6.97 ($\pm$ 3.72)	25.90 ($\pm$ 4.00)
10	2. Exposición a HDM 11 semanas (n=4)	59.98 ($\pm$ 39.01)	70.70 ($\pm$ 12.94)	81.76 ($\pm$ 25.37) *
	3. Exposición a HDM 15 semanas (n=4)	92.15 ($\pm$ 10.16)	83.21 ($\pm$ 3.65) **	82.12 ($\pm$ 23.04) *
15	4. Exposición a HDM 15 semanas + anticuerpo de isotipo de control (n=4)	81.60 ($\pm$ 17.56)	84.16 ($\pm$ 5.85) **	63.11 ($\pm$ 11.87)
	5. Exposición a HDM 15 semanas + anticuerpo anti-IL-33 (n=5)	39.22 ($\pm$ 18.93)	58.82 ($\pm$ 18.26)	70.99 ($\pm$ 23.85)
20	6. Exposición a HDM 15 semanas + anticuerpo de IL-4R α anti-ratón (n=5)	79.82 ($\pm$ 25.02)	57.79 ($\pm$ 18.72)	57.62 ($\pm$ 15.34)
	7. Exposición a HDM 15 semanas + anticuerpo anti-IL-33 + anticuerpo de IL-4R α anti-ratón (n=5)	19.69 ($\pm$ 8.80)	35.01 ($\pm$ 20.68)	48.19 ($\pm$ 18.58)

Nota: Se indica la significancia estadística determinada mediante ANOVA de una vía de Kruskal-Wallis con prueba post hoc de comparaciones múltiples de Dunn (**= $p < 0.01$, en comparación con los grupos 1: ratones IL-33 HumIn, exposición a solución salina).

Extracción de suero para la medición de niveles de IgE e IgG1 específica de HDM

Para determinar la concentración de IgE en las muestras de suero para cada ratón, se utilizó un kit OPTEIA de ELISA sándwich (BD Biosciences, #555248) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se diluyeron muestras de suero y se incubaron anticuerpo de captura contra IgE que se utilizó para recubrir placas con 96 pocillos. La IgE total se detectó mediante anticuerpo secundario de IgE anti-ratón biotinilado. Se utilizó IgE de ratón marcada con peroxidasa del rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés) purificada como estándar. Se utilizó el cromógeno 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (set de reactivo y sustrato OPTEIA BD, BD, #555214) para detectar la actividad de HRP. Se agregó entonces una solución de detención de ácido sulfúrico 1 M y se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas SpectraMax M5 de Molecular Devices. El análisis de datos se realizó mediante el uso del software Prism™. Las cantidades

promedio de niveles de IgE circulante en suero para cada grupo experimental se expresa como ng/mL ($\pm$ SD) tal como se muestra en la Tabla 10.

Para determinar los niveles de IgG1 específica de HDM en las muestras de suero de cada ratón se utilizó ELISA. Se incubaron placas cubiertas con HDM (Greer, #XPB70D3A2.5) con muestras de suero de ratón diluidas en serie, seguido por incubadora con un anticuerpo conjugado con HRP de IgG1 anti-ratón de rata (BD Biosciences, # 559626). Todas las muestras se desarrollaron con solución de TMB y se analizaron de la forma descrita anteriormente. Los niveles relativos de IgG1 circulante en suero se presentaron como unidades de titulación (las unidades de titulación se calcularon mediante la multiplicación de la OD medida por un factor de dilución necesario para obtener una OD450 que sea mayor que dos veces el fondo). Los niveles de IgG1 específica de HDM circulante promedio en suero para cada grupo experimental se expresa como titulación $\times 10^6$ ($\pm$ SD) tal como se muestra en la Tabla 10.

20

Análisis de niveles en circulación de IgE e IgG1 específica de HDM

Tal como se muestra en la Tabla 10, hubo una tendencia a un aumento significativo de niveles en circulación de IgE en el

suero de ratones IL-33 HumIN que recibieron HDM durante 15 semanas, con o sin tratamiento con anticuerpo de control de isotipo en ratones IL-33 HumIn expuestos a 1X PBS sola. De manera similar, hubo una tendencia a un aumento del nivel de IgG1 específica de HDM circulante en suero de ratones IL-33 HumIn que recibieron HDM durante 15 semanas. En contraste, hubo una reducción significativa en los niveles de IgE y una tendencia a una disminución de los niveles en circulación de IgG1 específica de HDM en el suero de ratones IL-33 HumIn tratados con una combinación de anticuerpos anti-IL-33 e IL-4R α anti-ratón durante al menos cuatro semanas de la exposición a HDM crónico en comparación con los ratones IL-33 HumIn a los que se les administró HDM con un anticuerpo de control de isotipo.

15

20

Tabla 10: Niveles en circulación de IgE e IgG1 específica de HDM en suero de ratón.

5	Grupo experimental	Niveles de IgE en circulación promedio ($\mu\text{g/mL}$) ($\pm\text{SD}$)	Niveles de IgG1 específica de HDM en circulación promedio (titulación $\times 10^6$) ($\pm\text{SD}$)
10	1. Exposición a 1X PBS (n=5)	2.16 (± 2.02)	ND
	2. Exposición a HDM 11 semanas (n=4)	50.16 (± 8.35)	1.18 (± 0.15)
	3. Exposición a HDM 15 semanas (n=4)	131.38 (± 106.84) *	1.88 (± 0.81)
15	4. Exposición a HDM 15 semanas + anticuerpo de isotipo de control (n=4)	193.07 (± 78.96) ***	1.62 (± 0.62)
	5. Exposición a HDM 15 semanas + anticuerpo anti-IL-33 (n=5)	45.74 (± 45.74)	1.76 (± 0.98)
20	6. Exposición a HDM 15 semanas + anticuerpo de IL-4R α anti-ratón (n=5)	11.12 (± 8.65)	0.99 (± 0.56)
	7. Exposición a HDM 15 semanas + anticuerpo anti-IL-33 + anticuerpo de IL-4R α anti-ratón (n=5)	6.45 (± 5.79) †	0.75 (± 0.30)

Nota: Se indica la significancia estadística determinada mediante ANOVA de una vía de Kruskal-Wallis con prueba post hoc de comparaciones múltiples de Dunn (*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$, en comparación con los grupos 1: ratones IL33 HumIn, exposición a solución salina; [†] $p < 0.05$, en comparación con el grupo 4: ratones IL33 Humin, exposición a HDM de 15 semanas + anticuerpo de isotipo de control). ND: No determinado.

10 Una combinación de tratamiento con H4H9675P y anticuerpo contra mIL-4R α iniciado en el contexto de iniciador mixta grave mejora los parámetros inflamatorios medidos, reduciendo la mayoría a sus valores iniciales. De manera adicional, se observaron efectos aditivos en algunos de los criterios de

15 valoración más dañinos, inclusive macropatología pulmonar compuesta, metaplasia de células caliciformes, infiltración celular pulmonar y niveles de citocina. Por lo tanto, bloquear ambas vías de manera simultánea tiene la posibilidad de generar un impacto sobre múltiples mediadores

20 inflamatorios en el contexto de inflamación mixta grave y patología del tejido, y normalizar múltiples parámetros a su valor inicial.

Ejemplo 5: Unión de IL33 con H4H9675P de mapeo de epítomos

mediante intercambio de hidrógeno deuterio

Para determinar los epítomos de IL33 humana que son reconocidos por un anticuerpo anti-IL33, H4H9675P, se llevaron a cabo estudios de intercambio de hidrógeno-deuterio (H/D) para el anticuerpo en co-complejo con IL33 humana. Para los experimentos recombinantes se empleó IL33 humana expresada con una etiqueta de hexahistidina en el extremo C (SEQ ID NO: 356). Una descripción general del método de intercambio H/D se establece en Ehring et ál., (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259 y Engen y Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A. Los experimentos de intercambio de H/D se realizaron en una plataforma integrada Watersd HDX/MS, que consistía en un sistema Leaptec HDX PAL para el marcado de deuterio, un Waters Acquity M-Class (gestor de solvente auxiliar) para digerir la muestra y cargarla, un Waters Acquity M-Class (gestor de solvente binario μ) para el gradiente de columna analítica y un espectrómetro de masa Synapt G2-Si para la medición de masa de péptido péptico.

La solución de marcado se preparó en amortiguador PBS 10 mM en D₂O con pD 7.0 (equivalente a pH 6.6). Para el marcado de deuterio, 3.8 μ L de hIL33-MMH (96 pmol/ μ L) o hIL33-MMH premezclado con el anticuerpo con una relación molar de 1:1 se incubaron con 56.2 μ L de solución de marcado D₂O para diversos momentos (2 minutos, 10 minutos y control no

deuterado = 0 segundos). La deuteración se inactivó mediante la transferencia de 50 μ L de la muestra a 50 μ L de TCEP 0.2 M pre-enfriado, cloruro de guanidina 6 M en amortiguador fosfato 100 mM con pH 2.5 (amortiguador de inactivación) y la muestra mezclada se incubó a 1.0 °C durante dos minutos. La muestra inactivada se inyectó entonces en un gestor Waters HDX para la digestión de proteasa XIII/pepsina en línea. Los péptidos digeridos se atraparon en ACQUITY UPLC BEH C18 1.7- μ m, precolumna VanGuard de 2.1 $\times$ 5 mm a 0°C y se eluyeron hacia un ACQUITY UPLC BEH C18 1.7- μ m, columna de 1.0 $\times$ 50 mm mediante el uso de una separación de gradiente de 9 minutos de 5 %-40 % B (fase móvil A: ácido fórmico en agua al 0.1 %, fase móvil B: ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo). El espectrómetro de masa se configuró con voltaje de cono de 37 V, tiempo de barrido de 0.5 segundos y un intervalo de masa/carga de 50-1700 Th.

Para la identificación de los péptidos a partir de hIL33-MMH, se procesaron los datos de LC- MS^E de una muestra no deuterada y se buscó con referencia a una base de datos que incluía IL-33, pepsina y otras secuencias aleatorizadas por medio del software Waters ProteinLynx Global Server (PLGS). Los péptidos identificados se importaron al software DynamX y se filtraron según dos criterios: 1) productos mínimos por aminoácido: 0.3, y 2) umbral de archivo de replicación: 3. El

software DynamX determinó entonces de manera automática la absorción de deuterio de cada péptido basándose en el tiempo de retención y precisión de más elevada (<10 ppm) a lo largo de múltiples momentos con 3 replicaciones en cada momento.

5 Mediante la columna de XIII de proteasa/pepsina en línea junto con la adquisición de datos de MS^E, se identificó un total de 68 péptidos de hIL33-MMH en ausencia y presencia de H4H9675P, lo cual representa una cobertura de secuencia del 95 %. Once péptidos tuvieron una absorción de deuteración
10 significativamente reducida (valores delta de centroide > 0.4 Dalton con valores de $p < 0.05$) cuando se unieron con H4H9675P y se enumeran en la Tabla 11. La masa de péptidos registrada corresponde al valor promedio del de masa MH⁺ centroide de tres replicaciones. Estos péptidos,
15 correspondientes a los aminoácidos 1-12 y 50-94 de la SEQ ID NO: 349, tuvieron una tasa de deuteración menor por la unión de H4H9675P. Estos residuos identificados también corresponden a los residuos 112-123 y 161-205 de IL-33 humana según se define por la entrada 095760 de Uniprot (IL33_HUMAN;
20 véase también la SEQ ID NO: 348). Estos datos proporcionan sustento para los residuos de aminoácidos 112-123 y 161-205 de la SEQ ID NO: 348, o los residuos de aminoácidos 1-12 y 50-94 de la SEQ ID NO: 349 que definen al menos en parte la región de unión en IL-33 para el anticuerpo H4H9675P.

Tabla 11. Péptidos de IL33 humana con deuteración significativamente reducida al unirse con H4H9675P

	Números de residuos basados en SEQ ID NO: 349	Deuteración de 2 minutos			Deuteración de 10 minutos		
		IL33 MH ⁺ centroide	IL33+H4H967 5P MH ⁺ centroide	Δ	IL33 MH ⁺ centroide	IL33+H4H967 5P MH ⁺ centroide	Δ
5							
	1-9	893.43±0.06	891.89±0.02	-1.54	893.60±0.03	892.00±0.08	-1.60
	1-10	1023.15±0.06	1021.53±0.05	-1.62	1023.31±0.01	1021.69±0.03	-1.63
10	1-11	1186.18±0.06	1184.39±0.13	-1.80	1186.43±0.02	1184.61±0.03	-1.82
	1-12	1300.27±0.07	1297.88±0.04	-2.39	1300.60±0.03	1298.65±0.01	-1.95
	50-61	1458.12±0.06	1456.36±0.00	-1.75	1458.27±0.08	1456.34±0.01	-1.93
15	52-67	1791.16±0.12	1789.89±0.25	-1.27	1791.20±0.02	1790.27±0.02	-0.93
	52-72	2353.80±0.12	2351.27±0.05	-2.53	2353.89±0.03	2351.95±0.10	-1.94
	53-70	1945.19±0.10	1944.26±0.07	-0.93	1945.25±0.02	1944.84±0.03	-0.41
20	53-72	2189.95±0.13	2188.03±0.03	-1.92	2190.02±0.02	2188.58±0.04	-1.44
	71-81	1253.89±0.07	1253.08±0.18	-0.81	1254.07±0.02	1253.52±0.16	-0.55
	71-94	2815.35±0.05	2814.48±0.00	-0.87	2816.06±0.12	2815.10±0.12	-0.96

Ejemplo 6: Efecto de un anticuerpo de IL-33 (REGN3500) y un anticuerpo de IL-4R (dupilumab) solo o en combinación en un modelo de 19 semanas de inflamación pulmonar inducida por alérgenos mediante el uso de ratones humanizados IL-4Ralfa,

5 IL-4 e IL-33

El efecto de un anticuerpo de IL-33 solo, un anticuerpo de IL-4R solo o una combinación de ambos anticuerpos se evaluó primero en el Ejemplo 4 anterior, mediante el uso de ratones homocigotos para la expresión de IL-33 humana en lugar de
 10 ratones IL-33 (ratones IL-33 HumIn; véanse las publicaciones de patente estadounidense n.º 2015/0320021 y 2015/0320022). Se comparó un anticuerpo completamente humano anti-IL-33 (REGN3500) y un anticuerpo de IL-4R α anti-ratón, o una combinación de ambos en este modelo y los resultados se
 15 describen en el Ejemplo 4.

Dado que, ni el anticuerpo humano anti-IL-33 (REGN3500), ni el anticuerpo humano contra IL-4R (dupilumab) se une a sus proteínas objetivo respectivas, se generaron ratones modificados genéticamente, en los cuales IL-33, IL-4 y el
 20 ectodominio de IL-4R α de ratón se reemplazaron por las secuencias humanas correspondientes (*Il4ra*^{hu/hu} *Il4*^{hu/hu} *Il33*^{hu/hu}). La especie de ratón *Il4ra*^{hu/hu} *Il4*^{hu/hu} *Il33*^{hu/hu} se validó mediante una herramienta para estudiar el efecto de la administración de REGN3500 y dupilumab mediante el uso de un

modelo de 4 semanas de inflamación pulmonar inducida por la exposición a HDM. En este modelo, los ratones *Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu} Il133^{hu/hu}* expuestos a HDM presentaron respuestas inmunitarias similares a los ratones de *tipo salvaje* según se determinó
 5 mediante una evaluación de la infiltración pulmonar eosinofílica.

El estudio descrito más adelante se llevó a cabo para determinar si el bloqueo simultáneo de las vías de IL-33 e IL-4/IL-13 podría tener un mayor impacto sobre la inflamación
 10 que el bloqueo de cualquiera de las vías sola. En este estudio, se expusieron ratones *Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu} Il133^{hu/hu}* por vía intranasal (IN) a HDM o solución salina durante 19 semanas. Un grupo de control de ratones *Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu} Il133^{hu/hu}* se sacrificó después de 11 semanas de exposición a
 15 HDM para evaluar la gravedad de la enfermedad al comienzo del tratamiento con anticuerpos. Los ratones de- diecinueve semanas expuestos a HDM o bien no recibieron tratamiento o recibieron inyecciones de anticuerpo subcutáneas (SC) dos veces por semana desde la semana 12 hasta la semana 19 de
 20 exposición a HDM durante un total de 8 semanas y 16 dosis. Los siguientes anticuerpos se administraron a una dosis de proteína final de 11 mg/kg: (a) 11 mg/kg de anticuerpo de control de isotipo, (b) 1 mg/kg de REGN3500 + 10 mg/kg de anticuerpo de control de isotipo (c) 10 mg/kg de dupilumab +

1 mg/kg anticuerpo de control de isotipo, o (d) 1 mg/kg de REGN3500 + 10 mg/kg de dupilumab. El efecto del tratamiento de REGN3500 y dupilumab, soloso en combinación, sobre los ratones expuestos a HDM se evaluó para los siguientes
 5 marcadores patológicos de inflamación de las vías respiratorias:

Macropatología (peso pulmonar relativo)

Infiltración de tejido pulmonar por células inflamatorias de tipo 1 (neutrófilos, cuantificados mediante los niveles de
 10 proteína en el pulmón del marcador de neutrófilos mieloperoxidasa [MPO]) y células inflamatorias del tipo 2 (eosinófilos [CD11c^{Hi}] y linfocitos T ST2⁺ CD4⁺ totales y activados, cuantificados mediante citometría de flujo)

Niveles de proteína en el pulmón de citocina inflamatoria
 15 (IL-4 humana e IL-5, IL-6, IL-1 β , TNF α , IFN γ , GRO α , y MCP-1 de ratón, cuantificadas mediante inmunoensayo)

Niveles en circulación del marcador sistémico de inflamación, la proteína A amiloide en suero [SAA] (cuantificada mediante inmunoensayo)

20

Materiales y métodos

Sistema de prueba

Ratones humanizados de ectodominio de IL-4R α , IL-4 e IL-33

Ni REGN3500 ni dupilumab se une a IL-33 de ratón ni a IL-4R α

de ratón, respectivamente. Para evaluar REGN3500 y dupilumab cada uno por su lado y en combinación, se generaron ratones modificados genéticamente en los cuales IL-33, IL-4 y el ectodominio de IL-4R α de ratón se reemplazaron por las
 5 secuencias humanas correspondientes (*Il4ra*^{hu/hu} *Il4*^{hu/hu} *Il33*^{hu/hu}). Esta especie de ratón triple humanizada se generó mediante el uso de la tecnología VelociGene® en Regeneron Pharmaceuticals (Valenzuela, DM, et ál. Nat Biotechnol. (2003), jun;21(6):652-9, Poueymirou, WT, et ál. Nat
 10 Biotechnol. (2007) ene;25(1):91-9) al cruzar la especie de ratón humanizado de ectodominio de IL-4R α /IL-4 *Il4ra*^{hu/hu} *Il4*^{hu/hu} caracterizado anteriormente con la especie de ratón humanizado IL-33 *Il33*^{hu/hu} caracterizado anteriormente.

15 **Modelo de ratón de inflamación pulmonar**

El modelo de inflamación pulmonar de ratón emplea exposición intranasal (IN) repetida a extracto de HDM que sirve como la fuente del alérgeno de ácaro del polvo doméstico (Johnson, et ál.; American Journal of Respiratory and Critical Care
 20 Medicine; (2004) feb 1;169 (3):378-85), una causa significativa de alergia de interiores en seres humanos (Calderon, et ál., (2015), Respiratory allergy caused by house dust mites: What do we really know? J Allergy Clin Immunol. 2015 jul;136 (1):38-48). Se observó que la

exposición crónica a HDM induce inflamación pulmonar grave, lo cual da como resultado una infiltración celular pulmonar significativa, expresión de citocina y remodelación. En particular, se ha demostrado que los ratones expuestos de forma crónica a HDM presentan inflamación pulmonar de fenotipos mixtos de tipo 1/tipo 2, tal como infiltración de tejido por células inflamatorias de tipo 1 y tipo 2 (neutrófilos y eosinófilos, respectivamente), aumento de IgE en suero, aumento de IgG1 específica de HDM en suero, así como inducción de citocinas inflamatorias del tipo 2, tales como IL-5 e IL-13 (Johnson, et ál. (2004), American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine; feb 1;169 (3):378-85; Johnson, et ál. (2011). PloS ONE. ene 20;6 (1):e16175; Llop-Guevara, et ál., (2008), PloS ONE, jun 11;3(6):e2426.

15

Diseño experimental

Modelo de inflamación pulmonar inducida por exposición a HDM durante cuatro semanas

Se aleatorizaron ratones hembra de los genotipos indicados en la Tabla 12 en 2 grupos, uno por cada genotipo. Se administró solución salina (20 µL) o 50 µg de HDM diluidos en 20 µL de solución salina por vía IN 3 veces por semana durante 4 semanas. Todas las especies de ratón tenían antecedentes mixtos de C57BL/6NTac / 129S6SvEvTac. Los ratones se

20

sacrificaron 4 días después de la última exposición, se extrajeron los pulmones, y se determinó la infiltración pulmonar eosinofílica.

5 **Tabla 12: Protocolo experimental para el modelo de HDM de 4**
semanas

Grupo	Genotipo	N	Reactivo de exposición	Duración de la exposición (semanas)
10 A	<i>De tipo salvaje</i>	3	20 µL de solución salina	4
B	<i>De tipo salvaje</i>	5	50 µg de HDM	4
15 C	<i>Il13^{hu/hu}</i>	5	20 µL de solución salina	4
D	<i>Il13^{hu/hu}</i>	5	50 µg de HDM	4

5	E	<i>Il4ra</i> ^{hu/hu}	5	20 µL de solución salina	4
	F	<i>Il4ra</i> ^{hu/hu}	5	50 µg de HDM	4
	G	<i>Il4ra</i> ^{hu/hu} <i>Il4</i> ^{hu/hu}	5	20 µL de solución salina	4
10	H	<i>Il4ra</i> ^{hu/hu} <i>Il4</i> ^{hu/hu}	5	50 µg de HDM	4
	I	<i>Il4ra</i> ^{hu/hu} <i>Il4</i> ^{hu/hu} <i>Il33</i> ^{hu/hu}	4	20 µL de solución salina	4
15	J	<i>Il4ra</i> ^{hu/hu} <i>Il4</i> ^{hu/hu} <i>Il33</i> ^{hu/hu}	5	50 µg de HDM	4

Tipo salvaje = C57BL/6NTac / 129S6SvEvTac

Modelo de inflamación pulmonar inducida por exposición a HDM durante diecinueve semanas

Se utilizaron ratones *Il4ra*^{hu/hu} *Il4*^{hu/hu} *Il33*^{hu/hu} en este estudio que tenían antecedentes de C57BL/6NTac (72 %) / 129S6SvEvTac (28 %); se aleatorizaron ratones hembra en 7 grupos separados. La exposición a HDM y el protocolo de

dosificación de control y tratamiento de cada grupo de ratones se muestra en la Tabla 13. Se administró solución salina (20 µL) o 50 µg de HDM diluidos en 20 µL de solución salina por vía IN 3 veces por semana durante 19 semanas. Un grupo de control de ratones *Il4ra*^{hu/hu} *Il4*^{hu/hu} *Il13*^{hu/hu} se sacrificó después de 11 semanas de exposición a HDM para evaluar la gravedad de la enfermedad al comienzo del tratamiento con anticuerpos. Los ratones de diecinueve semanas expuestos a HDM o bien no recibieron tratamiento o recibieron inyecciones subcutáneas (SC) dos veces por semana desde la semana 12 hasta la semana 19 de exposición a HDM durante un total de 16 dosis de anticuerpo, tal como se indica en la [Tabla 13](#). A grandes rasgos, los siguientes anticuerpos se administraron a una dosis de proteína final de 11 mg/kg: 11 mg/kg de anticuerpo de control de isotipo (grupo D), 1 mg/kg de REGN3500 + 10 mg/kg de anticuerpo de control de isotipo (grupo E), 10 mg/kg de dupilumab + 1 mg/kg anticuerpo de control de isotipo (grupo F) o 1 mg/kg de REGN3500 + 10 mg/kg de dupilumab (grupo G). A los fines del presente documento, los grupos de tratamiento de anticuerpo dual (D-G) se identificarán únicamente mediante el anticuerpo terapéutico (REGN3500 y/o dupilumab). En el día 134 del estudio, 4 días después de la última exposición IN y la inyección de anticuerpo, todos los ratones fueron

sacrificados, se extrajo sangre mediante punción cardíaca y se extrajeron los pulmones para su anticuerpo.

**Tabla 13: Protocolo experimental para el modelo de HDM de 19
5 semanas**

		Grupo	N	Reactivo de exposición	Duración de la exposición (semanas)	Administración de anticuerpo	Dosis de anticuerpo (mg/kg)
10		A	5	20 µL de solución salina	19	Ninguna	Ninguna
15		B	9	50 µg de HDM	11	Ninguna	Ninguna
		C	9	50 µg de HDM	19	Ninguna	Ninguna
		D	9	50 µg de HDM	19	Control de IgG4 ^P	11
20		E	7	50 µg de HDM	19	REGN3500 + Control de IgG4 ^P	1 + 10
		F	8	50 µg de HDM	19	dupilumab + Control de IgG4 ^P	10 + 1
		G	8	50 µg de HDM	19	REGN3500 + dupilumab	1 + 10

Control de IgG4^P = anticuerpo de control que coincide con el isotipo, REGN1945.

Cuidado de los ratones

5 Durante la totalidad del experimento, los animales permanecieron en una instalación para animales de Regeneron en condiciones estándar y se dejaron aclimatar durante al menos 7 días antes de ser colocados en el estudio. Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con las
10 pautas del Comité de cuidado y uso institucional de animales de Regeneron.

Procedimientos específicos

Medición del peso pulmonar relativo

15 Se registró una medición del peso corporal terminal antes del sacrificio. Después de extraer la sangre, se retiró el pulmón izquierdo de cada ratón y se colocó en un tubo que contenía una solución de paraformaldehído al 4 %. El peso húmedo del pulmón izquierdo para cada ratón se registró en una escala
20 New Classic MS de Mettler Toledo. Para determinar los pesos pulmonares relativos, la proporción entre peso húmedo del pulmón (en mg) y el peso corporal (en g) se calculó mediante la división del peso pulmonar húmedo entre el peso corporal.

Análisis de infiltrados pulmonares celulares

Después de extraer la sangre, se retiró el lóbulo caudal del pulmón derecho de cada ratón, se colocó en un tubo que contenía una solución de 20 µg/mL de DNasa I y 0.7 U/mL de
5 Liberase TH diluida en solución salina balanceada de Hank (HBSS) y se cortó en partes de aproximadamente 2 a 3 mm de tamaño. Los tubos que contenían los lóbulos pulmonares en cubos se incubaron entonces en un baño de agua a 37 °C durante 20 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición
10 de ácido etilendiamintetraacético (EDTA) a una concentración final de 10mM. Las muestras se transfirieron a tubos gentleMACS C. Entonces, se agregaron 2 mL de amortiguador autoMACS y las muestras se disociaron posteriormente para formar suspensiones celulares mediante el uso de un
15 disociador gentleMACS™ dissociator (Miltenyi Biotec). Los tubos entonces se centrifugaron y el sedimento resultante se volvió a suspender en 4 mL de 1x amortiguador de lisado de eritrocitos para lisar eritrocitos. Después de incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente, se agregaron 2.5
20 volúmenes de 1x DMEM para desactivar el amortiguador de lisado de eritrocitos. Las suspensiones celulares entonces se centrifugaron y los sedimentos celulares resultantes se volvieron a suspender en 1 mL de DPBS. Cada una de las muestras resuspendidas se filtraron a través de un filtro

tipo copa filcon de 50 μm y se transfirieron a una placa de pocillo profundo de 2 mL. La placa se centrifugó durante 4 minutos a 400 x g y cada muestra se volvió a suspender en 1 mL de DPBS. Se colocaron aproximadamente 1.5×10^6 células por

5 pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo en forma de U. Las células entonces se centrifugaron y los sedimentos celulares se volvieron a suspender en 100 μL de tinte LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain diluido a 1:500 en 1X DPBS para determinar la viabilidad celular. Las células se

10 incubaron con el tinte de viabilidad durante 15 minutos a temperatura ambiente, mientras se protegían de la luz. Después de un lavado con 1X DPBS, las células se incubaron con bloque de Fc CD16/CD32 anti-ratón de rata diluido hasta 1:50 en 50 μL de amortiguador autoMACS durante 15 minutos a

15 4 °C. Las células entonces se incubaron en la mezcla adecuada de anticuerpo 2x diluida en amortiguador amortiguador de tinción Brilliant (descrito en la [Table 14](#)) durante 30 minutos a 4 °C mientras se protegían de la luz. Después de la incubación del anticuerpo, las células se lavaron dos veces

20 en amortiguador autoMACS, se volvieron en BD CytoFix que se había diluido a 1:4 en 1X DPBS y entonces se incubaron durante 15 minutos a 4 °C mientras se protegían de la luz. Las células se lavaron de forma subsiguiente y se volvieron a suspender en amortiguador autoMACS. Las suspensiones

celulares se filtraron entonces en una placa de fondo en forma de U nueva a través de una placa de filtro AcroPrep Advance 96 30-40 μm . Los datos de la muestra se adquirieron en un analizador celular LSR Fortessa X-20 mediante el uso del acoplamiento de HTS (BD Biosciences). El análisis de los datos se realizó mediante el uso del software FlowJo X (Tree Star, OR) y el análisis estadístico se realizó mediante el uso de GraphPad Prism™ (GraphPad Software, CA).

10 **Estrategia de regulación para eosinófilos (totales y activados)**

Los eosinófilos se definieron como células vivas, individuales e intactas (baja señal de tinción de viabilidad LIVE/DEAD), CD45⁺, F4/80⁺, Ly6G⁻, SiglecF⁺. Los datos de eosinófilos se expresaron como frecuencia de células vivas. Dentro de la población de eosinófilos, los eosinófilos activados se definieron como CD45⁺, F4/80⁺, Ly6G⁻, SiglecF⁺, CD11c^{Hi} intactas, individuales, vivas, y se expresaron como frecuencia de eosinófilos totales.

20

Estrategia de regulación para linfocitos T ST2⁺ CD4⁺

Los linfocitos T ST2⁺ CD4⁺ se definieron como CD45⁺, CD3⁺, CD19⁻, CD4⁺, CD8⁻, ST2⁺ intactas, individuales, vivas. Los datos para linfocitos T ST2⁺ CD4⁺ se expresaron como

frecuencia de linfocitos T CD4⁺ (CD45⁺, CD3⁺, CD19⁻, CD4⁺, CD8⁻ intactas, individuales, vivas).

Tabla 14: Anticuerpos utilizados para análisis de citometría de flujo

5

10

15

20

Anticuerpo	Fluorocromo	Fabricante	N.º de catálogo:	N.º de lote	Dilución final
Mezcla 1: Eosinófilos totales y activados					
CD45	Alexa Fluor 700	BioLegend	103128	B191240/ B211311	1/200
Siglec-F	BV421	BD	562681	4234913/ 6007723	1/200
F4/80	PE	BD	565410	5168713/ 5257914	1/500
Ly6G	BUV395	BD	563978	5156800/ 7103737	1/200
CD11c	PerCP-Cy5.5	BD	560584	5148566/70747 58	1/200
Mezcla 2: Linfocitos T ST2⁺ CD4⁺					
CD45	Alexa Fluor 700	BioLegend	103128	B211311	1/200
CD19	BUV737	BD	564296	6315651	1/200
ST2	PerCP-eFluor710	eBioscience	H6-9335-82	E17254-105	1/200
CD3	PE-Cy7	BD	552774	7074769	1/200
CD8	BUV395	BD	563786	6245983	1/200
CD4	BV786	BD	563331	7075503	1/200

Determinación de los niveles de proteína en el pulmón

Después de la extracción de sangre, los lóbulos superior y medio del pulmón derecho de cada ratón se extrajeron, se pesaron y colocaron en tubos que contenían una solución de reactivo de extracción de proteína de tejido (T-PER) complementada con un cóctel inhibidor de proteasa. Para conseguir una relación entre peso de tejido pulmonar final y volumen de T-PER de 1:8 (p/v), se agregaron 8 μ L de solución T-PER (que contenía el cóctel inhibidor de proteasa) por mg de tejido. Las muestras se homogeneizaron de forma mecánica mediante el uso de TissueLyser II. Los lisados resultantes se centrifugaron para sedimentar los desechos. Los sobrenadantes que contenían los extractos de proteína soluble se transfirieron a tubos nuevos y se almacenaron a 4°C hasta su análisis posterior. Las concentraciones de citocinas y MPO se expresaron como cantidad total de proteína por lóbulo examinado (ng/lóbulo pulmonar y μ g/lóbulo pulmonar, respectivamente).

Inmunoensayo multiplexado de citocinas

Las concentraciones de citocinas de ratón (IL-5, IL-13, IL-6, IL-1 β , IL-12p70, TNF α , IFN γ , GRO α y MCP-1) en el pulmón se midieron mediante el uso de un kit de inmunoensayo multiplexado (10-Plex de ratón personalizado, MSD), de

acuerdo con las instrucciones del fabricante. A grandes rasgos, las muestras de homogenado de pulmón se diluyeron e incubaron en placas precubiertas con anticuerpos de captura. Las proteínas calibradoras proporcionadas por el fabricante se utilizaron como estándares. Las citocinas en los homogenados se detectaron mediante anticuerpos de detección marcados incubados con amortiguador de lectura. La electroquimioluminiscencia se midió inmediatamente con un instrumento MSD Sceptor®. Se realizó el análisis de datos mediante el uso del software GraphPad Prism. La concentración más baja del estándar dentro del intervalo lineal de cada ensayo se definió como el límite inferior de cuantificación (LLOQ, por sus siglas en inglés) del ensayo para la citocina respectiva. Los valores de LLOQ para las citocinas individuales evaluadas fueron los siguientes: IFN γ =0.2 pg/mL, IL-1 β =1.6 pg/mL, IL-5=0.2 pg/mL, IL-6=1.4 pg/mL, IL-12p70=125.8 pg/mL, IL-13=24.4 pg/mL, GRO α : 0.5 pg/mL, MCP-1=9.8 pg/mL, TNF α =2.4 pg/mL.

20 **ELISA de IL-4 humana**

Las concentraciones de IL-4 humana en los extractos de proteína del pulmón se midieron mediante el uso de un kit de ELISA sándwich de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ELISA Quantikine de IL-4 humana, R&D Systems). A

grandes rasgos, los homogenados de pulmón se diluyeron e incubaron en placas de 96 pocillos precubiertas con anticuerpos de captura de IL-4 anti-humano. IL-4 humana purificada se utilizó como estándar. La IL-4 humana capturada se detectó mediante el uso de anticuerpo de detección de IL-4 anti-humano conjugado con HRP. La actividad de HRP se detectó mediante el uso del cromógeno 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Se agregó entonces una solución de detención y la densidad óptica a 450 nm (OD_{450}) se midió en un lector de placas SpectraMax M5 de Molecular Devices. Se realizó el análisis de datos mediante el uso del software GraphPad Prism. La concentración más baja del estándar dentro del intervalo lineal del ensayo se definió como el LLOQ del ensayo=31.25 pg/mL.

15

ELISA de MPO

Las concentraciones de MPO en los extractos de proteína del pulmón se midieron mediante el uso de un kit de ELISA sándwich de acuerdo con las instrucciones del fabricante (kit ELISA de MPO de ratón, Hycult Biotech). A grandes rasgos, los homogenados de pulmón se diluyeron e incubaron en placas de 96 pocillos precubiertas con anticuerpos de captura contra MPO. MPO de ratón purificada se utilizó como estándar. La MPO capturada se detectó mediante el uso de anticuerpo

20

biotinilado de detección de MPO anti-ratón. Estreptavidina conjugada con HRP purificada se utilizó para detectar anticuerpo de MPO anti-ratón biotinilado. La actividad de HRP se detectó mediante el uso del cromógeno 3,3',5,5'-
5 tetrametilbenzidina (TMB). Se agregó entonces una solución de detención y la densidad óptica a 450 nm (OD₄₅₀) se midió en un lector de placas SpectraMax M5 de Molecular Devices. Se realizó el análisis de datos mediante el uso del software GraphPad Prism. La concentración más baja del estándar dentro
10 del intervalo lineal del ensayo se definió como el LLOQ del ensayo==156.3 ng/mL.

Extracción de suero

Se recogió sangre entera en tubos Microcontainer mediante
15 punción cardíaca al final del estudio. La sangre se dejó coagular al dejarla en reposo a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos. La sangre coagulada y las células se sedimentaron mediante centrifugación a 18 000 x g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante, denominado suero,
20 se transfirió a placas de polipropileno limpias y se utilizó para determinar los niveles de anticuerpo en circulación, tal como se describe a continuación.

Determinación de niveles de SAA en suero mediante ELISA

Las concentraciones de SAA total en las muestras de suero para cada ratón se determinaron mediante el uso de un inmunoensayo comercial (ELISA Quantikine, R&D Systems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A grandes rasgos, las muestras de suero se diluyeron e incubaron en placas de 96 pocillos recubiertas previamente con anticuerpo de captura de SAA anti-ratón monoclonal. SAA de ratón recombinante se utilizó como estándar. La SAA capturada se detectó mediante el uso de anticuerpo biotinilado de detección de SAA anti-ratón policlonal conjugado con HRP. La actividad de HRP se detectó mediante el uso de TMB de sustrato de HRP colorimétrico. Se agregó entonces una solución de detención de ácido clorhídrico diluido y se midió la OD₄₅₀ en un lector de placas SpectraMax M5 de Molecular Devices. La concentración de SAA circulante en suero para cada muestra se determinó como ng/mL y se graficó como µg/mL. Se realizó el análisis de datos utilizando software GraphPad Prism. La concentración más baja del estándar dentro del intervalo lineal del ensayo se definió como el LLOQ del ensayo= 31.2 ng/mL.

Determinación de los niveles de IgE en suero mediante ELISA

Las concentraciones de IgE total en las muestras de suero para cada ratón se determinaron mediante el uso de un kit

OPTEIA de ELISA sándwich colorimétrico de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A grandes rasgos, las muestras de suero se diluyeron e incubaron en placas de 96 pocillos recubiertas previamente con anticuerpo de captura IgE. IgE de ratón purificada se utilizó como estándar. La IgE capturada se detectó mediante el uso de anticuerpo biotinilado de detección contra IgE de ratón. Estreptavidina conjugada con HRP purificada se utilizó para detectar anticuerpo de IgE anti-ratón biotinilado. La actividad de HRP se detectó mediante el uso de TMB. Se agregó entonces una solución de detención de ácido sulfúrico 2 N y se midió la OD₄₅₀ en un lector de placas SpectraMax M5 de Molecular Devices. La concentración de IgE circulante en suero para cada muestra se expresó como µg/mL. Se realizó el análisis de datos utilizando software GraphPad Prism. La concentración más baja del estándar dentro del intervalo lineal del ensayo se definió como el LLOQ del ensayo= 78.15 ng/mL.

Determinación de los niveles de IgG1 específica de HDM en suero mediante ELISA

Se desarrolló un ensayo ELISA colorimétrico para determinar los niveles de IgG1 específica de HDM en muestras de suero. Placas recubiertas con HDM a una concentración de 4 µg/mL en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) durante la

noche a 4 °C, se lavaron, bloquearon con una solución salina de BSA al 0.5 % en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente, y se incubaron con muestras de suero de ratón diluidas en serie. Después de 1 hora a temperatura ambiente, las placas se lavaron y los anticuerpos de IgG1 capturados en las placas se detectaron mediante incubación con anticuerpo conjugado con HRP de IgG1 anti-ratón de rata durante 1 hora a temperatura ambiente. La actividad de HRP se detectó mediante el uso de TMB. Se agregó entonces una solución de detención de ácido sulfúrico 2 N y se midió la OD₄₅₀ en un lector de placas SpectraMax M5 de Molecular Devices. Los niveles relativos de IgG1 en suero se representaron como unidades de titulación. Las unidades de titulación se calcularon al multiplicar la OD₄₅₀ medida por el factor de dilución necesario para lograr una lectura de OD₄₅₀ que sea mayor que 2 veces la OD₄₅₀ de fondo. Se realizó el análisis de datos utilizando software GraphPad Prism. El factor de dilución menor utilizado en el ensayo se definió como el LLOQ del ensayo = 100.

20

Determinación de los niveles de anticuerpo de IgG4 humano específico del objetivo mediante ELISA

Se determinó la concentración de anticuerpo humano (REGN3500, dupilumab, o control de isotipo de IgG4^P) en las muestras de

suero para cada ratón mediante el uso de un ELISA sándwich colorimétrico desarrollado para detectar anticuerpos de IgG4 humanos. Los pocillos de microtitulación se recubrieron con el antígeno específico para el anticuerpo humano medido, es
5 decir IL-33 humana (REGN3931) para capturar REGN3500, IL-4R α humana (REGN560) para capturar REGN668, Fel d 1 natural para capturar REGN1945, a una concentración de 2 μ g/mL en PBS durante la noche a 4 °C. Los pocillos se lavaron cuatro veces con Tween 20 al 0.05 % en DPBS, se bloquearon con una
10 solución de BSA al 5 % durante 3 horas a temperatura ambiente y se incubaron con muestras de suero de ratón diluidas en serie o estándares de calibración diluidos en serie. Los anticuerpos purificados (REGN3500, REGN668 y anticuerpos de control IgG4^P) se utilizaron como estándar para calibración y
15 cuantificación de las concentraciones de anticuerpo respectivo en suero. Después de 1 hora a temperatura ambiente, las placas se lavaron 7 veces y la IgG4 humana capturada en las placas se detectó mediante el uso de anticuerpo monoclonal específico de IgG4 anti-humano seguido
20 por incubación con poli HRP, conjugado de estreptavidina. La actividad de HRP se detectó mediante el uso de sustrato de TMB de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de 10 minutos, se midió la absorbancia a 450 nm mediante el uso de un lector de placas de modo múltiple SpectraMax de

Molecular Devices. La concentración más baja de estándar (REGN3500, REGN668 o anticuerpo de control IgG4^P) utilizada para la calibración (0.002 µg/mL) se definió como LLOQ de este ensayo. Se realizó el análisis de datos mediante el uso de GraphPad Prism™ (GraphPad Software, CA). La concentración de anticuerpo humano en suero para cada muestra se expresó como µg/mL.

Análisis estadísticos:

Los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism versión 7.0 (GraphPad Software, CA).

Análisis estadístico de datos a partir de la caracterizado de ratones humanizados IL-4Rα, IL-4 e IL-33 en el modelo de exposición a HDM de 4 semanas

Los resultados se interpretaron mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA, por sus siglas en inglés) seguido por una prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p \leq 0.05$.

Análisis estadístico de datos a partir del tratamiento con REGN3500/dupilumab en el modelo de inflamación pulmonar inducido por exposición a HDM durante 19 semanas

La normalidad de los datos se evaluó mediante el uso de la prueba de Shapiro-Wilk. Si los datos pasan la prueba de normalidad y las desviaciones estándar de los diferentes grupos no son estadísticamente diferentes entre sí según su
 5 evaluación mediante la prueba de Brown-Forsythe, los resultados se interpretan mediante ANOVA de una vía seguido por prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Si los datos no pasan la prueba de normalidad o las desviaciones estándar son significativamente diferentes, los resultados se
 10 interpretan mediante el uso de una prueba de Kruskal-Wallis, seguida por prueba post hoc de Dunn para comparaciones múltiples. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p \leq 0.05$.

15 **RESULTADOS**

Caracterización de ratones humanizados de ectodominio de IL-4R α , IL-4 e IL-33

Los ratones de *tipo salvaje*, humanizados simples *Il33^{hu/hu}* y *Il4ra^{hu/hu}*, dobles humanizados *Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}* y triples
 20 humanizados *Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu} Il33^{hu/hu}* se expusieron por vía IN a solución salina o HDM 3 veces por semana durante 4 semanas. Los ratones se sacrificaron 4 días después de la última exposición y los pulmones se extrajeron para evaluar la infiltración de pulmón mediante eosinófilos activados

identificados por la expresión elevada de CD11c. Los datos de ratones individuales y análisis estadísticos se proporcionan en la Figura 2. Los ratones triples humanizados *Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu} Il33^{hu/hu}* presentaron una respuesta potente a HDM similar a la de los ratones *de tipo salvaje*, tal como se indica mediante un aumento significativo en la fe de eosinófilos activados en el tejido pulmonar después de 4 semanas de exposición a HDM. Los ratones *Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu} Il33^{hu/hu}* y *de tipo salvaje* también presentaron frecuencias de eosinófilos activados similares en el tejido pulmonar en ausencia de exposición a HDM (ratones de control expuestos a solución salina). No se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar ratones *de tipo salvaje* expuestos a HDM con ratones expuestos a HDM de cualquiera de las especies de ratones humanizadas evaluadas, con la excepción de los ratones *Il4ra^{hu/hu}* humanizados simples. La carencia de aumentos inducidos por exposición a HDM estadísticamente significativos en el porcentaje de infiltración pulmonar eosinofílica activada en ratones *Il4ra^{hu/hu}* es probable que se deba al hecho de que IL-4 de ratón no produce señal por medio del receptor de IL-4R α humana. Se ha observado que IL-33 humana, por otro lado, produce señal por medio del complejo receptor murino (REGN3500-MX-16069). De manera adicional, no se observaron

diferencias estadísticamente significativas al comparar los ratones de *tipo salvaje* expuestos a solución salina con los ratones expuestos a solución salina de cualquiera de las especies de ratón humanizadas evaluadas. Estos hallazgos
 5 validan las especies de ratón *Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu} Il33^{hu/hu}* para su uso como un modelo de ratón de inflamación pulmonar inducida por la exposición a HDM.

Efecto del tratamiento con REGN3500 y dupilumab en ratones 10 expuestos a HDM por 19 semanas

Los ratones *Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu} Il33^{hu/hu}* se expusieron por vía IN a solución salina o HDM 3 veces por semana durante 11 o 19 semanas. Cuatro grupos de ratones expuestos a HDM por 19 semanas recibieron inyecciones SC dos veces a la semana de
 15 anticuerpos desde la semana 12 hasta la semana 19; todos los demás grupos no recibieron tratamiento (ninguno, cuadros grises claros). Los anticuerpos se administraron solos o en combinación con dosis de proteína final de 11 mg/kg de la siguiente manera: 11 mg/kg de anticuerpo de control de
 20 isotipo, 1 mg/kg de REGN3500 + 10 mg/kg de anticuerpo de control de isotipo, 10 mg/kg de dupilumab + 1 mg/kg anticuerpo de control de isotipo o 1 mg/kg de REGN3500 + 10 mg/kg de dupilumab. Una cohorte de ratones se sacrificó después de 11 semanas de exposición para determinar el perfil

inflamatorio al comienzo del tratamiento con anticuerpo (grupo de exposición de 11 semanas). Las demás 4 cohortes se sacrificaron en el día 134 (grupos de exposición de 19 semanas), cuatro días después de la última exposición e
 5 inyección de anticuerpo. Se extrajo sangre entera mediante punción cardíaca para aislar el suero y los pulmones se extrajeron para su análisis adicional. Todos los grupos comprendían la misma especie (*Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu} Il33^{hu/hu}*) a menos que se indique lo contrario.

10

Análisis de macropatología pulmonar

El peso pulmonar relativo aumento significativamente en los ratones expuestos a HDM por 19 semanas en comparación con los ratones de control expuestos a solución salina de la Figura
 15 3. Esto es probable que se deba a un aumento de la infiltración celular, deposición de colágeno, hipertrofia muscular y producción de mucosa. En los ratones expuestos a HDM, la administración combinada de REGN3500 y dupilumab bloqueó de manera significativa los aumentos inducidos por
 20 exposición a HDM en el peso pulmonar relativo en comparación con ratones a los que se le administró anticuerpo de control de isotipo (Figura 3). También se observó una tendencia a un peso pulmonar relativo reducido en ratones expuestos a HDM-que recibieron una dosis con REGN3500 solo.

Análisis de infiltrados celulares pulmonares

Cuatro días después de la última inyección, los pulmones de los ratones se extrajeron y se disoció el lóbulo caudal de pulmón derecho en una única suspensión celular para anticuerpo por citometría de flujo de flujo de eosinófilos. Los eosinófilos se definieron como CD45⁺, F4/80⁺, Ly6G⁻, SiglecF⁺ intactas, individuales, vivas, y los eosinófilos activados se definieron además como CD11c^{Hi}. La infiltración pulmonar por eosinófilos activados se informó como frecuencia (%) de eosinófilos pulmonares totales (A) y la infiltración eosinofílica pulmonar general se informó como frecuencia (%) de eosinófilos pulmonares en células vivas (intactas, individuales, vivas). En comparación con los ratones de control expuestos a solución salina, la exposición a HDM durante 19 semanas aumentó de manera significativa la infiltración pulmonar celular, según se evalúa mediante citometría de flujo para detectar eosinófilos pulmonares totales y activados (Figuras 4A y 4B) y linfocitos T ST2⁺ CD4⁺ en el pulmón (los linfocitos T ST2⁺ CD4⁺ se definieron como CD45⁺, CD3⁺, CD19⁻, CD4⁺, CD8⁻, ST2⁺ intactas, individuales, vivas, y se informaron como frecuencia de linfocitos T CD4⁺) (Figura 5), o mediante inmunoensayo para detectar niveles de proteína

MPO en el pulmón como un marcador para neutrófilos (los niveles de proteína MPO se midieron mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas. Los niveles de proteína MPO en el pulmón se expresaron como cantidad de proteína MPO (µg) por lóbulo pulmonar) (Figura 6).

La administración combinada de REGN3500 y dupilumab en ratones expuestos a HDM durante 19 semanas, pero no ninguno de los anticuerpos por sí solo, redujo significativamente los niveles de infiltración pulmonar mediante eosinófilos activados en comparación con la administración de un anticuerpo de control de isotipo. Nótese que, los niveles de infiltración mediante eosinófilos activados en los ratones a los que se les administró REGN3500 y dupilumab en combinación también se redujeron significativamente en comparación con los niveles inducidos por la exposición a HDM durante 11 semanas, que corresponde al comienzo del tratamiento, Figura 4A. Si bien la administración de cualquiera de los anticuerpos solo no dio como resultado efectos significativos, se observó una tendencia a una infiltración pulmonar reducida por los eosinófilos activados en ratones a los que se les administró dupilumab. Los ratones expuestos a HDM a los que se les administró REGN3500 y dupilumab en combinación también presentaron una tendencia a una reducción de la infiltración pulmonar inducida por HDM por eosinófilos

totales (Figura 4B).

En los ratones expuestos a HDM durante 19 semanas a los que se les administró REGN3500 solo o en combinación con dupilumab, los niveles de infiltración pulmonar por linfocitos T ST2⁺ CD4⁺ fueron significativamente menores en comparación con los niveles en ratones a los que se les administró control de isotipo, y en comparación con los niveles inducidos por exposición a HDM durante 11 semanas al comienzo del tratamiento (Figura 5). Se observó un bloqueo similar de la infiltración (frecuencias promedio dentro de 1.02 veces) para REGN3500 solo y en combinación con dupilumab, lo cual indica que esta patología está impulsada principalmente por IL-33.

De manera similar a la infiltración eosinofílica, la administración combinada de REGN3500 y dupilumab mostró un efecto más fuerte sobre el bloqueo de infiltración pulmonar eosinofílica que cualquiera de los anticuerpos solo. Los aumentos inducidos por la exposición a HDM en los niveles de proteína en el pulmón de mieloperoxidasa (MPO), un marcador de infiltración eosinofílica, fueron bloqueados de forma significativamente por la administración combinada de REGN3500 y dupilumab en comparación con el control de isotipo (Figura 6). Si bien la administración de cualquiera de los anticuerpos solo no dio como resultado efectos

significativos, se observó una tendencia a niveles reducidos de proteína MPO en el pulmón en los ratones a los que se les administró REGN3500.

5 **Análisis del nivel de citocina en tejido pulmonar**

Se evaluó el efecto de la exposición a HDM y tratamiento con anticuerpo sobre los niveles de proteína en el pulmón (proteína total por lóbulo) para citocinas de ratón IL-5, IL-13, IL-6, IL-1 β , IL-12p70, TNF α , IFN γ , GRO α , y MCP-1, y para la citocina humana hIL-4.

Se extrajeron los pulmones (lóbulos superior y medio del pulmón derecho) y se midieron los niveles de proteína de las citocinas de ratón indicadas mediante inmunoensayo multiplexado. Los niveles de proteína IL-4 humana (hIL-4) se detectaron mediante el uso de un kit de ELISA disponible en el mercado. Los niveles de proteína IL-5 (Figura 7A) e IL-6 (Figura 7B) se midieron mediante inmunoensayo multiplexado. Los niveles de proteína citocina en tejido pulmonar se calcularon como cantidad de proteína (pg) por lóbulo pulmonar. Se generó un mapa térmico coloreado falso (no se muestra aquí) para denotar las citocinas relativas en el intervalo entre amarillo claro y azul oscuro. Se creó una escala de niveles de citocina en pulmón relativos al definir el nivel de proteína en pulmón promedio más bajo y más alto

registrado para cada citocina separada como 0 % (amarillo claro) y 100 % (azul oscuro), respectivamente. Los niveles (%) de proteína citocina en pulmón relativos se indican mediante números y por color en el mapa térmico. La
5 significación se determinó mediante ANOVA de una vía de Kruskal-Wallis con una prueba post hoc de comparación múltiple de Dunn.

Los resultados para IL-12p70 fueron por debajo del límite inferior de cuantificación para todos los grupos y, por lo
10 tanto, no se informa en la presente.

Ocho citocinas (hIL-4, IL-5, IL-6, IL-13, IL-1 β , TNF α , GRO α y MCP-1) presentaron aumentos significativos en los niveles de proteína en el pulmón en respuesta a la exposición a HDM durante 19 semanas en comparación con los ratones de control
15 expuestos a solución salina. Solamente IFN γ no presentó aumentos significativos en los niveles de proteína en el pulmón en respuesta a la exposición a HDM durante 19 semanas en comparación con los ratones de control expuestos a solución salina, ni tampoco se vieron afectados los niveles
20 de IFN γ por la administración terapéutica de anticuerpo en comparación con los ratones expuestos a HDM durante 19 semanas a los que se les administró anticuerpo de control de isotipo. Los aumentos inducidos por la exposición a HDM de los niveles de proteína en el pulmón de 5 citocinas (hIL-4,

IL-6, $\text{TNF}\alpha$, $\text{GRO}\alpha$ y MCP-1) se vieron bloqueados de forma significativa por la administración combinada de REGN3500 y dupilumab, pero no por la administración de cualquiera de los anticuerpos solo, en comparación con los ratones a los que se les administró anticuerpo de control de isotipo.

Otras 2 citocinas que responden a la exposición a HDM (IL-5 e IL- 1β) presentaron tendencias al bloqueo mediante el tratamiento combinado con REGN3500 y dupilumab, con una reducción del 83 % y 78 % de niveles de proteína en el pulmón, respectivamente, en comparación con los ratones a los que se les administró anticuerpo de control de isotipo (Figuras 7A y 7B). La administración de anticuerpos individuales dio como resultado una tendencia menos pronunciada de reducción de los niveles de IL-5 e IL- 1β .

15

Análisis de SAA, un marcador sistémico de inflamación

Cuatro días después de última exposición e inyección de anticuerpo, se extrajo sangre entera mediante punción cardíaca y se aisló el suero. Los niveles de proteína SAA circulante se midieron mediante el uso de un kit de ELISA disponible en el mercado. Los niveles de proteína SAA circulante se expresan como cantidad de proteína SAA (μg) por mL de suero. Los niveles de proteína circulante del marcador sistémico de inflamación SAA aumentaron significativamente en

los ratones expuestos a HDM durante 19 semanas en comparación con los ratones de control expuestos a solución salina (Figura 8).

Los aumentos inducidos por la exposición a HDM de los niveles de SAA circulante se vieron reducidos significativamente en ratones a los que se les administró REGN3500 solo o en combinación con dupilumab (Figura 8), mientras que se observó una tendencia a niveles de SAA reducidos en ratones a los que se les administró dupilumab solo.

10

Cuantificación de respuestas alérgicas humorales después de la exposición a HDM

Cuatro días después de última exposición e inyección de anticuerpo, se extrajo sangre entera mediante punción cardíaca y se aisló el suero. Los niveles de proteína IgE circulante se midieron mediante el uso de un kit de ELISA disponible en el mercado. Los niveles de proteína IgE circulante se expresan como cantidad de proteína IgE (μg) por mL de suero.

Las respuestas alérgicas humorales fueron elicítadas por la exposición a HDM, según se evaluó mediante los niveles de IgE circulante (Figura 15) e IgG1 específica de HDM (Tabla 9) al final del estudio (día 134).

Los niveles de proteína circulante de IgE aumentaron

significativamente en los ratones expuestos a HDM durante 19 semanas en comparación con los ratones de control expuestos a solución salina (Figura 9). Las titulaciones promedio para IgG1 específica de HDM circulante aumentaron de $1.14\text{E}+02$ en 5 ratones de control expuestos a solución salina hasta niveles que oscilan entre $1.37\text{E}+06$ y $2.43\text{E}+06$ en ratones expuestos a HDM durante 19 semanas (Tabla 15). No se observó un efecto estadísticamente significativo de REGN3500, dupilumab o el tratamiento de combinación para cualquiera de estos criterios 10 de valoración, pero se observó una tendencia a niveles de IgE en suero reducidos en los ratones a los que se les administró una combinación de REGN3500 y dupilumab.

15

20

Tabla 15: Resumen de concentraciones en suero de IgG1 específica d HDM

IgG1 especí fica de HDM en suero (titul ación)	Soluc ión salin a 19 seman as	HDM 11 seman as	HDM 19 semanas				
			Sin anticue rpo	IgG4 ^P	REGN35 00 + IgG4 ^P	Dupilu mab + IgG4 ^P	REG N35 00 + Dup ilu mab
Promed io	1.14E +02	2.19E +06	2.43E+ 06	2.14E+0 6	1.47 E+06	1.37E+ 06	1.2 1E+ 06
SD	6.15E +01	1.07E +06	9.81E+ 05	5.60E+0 5	1.17 E+06	5.79E+ 05	5.2 9E+ 05

Cuantificación de concentraciones en suero de anticuerpos humanos

La concentración en suero de anticuerpos de IgG4^P humanos (control de isotipo de IgG4^P, REGN3500 y dupilumab) se determinó al final del estudio (día 134), cuatro días después de la última administración de anticuerpo, mediante ELISA de IgG4 anti-humana específica del objetivo. Las concentraciones

promedio de anticuerpos IgG4 humanos se resume en la Tabla 16

Tabla 16: Niveles en suero de anticuerpo humano al final del estudio

5		Niveles en suero de anticuerpo, promedio ± SD (µg/mL)						
10		Solución salina 19 semanas	HDM 11 semanas	HDM 19 semanas	HDM 19 semanas	HDM 19 semanas	HDM 19 semanas	HDM 19 semanas
15						REGN350	Dupiluma	REGN350
						0	b	0
						(1 mg/kg) + Dupilumab (10 mg/kg)	(1 mg/kg) + IgG4 ^P (10 mg/kg)	(1 mg/kg) + IgG4 ^P (10 mg/kg)
20	REGN350 0	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	n/t	11.4±10.1	n/t	12.7±8.8
	Dupilumab	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	n/t	n/t	8.0±13.5	48.9±27.9
	IgG4 ^P	0.0±0.0 ^a	<LLOQ	<LLOQ	54.5±63.9	88.6±76.0	0.1±0.1	n/t

^a Un ratón en este grupo tuvo niveles de IgG4^P en suero >LLOQ, por lo tanto, se informa un valor redondeado aquí.

SUMARIO

En comparación con los ratones de control expuestos únicamente a solución salina, los ratones expuestos a HDM durante 19 semanas presentaron aumentos significativos en
5 todos, excepto uno (niveles de IFN γ en el pulmón) de los 14 marcadores patológicos medidos de inflamación cuando se dejaron sin tratar o después de la administración de un anticuerpo de control de isotipo de IgG4^P.

La administración combinada de REGN3500 y dupilumab bloqueó
10 significativamente 10/13 de los criterios de valoración que responden a la exposición a HDM en comparación con el anticuerpo de control de isotipo (peso pulmonar relativo, infiltración pulmonar por eosinófilos activados, neutrófilos [niveles de MPO] y linfocitos T ST2⁺ CD4⁺, niveles de proteína
15 en el pulmón de citocinas hIL-4, IL-6, TNF α , GRO α y MCP-1, y niveles en suero de SAA). Además, los niveles de infiltración pulmonar mediante eosinófilos activados y linfocitos T ST2⁺ CD4⁺ se redujeron significativamente a niveles por debajo de los observados para ratones expuestos a HDM durante 11
20 semanas, lo cual corresponde al comienzo del tratamiento con anticuerpo. La administración de dupilumab solo no bloqueo de forma significativa ninguno de los 13 criterios de valoración de respuesta a la exposición a HDM evaluados en este modelo, mientras que la administración de REGN3500 solo bloqueó de

forma significativa 2 criterios de valoración evaluados: infiltración pulmonar de linfocitos T ST2⁺ CD4⁺ T y niveles de SAA circulante. Para estos 2 criterios de valoración, el bloqueo mediado por REGN3500 solo fue similar al bloqueo
5 mediado por REGN3500 en combinación con dupilumab, lo cual sugiera que estos marcadores patológicos están impulsados principalmente por IL-33.

La administración combinada de REGN3500 y dupilumab presentó una tendencia al bloqueo de las respuestas inducidas por la
10 exposición a HDM para otros 3 criterios de valoración que responden a la exposición a HDM sin alcanzar significancia estadística (infiltración pulmonar por eosinófilos [totales], niveles de proteína en el pulmón de citocinas IL-5 e IL-1 β , y niveles de proteína en suero de IgE). Para estos marcadores,
15 el tratamiento con anticuerpo individual con REGN3500 o dupilumab dio como resultado en general una reducción más débil que el tratamiento combinado.

Todos los grupos de tratamiento con anticuerpo estuvieron asociados con niveles en suero detectables para los
20 anticuerpos IgG4 humanos específicos del objetivo al final del estudio. En los ratones que recibieron dosis dos veces por semana durante 8 semanas, ya sea con anticuerpo terapéutico solo o en combinación, las concentraciones en suero promedio de REGN3500 fueron de 11.4 $\pm$ 10.1 y 12.7 $\pm$ 8.8

µg/mL, respectivamente, y las concentraciones en suero promedio de dupilumab fueron 8.0 ± 13.5 y 48.9 ± 27.9 µg/mL, respectivamente, al final del estudio.

En conclusión, el tratamiento combinado con REGN3500 y
 5 dupilumab en un modelo de inflamación pulmonar inducida por la exposición a HDM durante 19 semanas que utiliza ratones *Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu} Il133^{hu/hu}* dio como resultado una mejora más pronunciada en casi todas las patologías pulmonares evaluadas y los marcadores de inflamación en comparación con el
 10 tratamiento con cualquiera de los anticuerpos solo.

CONCLUSIÓN

El tratamiento combinado con REGN3500 y dupilumab en un modelo de inflamación pulmonar inducida por la exposición a
 15 HDM durante 19 semanas que utiliza ratones *Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu} Il133^{hu/hu}* dio como resultado una mejora más pronunciada en casi todas las patologías pulmonares evaluadas y los marcadores de inflamación en comparación con el tratamiento con cualquiera de los anticuerpos solo.

20

Ejemplo 7: Evaluación de SAR440340/REGN3500 o dupilumab cuando se usan solos o cuando se usan como terapia de combinación en pacientes con EPOC de moderada a grave

Diseño del estudio

Este estudio es un estudio de prueba de concepto de 24 semanas, de grupos paralelos, controlado por placebo, doble ciego y aleatorizado para evaluar la eficacia, seguridad y tolerabilidad de un anticuerpo monoclonal de IL-33 (SAR440340/REGN3500), un anticuerpo monoclonal de IL-4R (dupilumab, también conocido como DUPIXENT®), cuando cada uno se utiliza solo o cuando se usan en combinación en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) de moderada a grave.

Un total de ochocientos treinta y dos sujetos participará de este estudio. El estudio consistirá en cuatro grupos, un grupo de pacientes al que se le administrará el anticuerpo monoclonal anti-IL33 (SAR440340/REGN3500) por vía subcutánea (SC) solo; al segundo grupo de pacientes se le administrará el anticuerpo monoclonal anti-IL4R (dupilumab) por vía subcutánea solo; al tercer grupo de pacientes se le administrarán SAR440340/REGN3500 y dupilumab por vía subcutánea; y el cuarto grupo es de placebo.

Los pacientes en el grupo 1 recibirán 2 inyecciones SC de SAR440340/REGN3500 cada 2 semanas durante 24 semanas y se coadministrará el placebo de dupilumab como 1 inyección SC cada 2 semanas durante 24 semanas; los pacientes en el grupo 2 recibirán 1 inyección SC de dupilumab cada 2 semanas durante 24 semanas y se coadministrará el placebo de

SAR440340/REGN3500 como 2 inyecciones SC cada 2 semanas durante 24 semanas; los pacientes en el grupo 3 recibirán 2 inyecciones SC de SAR440340/REGN3500 cada 2 semanas durante 24 semanas y se coadministrará dupilumab como 1 inyección SC cada 2 semanas durante 24 semanas; los pacientes en el grupo 4 recibirán placebos coincidentes para SAR440340/REGN3500 y dupilumab administrados como 2 y 1 inyección SC, respectivamente, cada 2 semanas durante 24 semanas.

10 **Objetivos del estudio**

El objetivo principal de este estudio es determinar y comparar los efectos de un anticuerpo de interleucina-33 (SAR440340/REGN3500), un anticuerpo monoclonal del receptor de interleucina-4 (dupilumab) y la coadministración de ambos, en comparación con el placebo, en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) de moderada a grave que han recibido tratamiento con un corticosteroide inhalado (ICS), un agonista adrenérgico β_2 de acción prolongada (LABA), un agonista muscarínico de acción prolongada (LAMA) y/o terapia de fondo (terapia doble o triple) sobre la mejora de la función respiratoria, según se evalúa mediante un volumen forzado de broncodilatador en 1 segundo (FEV1) durante 24 semanas.

Los objetivos secundarios serán evaluar los efectos de

SAR440340/REGN3500, dupilumab y la coadministración de ambos, cada uno comparado con el placebo, sobre la incidencia de exacerbaciones agudas de EPOC (AECOPD, por sus siglas en inglés) de moderadas a agudas durante 24 semanas de tratamiento.

Otro objetivo secundario es evaluar los efectos de SAR440340/REGN3500, dupilumab y la coadministración de ambos, cada uno en comparación con placebo, sobre: FEV1 antes del broncodilatador durante 24 semanas; duración desde el valor inicial del primer evento de AECOPD de moderado a grave durante 24 semanas; evaluación clínica de síntomas de EPC; seguridad y tolerabilidad.

Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión para el estudio son los siguientes: (1) Pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) de moderada a grave (después de un volumen espiratorio forzado en un segundo (FEV1) por broncodilatador, capacidad vital forzada (FVC) $< 70\%$ y $\%$ de FEV1 después del broncodilatador previsto $< 80\%$, pero $\geq 30\%$); (2) pacientes con un puntaje de prueba de evaluación de EPOC (CAT, por sus siglas en inglés) ≥ 10 durante la visita 1 de selección y la visita 2/aleatorización; (3) pacientes con historial observado de signos y síntomas de bronquitis crónica (tos

productiva crónica durante 3 meses en un año hasta la selección en un paciente en el cual se han excluido otras causas para la tos crónica (por ejemplo, reflujo gastroesofágico, rinosinusitis crónica, bronquiectasia); (4) 5 pacientes con un historial documentado de ≥ 2 exacerbaciones moderadas o ≥ 1 exacerbación grave dentro del año antes de la selección; (5) pacientes con terapia de fondo de estándar de cuidado durante 3 meses antes de la visita 2/aleatorización y con una dosis estable durante al menos 1 mes antes de la 10 visita 1 de selección, inclusive cualquiera de: terapia doble: Antagonista β de acción prolongada (LABA) + antagonista muscarínico de acción prolongada (LAMA) o corticosteroide inhalado (ICS) + LABA o ICS + LAMA; o terapia triple: ICS + LABA + LAMA; (6) firma del consentimiento 15 informado; y (7) fumadores actuales o pasados con un historial de tabaquismo ≥ 10 paquetes/año.

Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión para el estudio son los 20 siguientes: (1) Edad ≤ 40 años o > 75 años; (2) pacientes con un índice de masa corporal (BMI, por sus siglas en inglés) < 16 ; (3) pacientes con diagnóstico de EPOC dentro de los 6 meses anteriores a la aleatorización; (4) un diagnóstico actual de asma de acuerdo con las pautas de la Iniciativa

Mundial de Asma (GINA, por sus siglas en inglés); (5) enfermedad pulmonar importante distinta de EPOC (por ejemplo, fibrosis pulmonar, sarcoidosis, enfermedad pulmonar intersticial, hipertensión pulmonar, bronquiectasia, granulomatosis eosinofílica con poliangiitis, apnea del sueño significativa de presión positiva de dos niveles en la vía aérea, etc.) u otra enfermedad sistémica o pulmonar diagnosticada asociada con conteos elevados de eosinófilos periféricos; (6) diagnóstico de deficiencia anti-tripsina α -1; (7) EPOC avanzada con necesidad de apoyo de oxígeno crónico (>15 horas/día); (8) pacientes con exacerbación aguda de EPOC moderada o grave dentro de las 4 semanas antes de la selección; (9) un paciente que haya experimentado una infección del tracto respiratorio superior o inferior dentro de las 4 semanas antes de la selección/visita 1 o durante el período de selección; (10) historial previo de cirugía de reducción del volumen pulmonar o neumonectomía planificada; (11) pacientes con historial de una reacción de hipersensibilidad sistémica a un fármaco biológico.

Ejemplo 8. Evaluación de SAR440340/REGN3500 o dupilumab cuando se usan solos o cuando se usan como terapia de combinación en pacientes con asma de moderada a grave

Diseño del estudio

El estudio es un estudio de prueba de concepto (PoC) de 12

semanas, de grupos paralelos, controlado por placebo, doble ciego y aleatorizado para evaluar la eficacia, seguridad y tolerabilidad de SAR440340/REGN3500, dupilumab (también conocido como DUPIXENT®), y de la coadministración de SAR440340 y dupilumab en pacientes con asma de moderada a grave que no están bien controlados con terapia de corticosteroide inhalado (ICS) más un agonista adrenérgico β_2 de acción prolongada (LABA).

Un total de ochocientos sujetos participará de este estudio. El estudio consistirá en cuatro grupos, un grupo de pacientes al que se le administrará el anticuerpo monoclonal anti-IL33 (SAR440340/REGN3500) por vía subcutánea (SC) solo; al segundo grupo de pacientes se le administrará el anticuerpo monoclonal anti-IL4R (dupilumab) por vía subcutánea solo; al tercer grupo de pacientes se le administrarán SAR440340/REGN3500 y dupilumab por vía subcutánea; y el cuarto grupo es de placebo.

Los pacientes en el grupo 1 recibirán SAR440340/REGN3500 administrado como 2 inyecciones subcutáneas (SC) cada 2 semanas durante 12 semanas y coadministración de placebo de dupilumab como 1 inyección SC cada 2 semanas durante 12 semanas; los pacientes en el grupo 2 recibirán dupilumab administrado como 1 inyección SC cada 2 semanas durante 12 semanas y coadministración de placebo de SAR440340/REGN3500

como 2 inyecciones SC cada 2 semanas durante 12 semanas; los
pacientes en el grupo 3 recibirán SAR440340/REGN3500
administrado como 2 inyecciones SC cada 2 semanas durante 12
semanas y coadministración de dupilumab administrado como 1
5 inyección SC cada 2 semanas durante 12 semanas; los pacientes
en el grupo 4 recibirán coadministración placebos
coincidentes para SAR440340/REGN3500 y dupilumab
administrados como 2 y 1 inyección SC, respectivamente, cada
2 semanas durante 12 semanas.

10

Objetivos del estudio

El objetivo principal del estudio es evaluar los efectos de
SAR440340/REGN3500 con o sin dupilumab, en comparación con
placebo, sobre la reducción de la incidencia de eventos de
15 "pérdida de control de asma" (LOAC).

Los objetivos secundarios del estudio serán evaluar los
efectos de SAR440340/REGN3500 y la coadministración de
SAR440340/REGN3500 y dupilumab, en comparación con placebo
sobre el volumen espiratorio forzado en 1 segundo (FEV1);
20 para evaluar los efectos de la coadministración de
SAR440340/REGN3500 y dupilumab en comparación con
SAR440340/REGN3500 y en comparación con dupilumab sobre FEV1;
para evaluar los efectos simultáneos de la administración de
SAR440340/REGN3500 y dupilumab en comparación con

SAR440340/REGN3500 solo y dupilumab solo sobre la reducción de LOAC; y para evaluar la secundario y tolerabilidad de SAR440340/REGN3500 solo y en coadministración con dupilumab.

5 Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión para el estudio son los siguientes: **(1)** Pacientes adultos (18 años o más) con diagnóstico médico de asma por al menos 12 meses basado en las pautas de la Iniciativa Mundial para el Asma (GINA) 2016
 10 cuya asma esté parcialmente controlada o no controlada con una terapia de combinación de ICS/LABA con los siguientes criterios: tratamiento existente con corticosteroides inhalados (ICS) de dosis media a alta (≥ 250 mcg de propionato de fluticasona dos veces al día (BID) o dosificación diaria
 15 de ICS de igual potencia hasta un máximo de 2000 mcg/día de propionato de fluticasona o clínicamente similar) en combinación con un agonista beta de acción prolongada (LABA) como segundo controlador durante al menos 3 meses con una dosis estable ≥ 1 mes antes de la visita 1; (2) volumen
 20 espiratorio forzado en 1 segundo (FEV1) antes del broncodilatador $\geq 50\%$ pero $\leq 85\%$ del normal previsto en la visita 2/inicio; (3) reversibilidad de al menos 12 % y 200 mL en FEV1 después de la administración de 2 a 4 disparos (200-400 mcg) de albuterol/salbutamol o

levalbuterol/levosalbutamol durante la selección (hasta 3 oportunidades durante la misma visita se permiten con un máximo de 12 disparos de medicación de alivio si es tolerada por el paciente); historial documentado de viabilidad del 20 % en FEV1 antes del broncodilatador en comparación con 2 evaluaciones espirométricas aceptables dentro de los 6 meses antes de la visita 1/selección o una hiperrespuesta positiva de las vías respiratorias a metacolina dentro de los 12 meses anteriores a la visita 1/selección se considera aceptable para cumplir con este criterio de inclusión; (4) debe haber experimentado, dentro de 1 año antes de la visita 1, cualquiera de los siguientes eventos, al menos una vez: tratamiento con un esteroide sistémico (oral o parenteral) para el empeoramiento del asma, u hospitalización o visita médica de emergencia por el empeoramiento del asma; (5) consentimiento informado firmado.

Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión para el estudio son los siguientes: (1) Pacientes <18 años >70 años de edad (es decir, que hayan alcanzado los 71 años al momento de la visita de selección); (2) pacientes con un índice de masa corporal (BMI) <16; (3) enfermedad pulmonar crónica (por ejemplo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica [EPOC], o

fibrosis pulmonar idiopática [IPF]) que pueda obstaculizar la función pulmonar; (4) historial de asma que ponga en riesgo la vida (es decir, exacerbación grave que requiera intubación); (5) enfermedad comórbida que pueda interferir con la evaluación de IMP; (6) pacientes con los siguientes eventos dentro de las 4 semanas antes de su visita 1 de selección: tratamiento con 1 o más estallidos sistémicos (orales y/o parenterales) de esteroides para el empeoramiento del asma u hospitalización o visita médica de emergencia por el empeoramiento del asma; (7) puntaje cuestionario de control del asma, versión de 5 preguntas (ACQ-5) <1.25 o >3.0 en V2/aleatorización. Durante el período de selección un ACQ-5 de hasta ≤ 4 es aceptable; (8) terapia anti-inmunoglobulina E (IgE) (por ejemplo, omalizumab [Xolair®]) dentro de 130 días antes de la visita 1 o cualquier otra terapia biológica (inclusive mAb anti-IL5) o inmunosupresor sistémico (por ejemplo, metotrexato) para tratar una enfermedad autoinmunitaria (por ejemplo, artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria, cirrosis biliar primaria, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, etc.) y otras enfermedades, dentro de los 2 meses o 5 semividas antes de la visita 1, lo que pase después; (9) pacientes con un historial de reacción de hipersensibilidad sistémica a un fármaco biológico; (10) pacientes al inicio o con

termoplastia bronquial dentro de los 2 años antes de la visita 1 o planes de comenzar la terapia durante el período de selección o el período de tratamiento aleatorizado; (11) fumador actual o cese del tabaquismo dentro de los 6 meses antes de la visita 1; (12) fumador previo con un historial de tabaquismo de > 10 paquetes por año.

10

KAM\KAM\ID-785388\WPC16813

15

20