

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 817 756**

51 Int. Cl.:

C12P 21/08 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2007** E 17209717 (2)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020** EP 3339445

54 Título: **Proteínas de unión a interleuquina-13**

30 Prioridad:

08.09.2006 US 843249 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

08.04.2021

73 Titular/es:

**ABBVIE BAHAMAS LTD. (100.0%)
Sassoon House, Shirley Street & Victoria Avenue
New Providence, Nassau, BS**

72 Inventor/es:

**WU, CHENGBIN;
DIXON, RICHARD, W.;
BELK, JONATHAN, P.;
YING, HUA;
ARGIRIADI, MARIA, A.;
CUFF, CAROLYN, A.;
HINTON, PAUL, R.;
KUMAR, SHANKAR;
MELIM, TERRY, L. y
CHEN, YAN**

74 Agente/Representante:

PADIAL MARTÍNEZ, Ana Belén

ES 2 817 756 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteínas de unión a interleuquina-13

5 **Referencia cruzada a solicitud relacionada**

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad del documento de solicitud provisional de Estados Unidos n.º 60/843.249 presentado el 8 de septiembre de 2006.

10 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a proteínas de unión a IL-13, y específicamente a sus usos en la prevención y/o tratamiento de diversas enfermedades que incluyen asma, alergia, COPD, fibrosis, y cáncer.

15 **Antecedentes de la invención**

IL-13 humana es una glicoproteína de 17 kDa clonada a partir de linfocitos T activados y (Zurawski y de Vries 1994 Immunol Today 15 19-26), y se produce por linfocitos T activados del linaje Th2, aunque los linfocitos T CD4+ Th0 y Th1, linfocitos T CD8+ y varias poblaciones de células que no son linfocitos T, tales como mastocitos también producen IL-13. La función de IL-13 incluye el intercambio de isotipo de inmunoglobulina a IgE en linfocitos B humanos (Punnonen, Aversa *et al.* 1993 Proc Natl Acad Sci USA 90 3730-4) y la supresión de producción de citoquinas inflamatorias tanto en sujetos humanos como en ratones (de Waal Malefyt, Figdor *et al.* 1993 J Immunol 151 6370-81; Doherty, Kastelein *et al.* 1993 J Immunol 151 7151-60). IL-13 se une a sus receptores de superficie celular, IL-13Ralfa1 e IL-13Ralfa2. IL-13Ralfa1 interactúa con IL-13 con baja afinidad (KD ~ 10 nM), seguido de reclutamiento de IL-4Ra para formar el complejo receptor heterodímero de señalización de alta afinidad (KD ~ 0,4 nM) (Aman, Tayebi *et al.*, 1996 J Biol Chem 271 29265-70; Hilton, Zhang *et al.* 1996 Proc Natl Acad Sci USA 93 497-501). El complejo IL-4R/IL-13Ralfa1 se expresa en numerosos tipos de células tales como linfocitos B, monocitos/macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, basófilos, fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales de las vías respiratorias, y células musculares lisas de las vías respiratorias (Graber, Gretener *et al.* 1998 Eur J Immunol 28 4286-98; Murata, Husain *et al.* 1998 Int Immunol 10 1103-10; Akaiwa, Yu *et al.* 2001 Cytokine 13 75-84). El ligamiento del complejo receptor IL-13Ralfa1/IL-4R da como resultado la activación de una diversidad de rutas de transducción de señales incluyendo las rutas del transductor y activador de la señal de transcripción (STAT6) y del sustrato 2 del receptor de insulina (IRS-2) (Wang, Michieli *et al.* 1995 Blood 86 4218-27; Takeda, Kamanaka *et al.* 1996 J Immunol 157 3220-2). La cadena de IL-13Ralfa2 por sí sola tiene alta afinidad (KD ~ 0,25-0,4 nM) por IL-13, y funciona tanto como receptor señuelo que regula negativamente la unión de IL-13 (Donaldson, Whitters *et al.* 1998 J Immunol 161 2317-24), como receptor de señalización que induce síntesis de TGF- β y fibrosis a través de la ruta de AP-1 en macrófagos y posiblemente otros tipos de células (Fichtner-Feigl, Strober *et al.* 2006 Nat Med 12 99-106).

40 Varios estudios realizados en modelos preclínicos de asma en animales indican que IL-13 desempeña un importante papel en el asma. Estos datos incluyen resistencia al asma en ratones con inactivación génica de IL-13 así como inhibición del fenotipo de asma con antagonistas de IL-13 (receptores solubles de IL-13, mAb anti-IL-13, etc.) en diversos modelos en ratón (Sela 1999 Harefuah 137 317-9; Wills-Karp y Chiaramonte 2003 Curr Opin Pulm Med 9 21-7; Wills-Karp 2004 Immunol Rev 202 175-90). Múltiples estudios han demostrado que la administración farmacológica de IL-13 recombinante a los pulmones de ratones así como de cobayas induce hipersecreción de mucosidad en las vías respiratorias, eosinofilia y AHR (Grunig, Warnock *et al.* 1998 Science 282 2261-3; Wills-Karp, Luyimbazi *et al.* 1998 Science 282 2258-61; Kibe, Inoue *et al.* 2003 Am J Respir Crit Care Med 167 50-6; Vargaftig y Singer 2003 Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 284 L260-9; Vargaftig y Singer 2003 Am J Respir Cell Mol Biol 28 410-9). Estos efectos de IL-13 se reproducen en sistemas transgénicos en ratones con expresión constitutiva o inducible de IL-13 (Zhu, Homer *et al.* 1999 J Clin Invest 103 779-88; Zhu, Lee *et al.* Am J Respir Crit Care Med 164 S67-70; Lanone, Zheng *et al.* 2002 J Clin Invest 110 463-74). La sobreexpresión transgénica crónica de IL-13 también induce fibrosis subepitelial y enfisema. Los ratones deficientes en la molécula de señalización de IL-13 (e IL-4) STAT6 fracasan a la hora de desarrollar AHR inducida por alérgeno y sobreproducción de mucosidad (Kuperman, Huang *et al.* Nat Med 8 885-9). Estudios que usan una proteína de fusión receptora de IL-13 soluble (siIL-13R α 2Fc) han demostrado el papel principal de esta citoquina en enfermedad experimental de las vías aéreas inducida por el alérgeno ovoalbúmina (OVA) (Grunig, Warnock *et al.* 1998 Science 282 2261-3; Wills-Karp, Luyimbazi *et al.* 1998 Science 282 2258-61; Taube, Duez *et al.* 2002 J Immunol 169 6482-9). La eficacia de un tratamiento con anti-IL-13 también se ha demostrado en un modelo crónico de asma murino. Además de exhibir los rasgos de hipersecreción de mucosidad y AHR, este modelo de asma crónica muestra varias características distintivas de la enfermedad humana de las que carecen los modelos más agudos. Estas incluyen eosinofilia del tejido pulmonar situado en los espacios interepiteliales así como fibrosis del músculo liso medida mediante el aumento en la deposición de colágeno. El modelo de asma crónica se induce mediante provocaciones en aerosol repetidas con OVA en ratones sensibilizados con OVA una vez por semana durante un total de 4 semanas. El anticuerpo anti-IL-13 administrado durante las 2 últimas semanas de las provocaciones con OVA (desde el día 36 con lecturas de eficacia evaluadas en el día 53 de estudio) inhibió significativamente AHR, inflamación pulmonar, hiperplasia de células calciformes, hipersecreción de mucosidad, y fibrosis de las vías respiratorias (Yang, Li *et al.* 2005 J Pharmacol Exp Ther).

Además, también se ha demostrado que el efecto terapéutico de un antagonista de IL-13 inhibe AHR en un modelo de asma en primates [Resumen, American Thoracic Society 2005].

IL-13 está implicada en la patogénesis de asma humana dado que se han detectado niveles elevados de ARNm de IL-13 y proteína en los pulmones de pacientes asmáticos, que correlaciona con la gravedad de la enfermedad (Huang, Xiao *et al.* 1995 J Immunol 155 2688-94). Además, se han identificado polimorfismos genéticos de IL-3 humanos, que conducen a niveles elevados de IL-13 y están asociados con asma y atopía (Heinzmann, Mao *et al.* 2000 Hum Mol Genet 9 549-59; Hoerauf, Kruse *et al.* 2002 Microbes Infect 4 37-42; Vercelli 2002 Curr Opin Allergy Clin Immunol 2 389-93; Heinzmann, Jerkic *et al.* 2003 J Allergy Clin Immunol 112 735-9; Chen, Ericksen *et al.* 2004 J Allergy Clin Immunol 114 553-60; Vladich, Brazille *et al.* 2005 J Clin Invest), y se han detectado niveles elevados de IL-13 en los pulmones de pacientes con asma (Huang, Xiao *et al.* 1995 J Immunol 155 2688-94; Arima, Umeshita-Suyama *et al.* 2002 J Allergy Clin Immunol 109 980-7; Berry, Parker *et al.* 2004 J Allergy Clin Immunol 114 1106-9). También se ha demostrado un vínculo genético entre IL-13 y asma puesto que los individuos con un polimorfismo en el gen de IL-13 que causa mayores niveles plasmáticos de IL-13 presentan un aumento de riesgo de atopía y asma Wills-Karp 2000 Respir Res 1 19-23).

Debido al papel de la IL-13 humana en una diversidad de trastornos humanos, se han diseñado estrategias terapéuticas para inhibir o contrarrestar la actividad de IL-13. En particular, se han buscado anticuerpos que se unan a, y neutralicen, IL-13 como medio para inhibir la actividad de IL-13. Sin embargo, existe la necesidad en la técnica de anticuerpos mejorados capaces de unirse a IL-13. Preferentemente, los anticuerpos se unen a IL-13 humana. Preferentemente, los anticuerpos son capaces de neutralizar IL-13 humana. La presente invención proporciona una nueva familia de proteínas de unión, anticuerpos injertados con CDR, anticuerpos humanizados, y fragmentos de los mismos, capaces de unirse a IL-13 humana, unirse con gran afinidad, y unirse a y neutralizar IL-13 humana.

Sumario de la invención

El ámbito de la invención y diversas realizaciones de la invención se definen mediante las reivindicaciones anexas. Por lo tanto, en una primera realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-IL-13 recombinante, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde dicho anticuerpo anti-IL-13 recombinante, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende:

- (a) dos dominios variables, en donde un dominio variable comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 80 y el otro dominio variable comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 81;
- (b) una región constante de cadena pesada de IgG1 humana que comprende una región bisagra que comprende un cambio de leucina a alanina en la posición 234 (numeración EU) y un cambio de leucina a alanina en la posición 235 (numeración EU); y
- (c) una región constante de cadena ligera kappa humana.

La presente solicitud se refiere a diversos aspectos y realizaciones de la divulgación. En la medida en que tales aspectos y realizaciones estén fuera del ámbito de la presente invención como se ha definido anteriormente y se define en las reivindicaciones anexas, se presentan con fines de comparación.

La presente divulgación se refiere a proteínas de unión a IL-13. Las proteínas de unión de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, partes de unión a antígeno, y otras proteínas de unión a antígeno capaces de unirse a IL-13 humana. Además, se desvelan métodos de preparación y uso de proteínas de unión a IL-13.

Un aspecto de la divulgación se refiere a una proteína de unión capaz de unirse a IL-13. En un aspecto preferente de la divulgación, la proteína de unión se une a IL-13 humana. Preferentemente, la proteína de unión es capaz de modular una función biológica de IL-13. Más preferentemente, la proteína de unión es capaz de neutralizar IL-13.

En un aspecto de la divulgación, la proteína de unión es capaz de unirse a IL-13, y evitar la unión de IL-13 al receptor IL-13 α 1. En otro aspecto de la divulgación, la proteína de unión es capaz de unirse a IL-13, y evitar la unión de IL-13 al receptor IL-13 α 2. En un aspecto preferente de la divulgación, la proteína es capaz de unirse a IL-13, y evitar la unión de IL-13 tanto al receptor IL-13 α 1 como al receptor IL-13 α 2.

Un aspecto de la divulgación proporciona un anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une a IL-13 humana e inhibe la unión de dicha IL-13 al receptor IL-13 α 2 en un ensayo de unión a receptor basado en superficie celular con una CI_{50} seleccionada entre el grupo que consiste en aproximadamente $1,5 \times 10^{-8}$ a 1×10^{-8} M, 1×10^{-8} a 1×10^{-9} M, 10^{-9} a 10^{-10} M y 10^{-10} a 10^{-11} M o en un ensayo de unión a receptor basado en ELISA con una CI_{50} seleccionada entre el grupo que consiste en aproximadamente $1,8 \times 10^{-8}$ a 1×10^{-8} M, 1×10^{-8} a 1×10^{-9} M, 10^{-9} a 10^{-10} M y 10^{-10} a 10^{-11} M. Preferentemente, el anticuerpo se une a IL-13 humana e inhibe la unión de dicha IL-13 al receptor IL-13 α 2 en un ensayo de unión a receptor basado en superficie celular con una CI_{50} de $2,7 \times 10^{-9}$ M y en un ensayo de unión a receptor basado en ELISA con una CI_{50} de $1,1 \times 10^{-9}$ M. Preferentemente, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une a IL-13 humana e inhibe la unión de dicha IL-13 al receptor IL-13 α 2 en un ensayo de unión a receptor basado en superficie celular o en un ensayo de unión a receptor basado en ELISA en

aproximadamente un 70-100 % a una concentración de 100 nM. Preferentemente, el anticuerpo es 13C5.5. Más preferentemente, el anticuerpo no es BAK502G9, mAb13.2 o MJ2-7.

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

En un aspecto, la proteína de unión de la divulgación tiene una constante de velocidad de asociación (k_{on}) para IL-13 de al menos aproximadamente $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; al menos aproximadamente $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; al menos aproximadamente $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; al menos aproximadamente $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; o al menos aproximadamente $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, según se mide mediante resonancia plasmónica superficial. Preferentemente, la proteína de unión de la divulgación tiene una constante de velocidad de asociación (k_{on}) para IL-13 entre $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; entre $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; entre $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; entre $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, según se mide mediante resonancia plasmónica superficial.

En otro aspecto, la proteína de unión de la divulgación tiene una constante de velocidad de disociación (k_{off}) para IL-13 de al menos aproximadamente 10^{-3} s^{-1} ; al menos aproximadamente 10^{-4} s^{-1} ; al menos aproximadamente 10^{-5} s^{-1} ; o al menos aproximadamente 10^{-6} s^{-1} , según se mide mediante resonancia plasmónica superficial. Preferentemente, la proteína de unión de la divulgación tiene una constante de velocidad de disociación (k_{off}) para IL-13 de 10^{-3} s^{-1} a 10^{-4} s^{-1} ; de 10^{-4} s^{-1} a 10^{-5} s^{-1} ; de 10^{-5} s^{-1} a 10^{-6} s^{-1} , según se mide mediante resonancia plasmónica superficial.

En otro aspecto, la proteína de unión de la divulgación tiene una constante de disociación (K_D) para IL-13 de como máximo aproximadamente 10^{-7} M ; como máximo aproximadamente 10^{-8} M ; como máximo aproximadamente 10^{-9} M ; como máximo aproximadamente 10^{-10} M ; como máximo aproximadamente 10^{-11} M ; como máximo aproximadamente 10^{-12} M ; o como máximo 10^{-13} M . Preferentemente, la proteína de unión de la divulgación tiene una constante de disociación (K_D) para IL-13 de 10^{-7} M a 10^{-8} M ; de 10^{-8} M a 10^{-9} M ; de 10^{-9} M a 10^{-10} M ; de 10^{-10} M a 10^{-11} M ; de 10^{-11} M a 10^{-12} M ; o de 10^{-12} M a 10^{-13} M .

Preferentemente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une a IL-13 con características de unión seleccionadas entre el grupo que consiste en: a) una constante de velocidad de asociación (k_{on}) entre aproximadamente $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, o aproximadamente $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, a $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, o b) una constante de velocidad de disociación (k_{off}) de aproximadamente 10^{-4} s^{-1} a 10^{-5} s^{-1} ; o de aproximadamente 10^{-5} s^{-1} a 10^{-6} s^{-1} , según se mide mediante resonancia plasmónica superficial; o c) una constante de disociación (K_D) de aproximadamente $1,5 \times 10^{-10}$ a $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ o aproximadamente 10^{-10} a 10^{-11} M . Preferentemente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una constante de velocidad de asociación (k_{on}) para IL-13 seleccionada entre el grupo que consiste en: $6,68 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $7,86 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $8,35 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $8,69 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $9,15 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $1,26 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $1,7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $2,51 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Preferentemente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una constante de velocidad de disociación (k_{off}) para IL-13 seleccionada entre el grupo que consiste en: $1,23 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; $1,76 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; $4,74 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; $1,91 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; $2,14 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; $3,82 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; $8,81 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ y $9,65 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, según se mide mediante resonancia plasmónica superficial. Preferentemente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una constante de disociación (K_D) para IL-13 seleccionada entre el grupo que consiste en: $1,05 \times 10^{-10} \text{ M}$; $7,10 \times 10^{-10} \text{ M}$; $1 \times 10^{-11} \text{ M}$; $2,20 \times 10^{-11} \text{ M}$; $2,72 \times 10^{-11} \text{ M}$; $4,17 \times 10^{-11} \text{ M}$; $5,68 \times 10^{-11} \text{ M}$; $7,01 \times 10^{-11} \text{ M}$; $7,10 \times 10^{-11} \text{ M}$; y $9,79 \times 10^{-11} \text{ M}$.

Un aspecto de la divulgación se refiere a proteínas de unión capaces de unirse a un epítipo específico de IL-13. Preferentemente, el epítipo específico comprende la región de Hélice D C-terminal de IL-13 humana. Más preferentemente, el epítipo específico comprende la secuencia de aminoácidos VRDTK IEVAQ FVKDL LL HLK KLFRE GR, que corresponde a los aminoácidos 104-130 de la SEQ ID NO: 1. En otro aspecto, el anticuerpo o parte de unión a antígeno, se une a un epítipo que comprende la región de Hélice D C-terminal y la región Hélice A N-terminal de IL-13 humana. Preferentemente, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une a IL-13 humana de un modo tal que IL-13 con dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, unido al epítipo definido por las regiones topográficas Ser26-Thr27-Ala28-Leu29-Arg30-Glu31-Leu32-Ile33-Glu34-Glu35-Leu36-Val37-Asn38 y Lys123-Lys124-Leu125-Phe126-Arg127-Glu128-Gly129-Arg130 de la SEQ ID NO: 1, se inhibe de la unión al receptor de IL-13. Preferentemente, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une a IL-13 humana de un modo tal que IL-13 con dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, unido al epítipo definido por las regiones topográficas Arg30-Glu31-Leu32-Ile33-Glu34-Glu35-Leu36-Val37-Asn38 y Lys123-Lys124-Leu125-Phe126-Arg127 de la SEQ ID NO: 1, se inhibe de la unión al receptor de IL-13. Preferentemente, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une a IL-13 humana de un modo tal que IL-13 con dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, unido al epítipo definido por las regiones topográficas Ser26-Thr27-Ala28-Leu29-Arg30-Glu31-Leu32-Ile33-Glu34-Glu35-Leu36-Val37-Asn38 y Lys123-Lys124-Leu125-Phe126-Arg127-Glu128-Gly129-Arg130 de la SEQ ID NO: 1, se inhibe de la unión al

receptor IL-13 α 2. Más preferentemente, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une a IL-13 humana de un modo tal que IL-13 con dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, unido al epítipo definido por las regiones topográficas Ser26-Thr27-Ala28-Leu29-Arg30-Glu31-Leu32-Ile33-Glu34-Glu35-Leu36-Val37-Asn38 y Lys123-Lys124-Leu125-Phe126-Arg127-Glu128-Gly129-Arg130 de la SEQ ID NO: 1, se inhibe de la unión al receptor IL-13 α 2, siempre que dicho anticuerpo no sea BAK502G9 o MJ2-7. Lo más preferentemente, el anticuerpo es 13C5.5.

En un aspecto, el anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une a IL-13 y evita la unión de IL-13 al receptor IL-13 α 2 con características de unión seleccionadas entre el grupo que consiste en unión a un epítipo de IL-13 que incluye la Hélice A y D; una constante de velocidad de asociación (k_{on}) entre aproximadamente $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o aproximadamente $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; una constante de velocidad de disociación (k_{off}) de aproximadamente 10^{-4} s^{-1} a 10^{-5} s^{-1} ; o de aproximadamente 10^{-5} s^{-1} a 10^{-6} s^{-1} , según se mide mediante resonancia plasmónica superficial; y una constante de disociación (K_D) de aproximadamente $1,5 \times 10^{-10}$ a $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ o aproximadamente 10^{-10} a 10^{-11} M . En otro aspecto, el anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une a una variante de IL-13 y evita la unión de IL-13 al receptor IL-13 α 2 con características de unión seleccionadas entre el grupo que consiste en unión a un epítipo de IL-13 que incluye la Hélice A y D; una constante de velocidad de asociación (k_{on}) entre aproximadamente $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o aproximadamente $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; una constante de velocidad de disociación (k_{off}) de aproximadamente 10^{-4} s^{-1} a 10^{-5} s^{-1} ; o de aproximadamente 10^{-5} s^{-1} a 10^{-6} s^{-1} , según se mide mediante resonancia plasmónica superficial; y una constante de disociación (K_D) de aproximadamente $1,5 \times 10^{-10}$ a $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ o aproximadamente 10^{-10} a 10^{-11} M .

En un aspecto, la divulgación proporciona una proteína de unión capaz de unirse a IL-13, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

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

X₁ es T, D, G, o S;
 X₂ es S;
 X₃ es D;
 X₄ es M, S, Y, L, o H;
 X₅ es G, W, Y, A, S, o N;
 X₆ es V, I, o M; y
 X₇ es D, H, S, Y, N, o G;

CDR-H2. X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-X₁₅-X₁₆-X₁₇ (SEQ ID NO: 65), en donde;

X₁ es M, E, H, R, S, G, o L;
 X₂ es I o no está presente;
 X₃ es H, Y, A, D, S, o W;
 X₄ es P, S, W, o G;
 X₅ es S, G, E, o D;
 X₆ es D, G, S, E, o N;
 X₇ es S, Y o G;
 X₈ es E, N, Y, V, o R;
 X₉ es T, I, o K;
 X₁₀ es R, Y, I, D, o A;
 X₁₁ es L, Y, D, o F;
 X₁₂ es N, P, S, o D;
 X₁₃ es Q, E, D, P, o S;
 X₁₄ es K, M, S, T, A, o V;
 X₁₅ es F, L, V, o M;
 X₁₆ es K, R, o Q; y
 X₁₇ es D, G, o S;

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

X₁ es W, T, G, Y, D, o I;
 X₂ es R, A, S, G, o V;
 X₃ es T, F, Y, o S;
 X₄ es S, T, o Y;
 X₅ es Y, F, o G;
 X₆ es F, o Y;
 X₇ es S, Y, I, o F;
 X₈ es D, L, Y, o P;
 X₉ es Y;

ES 2 817 756 T3

X₁₀ es G;
X₁₁ es Y, A, P, o E;
X₁₂ es F, M, S, L, o I;
X₁₃ es D, V, N, o K; y
X₁₄ es Y, o F;

5

CDR-L1. X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-X₁₅-X₁₆-X₁₇ (SEQ ID NO: 67), en donde;

X₁ es K, o R;
X₂ es S, o A;
X₃ es S o T;
X₄ es Q, K, o I;
X₅ es N, S, T, G, o E;
X₆ es L, T, o S;
X₇ es L, Q, o V;
X₈ es Y, N, H, D, o T;
X₉ es S, I, o T;
X₁₀ es S, D, N, H, o Y;
X₁₁ es N, o G;
X₁₂ es Q;
X₁₃ es K, F, N, E, o S;
X₁₄ es N, T, o S;
X₁₅ es Y, o F;
X₁₆ es L, A, o M; y
X₁₇ es A, D, E, H, o N

10

15

20

25

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

X₁ es L, S, K, T, W, o Y;
X₂ es V, T, o A;
X₃ es S, o N;
X₄ es N, K, T, M, o R;
X₅ es R, K, o L;
X₆ es F, D, E, H, P, o A; y
X₇ es S, R, o P;

30

35

y

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

X₁ es F, W, Q o A;
X₂ es Q o L;
X₃ es H, G, Y, W, o N;
X₄ es N, S, T, L, o Y;
X₅ es Y, T, S, E, o H;
X₆ es L, V, F, Y, N, G, P, o D;
X₇ es P, o, H;
X₈ es L, F, Y, W, o R; y
X₉ es T, o V.

40

45

50

55

60

Preferentemente, el dominio de unión a antígeno comprende al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

restos 31-35 de SEQ ID NO: 32; restos 52-67 de SEQ ID NO: 48;
restos 50-66 de SEQ ID NO: 32; restos 100-112 de SEQ ID NO: 48;
restos 99-105 de SEQ ID NO: 32; restos 24-34 de SEQ ID NO: 49;

ES 2 817 756 T3

restos 24-39 de SEQ ID NO: 33; restos 50-56 de SEQ ID NO: 49;
restos 55-61 de SEQ ID NO: 33; restos 89-97 de SEQ ID NO: 49;
restos 94-102 de SEQ ID NO: 33; restos 31-37 de SEQ ID NO: 50;
restos 31-35 de SEQ ID NO: 34; restos 52-67 de SEQ ID NO: 50;
restos 50-66 de SEQ ID NO: 34; restos 100-112 de SEQ ID NO: 50;
restos 99-105 de SEQ ID NO: 34; restos 24-34 de SEQ ID NO: 51;
restos 24-39 de SEQ ID NO: 35; restos 60-66 de SEQ ID NO: 51;
restos 55-61 de SEQ ID NO: 35; restos 89-97 de SEQ ID NO: 51;
restos 94-102 de SEQ ID NO: 35; restos 31-35 de SEQ ID NO: 52;
restos 31-35 de SEQ ID NO: 36; restos 50-66 de SEQ ID NO: 52;
restos 50-66 de SEQ ID NO: 36; restos 99-107 de SEQ ID NO: 52;
restos 99-109 de SEQ ID NO: 36; restos 23-36 de SEQ ID NO: 53;
restos 24-39 de SEQ ID NO: 37; restos 52-58 de SEQ ID NO: 53;
restos 55-61 de SEQ ID NO: 37; restos 91-99 de SEQ ID NO: 53;
restos 94-102 de SEQ ID NO: 37; restos 31-35 de SEQ ID NO: 54;
restos 31-35 de SEQ ID NO: 38; restos 50-65 de SEQ ID NO: 54;
restos 50-66 de SEQ ID NO: 38; restos 98-107 de SEQ ID NO: 54;
restos 99-109 de SEQ ID NO: 38; restos 24-38 de SEQ ID NO: 55;
restos 31-35 de SEQ ID NO: 39; restos 54-60 de SEQ ID NO: 55;
restos 50-66 de SEQ ID NO: 39; restos 93-101 de SEQ ID NO: 55;
restos 99-112 de SEQ ID NO: 39; restos 31-35 de SEQ ID NO: 56;
restos 24-39 de SEQ ID NO: 40; restos 50-65 de SEQ ID NO: 56;
restos 55-61 de SEQ ID NO: 40; restos 98-107 de SEQ ID NO: 56;
restos 94-102 de SEQ ID NO: 40; restos 24-38 de SEQ ID NO: 57;
restos 31-35 de SEQ ID NO: 41; restos 54-60 de SEQ ID NO: 57;
restos 50-66 de SEQ ID NO: 41; restos 93-101 de SEQ ID NO: 57;
restos 99-112 de SEQ ID NO: 41; restos 31-35 de SEQ ID NO: 58;
restos 31-35 de SEQ ID NO: 42; restos 50-65 de SEQ ID NO: 58;
restos 50-66 de SEQ ID NO: 42; restos 98-107 de SEQ ID NO: 58;
restos 99-100 de SEQ ID NO: 42; restos 24-38 de SEQ ID NO: 59;
restos 24-39 de SEQ ID NO: 43; restos 54-60 de SEQ ID NO: 59;
restos 55-61 de SEQ ID NO: 43; restos 93-101 de SEQ ID NO: 59;
restos 94-102 de SEQ ID NO: 43; restos 31-35 de SEQ ID NO: 60;
restos 31-35 de SEQ ID NO: 44; restos 50-65 de SEQ ID NO: 60;
restos 50-65 de SEQ ID NO: 44; restos 98-107 de SEQ ID NO: 60;
restos 98-106 de SEQ ID NO: 44; restos 24-38 de SEQ ID NO: 61;
restos 24-40 de SEQ ID NO: 45; restos 54-60 de SEQ ID NO: 61;
restos 56-62 de SEQ ID NO: 45; restos 93-101 de SEQ ID NO: 61;
restos 95-103 de SEQ ID NO: 45; restos 31-35 de SEQ ID NO: 62;
restos 31-37 de SEQ ID NO: 46; restos 50-65 de SEQ ID NO: 62;
restos 52-67 de SEQ ID NO: 46; restos 98-107 de SEQ ID NO: 62;
restos 100-112 de SEQ ID NO: 46; restos 24-38 de SEQ ID NO: 63;

ES 2 817 756 T3

restos 24-34 de SEQ ID NO: 47; restos 54-60 de SEQ ID NO: 63;
restos 50-56 de SEQ ID NO: 47; y
restos 89-97 de SEQ ID NO: 47; restos 93-101 de SEQ ID NO: 63.
restos 31-37 de SEQ ID NO: 48;

En un aspecto preferente de la divulgación, la proteína de unión comprende al menos 3 CDR que se seleccionan entre un conjunto de CDR de dominio variable que consiste en:

Conjunto de CDR VH 25C8	
CDR-H1 VH 25C8	Restos 31-35 de SEQ ID NO: 32
CDR-H2 VH 25C8	Restos 50-66 de SEQ ID NO: 32
CDR-H3 VH 25C8	Restos 99-105 de SEQ ID NO: 32
Conjunto de CDR VL 25C8	
CDR-L1 VL 25C8	Restos 24-39 de SEQ ID NO: 33
CDR-L2 VL 25C8	Restos 55-61 de SEQ ID NO: 33
CDR-L3 VL 25C8	Restos 94-102 de SEQ ID NO: 33
Conjunto de CDR VH 9C11	
CDR-H1 VH 9C11	Restos 31-35 de SEQ ID NO: 34
CDR-H2 VH 9C11	Restos 50-66 de SEQ ID NO: 34
CDR-H3 VH 9C11	Restos 99-105 de SEQ ID NO: 34
Conjunto de CDR VL 9C11	
CDR-L1 VL 9C11	Restos 24-39 de SEQ ID NO: 35
CDR-L2 VL 9C11	Restos 55-61 de SEQ ID NO: 35
CDR-L3 VL 9C11	Restos 94-102 de SEQ ID NO: 35
Conjunto de CDR VH 21D9	
CDR-H1 VH 21D9	Restos 31-35 de SEQ ID NO: 36
CDR-H2 VH 21D9	Restos 50-66 de SEQ ID NO: 36
CDR-H3 VH 21D9	Restos 99-109 de SEQ ID NO: 36
Conjunto de CDR VL 21D9	
CDR-L1 VL 21D9	Restos 24-39 de SEQ ID NO: 37
CDR-L2 VL 21D9	Restos 55-61 de SEQ ID NO: 37
CDR-L3 VL 21D9	Restos 94-102 de SEQ ID NO: 37
Conjunto de CDR VH 22D10	
CDR-H1 VH 22D10	Restos 31-35 de SEQ ID NO: 38
CDR-H2 VH 22D10	Restos 50-66 de SEQ ID NO: 38
CDR-H3 VH 22D10	Restos 99-109 de SEQ ID NO: 38
Conjunto de CDR VL 22D10	
CDR-L1 VL 22D10	Restos 24-39 de SEQ ID NO: 37
CDR-L2 VL 22D10	Restos 55-61 de SEQ ID NO: 37
CDR-L3 VL 22D10	Restos 94-102 de SEQ ID NO: 37
Conjunto de CDR VH 5F1	
CDR-H1 VH 5F1	Restos 31-35 de SEQ ID NO: 39

ES 2 817 756 T3

CDR-H2 VH 5F1	Restos 50-66 de SEQ ID NO: 39
CDR-H3 VH 5F1	Restos 99-112 de SEQ ID NO: 39
Conjunto de CDR VL 5F1	
CDR-L1 VL 5F1	Restos 24-39 de SEQ ID NO: 40
CDR-L2 VL 5F1	Restos 55-61 de SEQ ID NO: 40
CDR-L3 VL 5F1	Restos 94-102 de SEQ ID NO: 40
Conjunto de CDR VH 5G1	
CDR-H1 VH 5G1	Restos 31-35 de SEQ ID NO: 41
CDR-H2 VH 5G1	Restos 50-66 de SEQ ID NO: 41
CDR-H3 VH 5G1	Restos 99-112 de SEQ ID NO: 41
Conjunto de CDR VL 5G1	
CDR-L1 VL 5G1	Restos 24-39 de SEQ ID NO: 40
CDR-L2 VL 5G1	Restos 55-61 de SEQ ID NO: 40
CDR-L3 VL 5G1	Restos 94-102 de SEQ ID NO: 40
Conjunto de CDR VH 3H7	
CDR-H1 VH 3H7	Restos 31-35 de SEQ ID NO: 42
CDR-H2 VH 3H7	Restos 50-66 de SEQ ID NO: 42
CDR-H3 VH 3H7	Restos 99-100 de SEQ ID NO: 42
Conjunto de CDR VL 3H7	
CDR-L1 VL 3H7	Restos 24-39 de SEQ ID NO: 43
CDR-L2 VL 3H7	Restos 55-61 de SEQ ID NO: 43
CDR-L3 VL 3H7	Restos 94-102 de SEQ ID NO: 43
Conjunto de CDR VH 14B2	
CDR-H1 VH 14B2	Restos 31-35 de SEQ ID NO: 44
CDR-H2 VH 14B2	Restos 50-65 de SEQ ID NO: 44
CDR-H3 VH 14B2	Restos 98-106 de SEQ ID NO: 44
Conjunto de CDR VL 14B2	
CDR-L1 VL 14B2	Restos 24-40 de SEQ ID NO: 45
CDR-L2 VL 14B2	Restos 56-62 de SEQ ID NO: 45
CDR-L3 VL 14B2	Restos 95-103 de SEQ ID NO: 45
Conjunto de CDR VH 13C5	
CDR-H1 VH 13C5	Restos 321-387 de SEQ ID NO: 46
CDR-H2 VH 13C5	Restos 52-67 de SEQ ID NO: 46
CDR-H3 VH 13C5	Restos 100-112 de SEQ ID NO: 46
Conjunto de CDR VL 13C5	
CDR-L1 VL 13C5	Restos 24-34 de SEQ ID NO: 47
CDR-L2 VL 13C5	Restos 50-56 de SEQ ID NO: 47
CDR-L3 VL 13C5	Restos 89-97 de SEQ ID NO: 47
Conjunto de CDR VH 29G5	
CDR-H1 VH 29G5	Restos 31-37 de SEQ ID NO: 48

ES 2 817 756 T3

CDR-H2 VH 29G5	Restos 52-67 de SEQ ID NO: 48
CDR-H3 VH 29G5	Restos 100-112 de SEQ ID NO: 48
Conjunto de CDR VL 29G5	
CDR-L1 VL 29G5	Restos 24-34 de SEQ ID NO: 49
CDR-L2 VL 29G5	Restos 50-56 de SEQ ID NO: 49
CDR-L3 VL 29G5	Restos 89-97 de SEQ ID NO: 49
Conjunto de CDR VH 33C3	
CDR-H1 VH 33C3	Restos 31-37 de SEQ ID NO: 50
CDR-H2 VH 33C3	Restos 52-67 de SEQ ID NO: 50
CDR-H3 VH 33C3	Restos 100-112 de SEQ ID NO: 50
Conjunto de CDR VL 33C3	
CDR-L1 VL 33C3	Restos 24-34 de SEQ ID NO: 51
CDR-L2 VL 33C3	Restos 60-66 de SEQ ID NO: 51
CDR-L3 VL 33C3	Restos 89-97 de SEQ ID NO: 51
Conjunto de CDR VH 4A8	
CDR-H1 VH 4A8	Restos 31-35 de SEQ ID NO: 52
CDR-H2 VH 4A8	Restos 50-66 de SEQ ID NO: 52
CDR-H3 VH 4A8	Restos 99-107 de SEQ ID NO: 52
Conjunto de CDR VL 4A8	
CDR-L1 VL 4A8	Restos 23-36 de SEQ ID NO: 53
CDR-L2 VL 4A8	Restos 52-58 de SEQ ID NO: 53
CDR-L3 VL 4A8	Restos 91-99 de SEQ ID NO: 53
Conjunto de CDR VH 1B6	
CDR-H1 VH 1B6	Restos 31-35 de SEQ ID NO: 54
CDR-H2 VH 1B6	Restos 50-65 de SEQ ID NO: 54
CDR-H3 VH 1B6	Restos 98-107 de SEQ ID NO: 54
Conjunto de CDR VL 1B6	
CDR-L1 VL 1B6	Restos 24-38 de SEQ ID NO: 55
CDR-L2 VL 1B6	Restos 54-60 de SEQ ID NO: 55
CDR-L3 VL 1B6	Restos 93-101 de SEQ ID NO: 55
Conjunto de CDR VH 3E5	
CDR-H1 VH 3E5	Restos 31-35 de SEQ ID NO: 56
CDR-H2 VH 3E5	Restos 50-65 de SEQ ID NO: 56
CDR-H3 VH 3E5	Restos 98-107 de SEQ ID NO: 56
Conjunto de CDR VL 3E5	
CDR-L1 VL 3E5	Restos 24-38 de SEQ ID NO: 57
CDR-L2 VL 3E5	Restos 54-60 de SEQ ID NO: 57
CDR-L3 VL 3E5	Restos 93-101 de SEQ ID NO: 57
Conjunto de CDR VH 6C8	
CDR-H1 VH 6C8	Restos 31-35 de SEQ ID NO: 58

ES 2 817 756 T3

CDR-H2 VH 6C8	Restos 50-65 de SEQ ID NO: 58
CDR-H3 VH 6C8	Restos 98-107 de SEQ ID NO: 58
Conjunto de CDR VL 6C8	
CDR-L1 VL 6C8	Restos 24-38 de SEQ ID NO: 59
CDR-L2 VL 6C8	Restos 54-60 de SEQ ID NO: 59
CDR-L3 VL 6C8	Restos 93-101 de SEQ ID NO: 59
Conjunto de CDR VH 5D3	
CDR-H1 VH 5D3	Restos 31-35 de SEQ ID NO: 60
CDR-H2 VH 5D3	Restos 50-65 de SEQ ID NO: 60
CDR-H3 VH 5D3	Restos 98-107 de SEQ ID NO: 60
Conjunto de CDR VL 5D3	
CDR-L1 VL 5D3	Restos 24-38 de SEQ ID NO: 61
CDR-L2 VL 5D3	Restos 54-60 de SEQ ID NO: 61
CDR-L3 VL 5D3	Restos 93-101 de SEQ ID NO: 61
Conjunto de CDR VH 8B6	
CDR-H1 VH 8B6	Restos 31-35 de SEQ ID NO: 62
CDR-H2 VH 8B6	Restos 50-65 de SEQ ID NO: 62
CDR-H3 VH 8B6	Restos 98-107 de SEQ ID NO: 62
Conjunto de CDR VL 8B6	
CDR-L1 VL 8B6	Restos 24-38 de SEQ ID NO: 63
CDR-L2 VL 8B6	Restos 54-60 de SEQ ID NO: 63
CDR-L3 VL 8B6	Restos 93-101 de SEQ ID NO: 63

Preferentemente, la proteína de unión comprende al menos dos conjuntos de CDR de dominio variable. Preferentemente, al menos dos conjuntos de CDR de dominio variable se seleccionan entre un grupo que consiste en:

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

Conjunto de CDR VH 3E5 y Conjunto de CDR VL 3E5;

Conjunto de CDR VH 6C8 y Conjunto de CDR VL 6C8;

Conjunto de CDR VH 5D3 y Conjunto de CDR VL 5D3; y

Conjunto de CDR VH 8B6 y Conjunto de CDR VL 8B6.

En otro aspecto de la divulgación, la proteína de unión desvelada anteriormente comprende además un marco aceptor humano. Preferentemente, el marco aceptor humano comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 26
SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 27
SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 28
SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 29
SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 30
SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 21	Y
SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 31
SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 23	
SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 24	
SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 25	

En un aspecto preferente de la divulgación, la proteína de unión es un anticuerpo injertado con CDR o una parte de unión a antígeno del mismo capaz de unirse a IL-13. Preferentemente, el anticuerpo injertado con CDR o la parte de unión a antígeno del mismo comprende una o más CDR desveladas anteriormente. Preferentemente, el anticuerpo injertado con CDR o la parte de unión a antígeno del mismo comprende un marco aceptor humano. Más preferentemente, el marco aceptor humano es uno cualquiera de los marcos aceptores humanos desvelados anteriormente.

En un aspecto preferente de la divulgación, la proteína de unión es un anticuerpo humanizado o una parte de unión a antígeno del mismo capaz de unirse a IL-13. Preferentemente, el anticuerpo humanizado o la parte de unión a antígeno del mismo comprende una o más CDR desveladas anteriormente incorporadas a un dominio variable de anticuerpo humano de un marco aceptor humano. Preferentemente, el dominio variable de anticuerpo humano es un dominio variable humano de consenso. Más preferentemente, el marco aceptor humano comprende al menos una sustitución de aminoácido en la Región marco en un resto clave, en donde el resto clave se selecciona entre el grupo que consiste en un resto adyacente a una CDR; un resto de sitio de glicosilación; un resto poco frecuente; un resto capaz de interactuar con IL-13 humana; un resto capaz de interactuar con una CDR; un resto canónico; un resto de contacto entre una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera; un resto en una zona de Vernier; y un resto en una región que se superpone entre una CDR1 de cadena pesada variable definida por Chothia y un primer marco de cadena pesada definido por Kabat. Preferentemente, el marco aceptor humano comprende al menos una sustitución de aminoácido en la Región marco, en donde la secuencia de aminoácidos del marco es al menos un 65 % idéntica a la secuencia de dicho marco aceptor humano y comprende al menos 70 restos de aminoácido idénticos a dicho marco aceptor humano. Preferentemente, la sustitución de aminoácido en la Región marco en un resto clave se selecciona entre el grupo que consiste en 2L, 15L, 22L, 41L, 42L, 44L, 49L, 50L, 51L, 62L, 71L, 73L, 10H, 44H, 46H, 48H, 67H, 68H, 70H, 72H, 74H, 76H, 83H, 84H, 86H, 87H, y 97H.

En un aspecto preferente de la divulgación, la proteína de unión es un anticuerpo humanizado o parte de unión a antígeno del mismo capaz de unirse a IL-13. Preferentemente, el anticuerpo humanizado, o la parte de unión a antígeno del mismo, comprende una o más CDR desveladas anteriormente. Más preferentemente, el anticuerpo humanizado, o la parte de unión a antígeno del mismo, comprende tres o más CDR desveladas anteriormente. Más preferentemente, el anticuerpo humanizado, o la parte de unión a antígeno del mismo, comprende seis CDR desveladas anteriormente.

En otro aspecto de la divulgación, el anticuerpo humanizado o la parte de unión a antígeno del mismo comprende al menos un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en;

SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 77	SEQ ID NO: 84
---------------	---------------	---------------

SEQ ID NO: 71 SEQ ID NO: 78 SEQ ID NO: 85
 SEQ ID NO: 72 SEQ ID NO: 79 SEQ ID NO: 92
 SEQ ID NO: 73 SEQ ID NO: 80 SEQ ID NO: 93
 SEQ ID NO: 74 SEQ ID NO: 81 y
 SEQ ID NO: 75 SEQ ID NO: 82 SEQ ID NO: 94.
 SEQ ID NO: 76 SEQ ID NO: 83

Más preferentemente, de acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo humanizado o la parte de unión a antígeno del mismo comprende dos dominios variables seleccionados entre el grupo desvelado anteriormente. Más preferentemente, la proteína de unión comprende dos dominios variables, en donde dichos dos dominios variables tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas entre el grupo que consiste en;

SEQ ID NO: 70 y SEQ ID NO: 71,
 SEQ ID NO: 72 y SEQ ID NO: 73,
 SEQ ID NO: 74 y SEQ ID NO: 75,
 SEQ ID NO: 76 y SEQ ID NO: 77,
 SEQ ID NO: 78 y SEQ ID NO: 79,
 SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 81,
 SEQ ID NO: 82 y SEQ ID NO: 83,
 SEQ ID NO: 84 y SEQ ID NO: 85
 SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 92,
 SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 93, Y
 SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 94.

Un aspecto de la divulgación proporciona una construcción de anticuerpo que comprende una cualquiera de las proteínas de unión desveladas anteriormente y un polipéptido conector o una inmunoglobulina. En una realización preferente, la construcción de anticuerpo se selecciona entre el grupo que consiste en una molécula de inmunoglobulina, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo injertado con CDR, un anticuerpo humanizado, un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un Fv, un Fv unido por disulfuro, un scFv, un anticuerpo de dominio individual, un dianticuerpo, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo específico doble, y un anticuerpo diespecífico. En un aspecto preferente, la construcción de anticuerpo comprende un dominio constante de inmunoglobulina de cadena pesada seleccionado entre el grupo que consiste en un dominio constante de IgM humana, un dominio constante de IgG1 humana, un dominio constante de IgG2 humana, un dominio constante de IgG3 humana, un dominio constante de IgG4 humana, un dominio constante de IgE humana, y un dominio constante de IgA humana. Más preferentemente, la construcción de anticuerpo comprende SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; y SEQ ID NO: 5. En otro aspecto, la divulgación proporciona un conjugado de anticuerpo que comprende la construcción de anticuerpo desvelada anteriormente y un agente seleccionado entre el grupo que consiste en; una molécula de inmunoadhesión, un agente de formación de imágenes, un agente terapéutico, y un agente citotóxico. En un aspecto preferente de la divulgación, el agente de formación de imágenes se selecciona entre el grupo que consiste en un radiomarcador, una enzima, una marca fluorescente, una marca luminiscente, una marca bioluminiscente, una marca magnética, y biotina. Más preferentemente, el agente de formación de imágenes es un radiomarcador seleccionado entre el grupo que consiste en: ³H, ¹⁴C, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁷⁷Lu, ¹⁶⁶Ho, y ¹⁵³Sm. En un aspecto preferente de la divulgación, el agente terapéutico o citotóxico se selecciona entre el grupo que consiste en: un antimetabolito, un agente alquilante, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citoquina, un agente antiangiogénico, un agente antimitótico, una antraciclina, una toxina, y un agente apoptótico.

En otro aspecto de la divulgación, la construcción de anticuerpo está glicosilada. Preferentemente, la glicosilación es un patrón de glicosilación humano.

En otro aspecto de la divulgación, la proteína de unión, la construcción de anticuerpo o el conjugado de anticuerpo desvelado anteriormente existe en forma de un cristal. Preferentemente, el cristal es un cristal de liberación controlada farmacéutico sin vehículo. En un aspecto preferente de la divulgación, la proteína de unión cristalizada, la construcción de anticuerpo cristalizada o el conjugado de anticuerpo cristalizado tiene una mayor semivida *in vivo* que su contrapartida soluble. En otro aspecto preferente de la divulgación, la proteína de unión cristalizada, la construcción de anticuerpo cristalizada o el conjugado de anticuerpo cristalizado retiene su actividad biológica después de la cristalización.

Un aspecto de la divulgación se refiere a una proteína de unión de DVD que comprende proteínas de unión capaces de unirse a IL-13. Preferentemente, la proteína de unión de DVD es capaz de unirse a IL-13 y a una segunda diana. La segunda diana se selecciona entre el grupo que consiste en CSF1 (MCSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (GCSF), FGF2, IFNα1, IFNβ2, IFNγ, histamina y receptores de histamina, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12α, IL-12β, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, KITLG, PDGFB, IL-2Rα, IL-4R, IL-5Rα, IL-8Rα,

IL-8R β , IL-12R β , IL-12R β 2, IL-13R α 1, IL-13R α 2, IL-18R1, TSLP, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL22, CCL24, CX3CL1, CXCL1, CXCL2, CXCL3, XCL1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CX3CR1, GPR2, XCR1, FOS, GATA3, JAK1, JAK3, STAT6, TBX21, TGFB1, TNFSF6, YY1, CYSLTR1, FCER1A, FCER2, LTB4R, TB4R2, LTBR, y quitinasa. Más preferentemente, la proteína de DVD es capaz de reconocer IL-13 e IL-1 β , IL-13 e IL-9; IL-13 e IL-4; IL-13 e IL-5; IL-13 e IL-25; IL-13 y TARC; IL-13 y MDC; IL-13 y MIF; IL-13 y TGF- β ; IL-13 y agonista de LHR; IL-13 y CL25; IL-13 y SPRR2a; IL-13 y SPRR2b; o IL-13 y ADAM8. Más preferentemente, la proteína de DVD es capaz de unirse a IL-13 y TNF α .

Un aspecto de la divulgación se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica uno cualquiera de la proteína de unión, la construcción de anticuerpo o el conjugado de anticuerpo desvelados anteriormente. Una realización adicional proporciona un vector que comprende el ácido nucleico aislado desvelado anteriormente en donde dicho vector se selecciona entre el grupo que consiste en ADNpc; pTT (Durocher *et al.*, Nucleic Acids Research 2002, Vol. 30, N.º 2); pTT3 (pTT con sitio de clonación múltiple adicional; pEFBOS (Mizushima, S. y Nagata, S., (1990) Nucleic acids Research Vol.18, N.º 17); pBV; pJV; y pBJ.

En otro aspecto, se transforma una célula hospedadora con el vector desvelado anteriormente. Preferentemente, la célula hospedadora es una célula procariota. Más preferentemente, la célula hospedadora es *E. Coli*. En una realización relacionada, la célula hospedadora es una célula eucariota. Preferentemente, la célula eucariota se selecciona entre el grupo que consiste en célula protista, célula animal, célula vegetal y célula fúngica. Más preferentemente, la célula hospedadora es una célula de mamífero que incluye, pero no se limita a, CHO y COS; o una célula fúngica tal como *Saccharomyces cerevisiae*; o una célula de insecto tal como Sf9.

Otro aspecto de la divulgación proporciona un método de producción de una proteína de unión que se une a IL-13, que comprende cultivar una cualquiera de las células hospedadoras desveladas anteriormente en un medio de cultivo en condiciones suficientes para producir una proteína de unión que se una a IL-13. Otro aspecto de la divulgación proporciona una proteína de unión producida de acuerdo con el método desvelado anteriormente.

Un aspecto de la divulgación proporciona una composición para la liberación de una proteína de unión en donde la composición comprende una formulación que a su vez comprende una proteína de unión cristalizada, una construcción de anticuerpo cristalizada o un conjugado de anticuerpo cristalizado como se ha desvelado anteriormente y un ingrediente; y al menos un vehículo polimérico. Preferentemente, el vehículo polimérico es un polímero seleccionado entre uno o más del grupo que consiste en: poli(ácido acrílico), poli(cianoacrilatos), poli(aminoácidos), poli(anhídridos), poli(depsipéptido), poli(ésteres), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-co-glicólico) o PLGA, poli(b-hidroxibutirato), poli(caprolactona), poli(dioxanona); poli(etilenglicol), poli((hidroxipropil)metacrilamida, poli[(organo)fosfazeno], poli(ortoésteres), poli(alcohol vinílico), poli(vinilpirrolidona), copolímeros de anhídrido maleico-alquil vinil éter, polioles Pluronic, albúmina, alginato, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glicaminoglicanos, polisacáridos sulfatados, mezclas y copolímeros de los mismos. Preferentemente, el ingrediente selecciona entre el grupo que consiste en albúmina, sacarosa, trehalosa, lactitol, gelatina, hidroxipropil- β -ciclodextrina, metoxipolietilenglicol y polietilenglicol. Otro aspecto proporciona el uso de la composición desvelada anteriormente en un método para tratar un mamífero que comprende la etapa de administrar al mamífero una cantidad eficaz de dicha composición.

La divulgación también proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión, construcción de anticuerpo o conjugado de anticuerpo como se ha desvelado anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una segunda realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-IL-13 recombinante, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:

- (a) dos dominios variables, en donde un dominio variable comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 80 y el otro dominio variable comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 81;
- (b) una región constante de cadena pesada de IgG1 humana que comprende una región bisagra que comprende un cambio de leucina a alanina en la posición 234 (numeración EU) y un cambio de leucina a alanina en la posición 235 (numeración EU); y
- (c) una región constante de cadena ligera kappa humana, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización adicional de la invención, la composición farmacéutica indicada anteriormente comprende al menos un agente terapéutico adicional para uso en el tratamiento de un trastorno en el que es perjudicial la actividad de IL-13. Preferentemente, el agente adicional se selecciona entre el grupo que consiste en: agente terapéutico, agente de formación de imágenes, agente citotóxico, inhibidores de la angiogénesis (que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-VEGF o trampa de VEGF); inhibidores de quinasas (que incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de KDR y TIE-2); bloqueadores de moléculas de estimulación conjunta (que incluyen, pero no se limitan a, anti-B7.1, anti-B7.2, CTLA4-Ig, anti-CD20); bloqueadores de moléculas de adhesión (que incluyen, pero no se limitan a, Abs anti-LFA-1, Abs anti-E/L selectina, inhibidores de molécula pequeña); anticuerpo anti-citoquina o fragmento funcional del mismo (que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-IL-18, anti-TNF, anti-IL-6/receptor de citoquina); metotrexato; ciclosporina; rapamicina; FK506; marca o indicador detectable; un antagonista de TNF;

un antirreumático; un relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano, un antipsoriásico, un corticosteroide, un esteroide anabólico, una eritropoyetina, una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona de crecimiento, un fármaco de reemplazo hormonal, un compuesto radiofarmacéutico, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, una medicación para el asma, un beta agonista, un esteroide inhalado, una epinefrina o análogo, una citoquina, y un antagonista de citoquina.

En otro aspecto, en el presente documento se desvela una proteína de unión como se ha desvelado anteriormente para uso en un método para inhibir la actividad de IL-13 humana que comprende poner en contacto IL-13 humana con la proteína de unión desvelada anteriormente de un modo tal que se inhiba la actividad de IL-13 humana. En un aspecto relacionado, en el presente documento se desvela una proteína de unión como se ha desvelado anteriormente para uso en un método para inhibir la actividad de IL-13 humana en un sujeto humano que padece un trastorno en el que es perjudicial la actividad de IL-13, que comprende administrar al sujeto humano la proteína de unión desvelada anteriormente de un modo tal que se inhiba la actividad de IL-13 humana en el sujeto humano y se consiga el tratamiento.

En otro aspecto, en el presente documento se desvela una proteína de unión como se ha desvelado anteriormente para uso en un método de tratamiento (por ejemplo, cura, supresión, mejora, retraso o prevención de la aparición de, o prevención de la reaparición o recaída de) o prevención de un trastorno asociado a IL-13 en un sujeto. El método incluye: administrar al sujeto un agente de unión a IL-13 (particularmente un antagonista), por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-13 o un fragmento del mismo como se describe en el presente documento, en una cantidad suficiente para tratar o prevenir el trastorno asociado a IL-13. El antagonista de IL-13, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-13 o el fragmento del mismo, se puede administrar al sujeto solo o en combinación con otras modalidades terapéuticas que se describen en el presente documento.

En un aspecto, el sujeto es un mamífero, por ejemplo, un sujeto humano que padece uno o más trastornos asociados a IL-13, incluyendo, por ejemplo, trastornos respiratorios (por ejemplo, asma (por ejemplo, asma alérgica y no alérgica), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), y otras afecciones que implican inflamación de las vías respiratorias, eosinofilia, fibrosis y exceso de producción de mucosidad; trastornos atópicos (por ejemplo, dermatitis atópica y rinitis alérgica); afecciones inflamatorias y/o autoinmunes de la piel, órganos gastrointestinales (por ejemplo, enfermedades intestinales inflamatorias (IBD), tales como colitis ulcerosa y/o enfermedad de Crohn), y hepáticas (por ejemplo, cirrosis, fibrosis); esclerodermia; tumores o cánceres, por ejemplo, linfoma de Hodgkin como se describe en el presente documento. Por lo tanto, la divulgación incluye el uso de un agente de unión a IL-13 (tal como un anticuerpo anti-IL-13 o fragmento del mismo descrito en el presente documento) para uso en un tratamiento descrito en el presente documento y el uso de un agente de unión a IL-13 (tal como un anticuerpo anti-IL-13 o fragmento del mismo descrito en el presente documento) para preparar un medicamento para uso en un tratamiento descrito en el presente documento. Ejemplos de trastornos asociados a IL-13 incluyen, pero no se limitan a, un trastorno elegido entre uno o más de: trastornos respiratorios, por ejemplo, asma (por ejemplo, asma alérgica y no alérgica (por ejemplo, asma debida a infección con, por ejemplo, virus respiratorio sincitial (RSV), por ejemplo, en los niños más pequeños)), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), y otras afecciones que implican inflamación de las vías respiratorias, eosinofilia, fibrosis y exceso de producción de mucosidad, por ejemplo, fibrosis quística y fibrosis pulmonar; trastornos atópicos, por ejemplo, resultantes de un aumento de sensibilidad a IL-13 (por ejemplo, dermatitis atópica, urticaria, eccema, rinitis alérgica, y enterogastritis alérgica); afecciones inflamatorias y/o autoinmunes de la piel (por ejemplo, dermatitis atópica), órganos gastrointestinales (por ejemplo, enfermedades intestinales inflamatorias (IBD), tales como colitis ulcerosa y/o enfermedad de Crohn), hepáticas (por ejemplo, cirrosis, carcinoma hepatocelular), y esclerodermia; tumores o cánceres (por ejemplo, tumores de tejido blando o sólidos), tales como leucemia, glioblastoma, y linfoma, por ejemplo, linfoma de Hodgkin; infecciones virales (por ejemplo, de HTLV-1); fibrosis de otros órganos, por ejemplo, fibrosis del hígado (por ejemplo, fibrosis causada por un virus de hepatitis B y/o C); y supresión de expresión de respuestas inmunitarias protectoras de tipo 1 (por ejemplo, durante la vacunación), como se describe en el presente documento.

En otros aspectos, la presente solicitud proporciona una proteína de unión como se ha desvelado anteriormente para uso en un método de tratamiento (por ejemplo, reducción, mejora) o prevención de uno o más síntomas asociados a un trastorno respiratorio, por ejemplo, asma (por ejemplo, asma alérgica y no alérgica); alergias; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD); una afección que implica inflamación de las vías respiratorias, eosinofilia, fibrosis y exceso de producción de mucosidad, por ejemplo, fibrosis quística y fibrosis pulmonar. Por ejemplo, los síntomas de asma incluyen, pero no se limitan a, sibilancias, dificultad para respirar, broncoconstricción, hiperreactividad de las vías respiratorias, disminución de la capacidad pulmonar, fibrosis, inflamación de las vías respiratorias, y producción de mucosidad. El método comprende administrar al sujeto un antagonista de IL-13, por ejemplo, un anticuerpo frente a IL-13 o un fragmento del mismo, en una cantidad suficiente para tratar (por ejemplo, reducir, mejorar) o prevenir uno o más síntomas. El anticuerpo frente a IL-13 se puede administrar terapéutica o profilácticamente, o ambas. El antagonista de IL-13, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-13, o el fragmento del mismo, se puede administrar al sujeto solo o en combinación con otras modalidades terapéuticas que se describen en el presente documento. Preferentemente, el sujeto es un mamífero, por ejemplo, un sujeto humano que padece un trastorno asociado a IL-13 como se describe en el presente documento.

En otro aspecto, la presente solicitud proporciona un método para detectar la presencia de IL-13 en una muestra *in vitro* (por ejemplo, una muestra biológica, tal como suero, plasma, tejido, biopsia). El método objeto se puede usar para diagnosticar un trastorno, por ejemplo, un trastorno asociado a células inmunitarias. El método incluye: (i) poner en contacto la muestra o una muestra de control con el anticuerpo anti-IL-13 o el fragmento del mismo como se describe en el presente documento; y (ii) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-IL-13 o el fragmento del mismo, y la muestra o la muestra de control, en donde un cambio estadísticamente significativo en la formación del complejo en la muestra con respecto a la muestra de control es indicativo de la presencia de IL-13 en la muestra.

En otro aspecto más, la presente solicitud proporciona una proteína de unión como se ha desvelado anteriormente para uso en un método para detectar la presencia de IL-13 *in vivo* (por ejemplo, formación de imágenes *in vivo* en un sujeto). El método objeto se puede usar para diagnosticar un trastorno, por ejemplo, un trastorno asociado a IL-13. El método incluye: (i) administrar el anticuerpo anti-IL-13 o el fragmento del mismo como se describe en el presente documento a un sujeto o un sujeto de control en condiciones que permitan la unión del anticuerpo o el fragmento a IL-13; y (ii) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo o el fragmento e IL-13, en donde un cambio estadísticamente significativo en la formación del complejo en el sujeto con respecto al sujeto de control es indicativo de la presencia de IL-13.

En otro aspecto, las proteínas de unión de la invención son para uso en el tratamiento de un trastorno seleccionado entre el grupo que consiste en artritis, osteoartritis, artritis crónica juvenil, artritis séptica, artritis de Lyme, artritis psoriásica, artritis reactiva, espondiloartropatía, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria intestinal, diabetes mellitus insulino dependiente, tiroiditis, asma, enfermedades alérgicas, psoriasis, dermatitis, esclerodermia, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de trasplante de órganos, enfermedad inmunitaria aguda o crónica asociada con el trasplante de órganos, sarcoidosis, aterosclerosis, coagulación intravascular diseminada, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Grave, síndrome nefrótico, síndrome de fatiga crónica, granulomatosis de Wegener, púrpura de Henoch-Schoenlein, vasculitis microscópica de los riñones, hepatitis crónica activa, uveítis, choque séptico, síndrome de choque tóxico, síndrome de sepsis, caquexia, enfermedades infecciosas, enfermedades parasitarias, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, mielitis transversa aguda, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, apoplejía, cirrosis biliar primaria, anemia hemolítica, neoplasias malignas, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, enfermedad de Addison, esporádica, deficiencia poliglandular de tipo I y deficiencia poliglandular de tipo II, síndrome de Schmidt, síndrome de dificultad respiratoria del adulto (aguda), alopecia, alopecia areata, artropatía seronegativa, artropatía, enfermedad de Reiter, artropatía psoriásica, artropatía asociada a colitis ulcerosa, sinovitis enteropática, artropatía asociada a clamidia, yersinia y salmonella, espondiloartropatía, enfermedad ateromatosa/arterioesclerosis, alergia atópica, enfermedad ampollosa autoinmune, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, penfigoide, enfermedad de IgA lineal, anemia hemolítica autoinmune, anemia hemolítica positiva de Coombs, anemia perniciosa adquirida, anemia perniciosa juvenil, encefalitis miálgica/enfermedad de Royal Free, candidiasis mucocutánea crónica, arteritis de células gigantes, hepatitis esclerosante primaria, hepatitis autoinmune criptogénica, síndrome de enfermedad de inmunodeficiencia adquirida, enfermedades relacionadas con la inmunodeficiencia adquirida, Hepatitis B, Hepatitis C, inmunodeficiencia común variada (hipogammaglobulinemia variable común), miocardiopatía dilatada, infertilidad femenina, insuficiencia ovárica, insuficiencia ovárica prematura, enfermedad pulmonar fibrótica, alveolitis fibrosante criptogénica, enfermedad pulmonar intersticial postinflamatoria, neumonitis intersticial, enfermedad pulmonar intersticial asociada a enfermedades del tejido conectivo, enfermedad pulmonar mixta asociada a enfermedades del tejido conectivo, enfermedad pulmonar intersticial asociada a esclerosis sistémica, enfermedad pulmonar intersticial asociada a artritis reumatoide, enfermedad pulmonar asociada a lupus eritematoso sistémico, enfermedad pulmonar asociada a dermatomiositis/polimiositis, enfermedad pulmonar asociada a enfermedad de Sjögren, enfermedad pulmonar asociada a espondilitis anquilosante, enfermedad pulmonar vasculítica difusa, enfermedad pulmonar asociada a hem siderosis, enfermedad pulmonar intersticial inducida por fármacos, fibrosis, fibrosis por radiación, bronquiolitis obliterante, neumonía eosinofílica crónica, enfermedad pulmonar linfocítica infiltrante, enfermedad pulmonar intersticial postinfecciosa, artritis gotosa, hepatitis autoinmune, hepatitis autoinmune de tipo 1 (hepatitis autoinmune clásica o lupoide), hepatitis autoinmune de tipo 2 (hepatitis con anticuerpos anti-LKM), hipoglucemia mediada por autoinmunidad, resistencia a la insulina de tipo B con acantosis nigricans, hipoparatiroidismo, enfermedad inmune aguda asociada con trasplante de órganos, enfermedad inmune crónica asociada con trasplante de órganos, osteoartrosis, colangitis esclerosante primaria, psoriasis de tipo 1, psoriasis de tipo 2, leucopenia idiopática, neutropenia autoinmune, enfermedad renal NOS, glomerulonefritis, vasculitis microscópica de los riñones, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso discoide, infertilidad masculina idiopática o NOS, autoinmunidad espermática, esclerosis múltiple (todos los subtipos), oftalmía simpática, hipertensión pulmonar debido a enfermedades del tejido conectivo, síndrome de Goodpasture, manifestación pulmonar de poliarteritis nodosa, fiebre reumática aguda, espondilitis reumatoide, enfermedad de Still, esclerosis sistémica, síndrome de Sjögren, enfermedad/arteritis de Takayasu, trombocitopenia autoinmune, trombocitopenia idiopática, enfermedad tiroidea autoinmune, hipertiroidismo, bocio, hipotiroidismo autoinmune (enfermedad de Hashimoto), hipotiroidismo autoinmune atrófico, mixedema primario, uveítis facogénica, vasculitis primaria, vitíligo, enfermedad hepática aguda, enfermedades hepáticas crónicas, cirrosis alcohólica, lesión hepática inducida por alcohol, coleostatis, enfermedad hepática idiosincrásica, hepatitis inducida por fármacos, esteatohepatitis no alcohólica, alergia y asma, infección por estreptococos del grupo B (GBS), trastornos mentales (por ejemplo, depresión y esquizofrenia), enfermedades mediadas por células de tipo Th2 y tipo Th1, dolor agudo y crónico (diferentes formas de dolor), y cánceres tales como cáncer de pulmón, mama, estómago, vejiga, colon, páncreas, ovarios, próstata y rectal y neoplasias

hematopoyéticas (leucemia y linfoma), abetalipoproteinemia, acrocianosis, procesos parasitarios o infecciosos agudos y crónicos, leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), infección bacteriana aguda o crónica, pancreatitis aguda, insuficiencia renal aguda, adenocarcinomas, latidos ectópicos aéreos, complejo de demencia por SIDA, hepatitis inducida por alcohol, conjuntivitis alérgica, dermatitis alérgica por contacto, rinitis alérgica, rechazo a aloinjerto, deficiencia de antitripsina alfa-1, esclerosis lateral amiotrófica, anemia, angina de pecho, degeneración de las células del asta anterior, terapia anti cd3, síndrome antifosfolipídico, reacciones de hipersensibilidad antirreceptor, aneurismas aórticos y periféricos, disección aórtica, hipertensión arterial, arteriosclerosis, fístula arteriovenosa, ataxia, fibrilación auricular (sostenida o paroxística), aleteo auricular, bloqueo auriculoventricular, linfoma de linfocitos B, rechazo a injerto óseo, rechazo a trasplante de médula ósea (BMT), bloqueo de la rama derecha, linfoma de Burkitt, quemaduras, arritmias cardíacas, síndrome de aturdimiento cardíaco, tumores cardíacos, cardiomiopatía, respuesta inflamatoria a la derivación cardiopulmonar, rechazo a trasplante de cartílago, degeneraciones corticales del cerebelo, trastornos del cerebelo, taquicardia auricular caótica o multifocal, trastornos asociados a la quimioterapia, leucemia mielocítica crónica (CML), alcoholismo crónico, patologías inflamatorias crónicas, leucemia linfocítica crónica (CLL), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), intoxicación crónica por salicilatos, carcinoma colorrectal, insuficiencia cardíaca congestiva, conjuntivitis, dermatitis por contacto, cor pulmonale, enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, sepsis con cultivo negativo, fibrosis quística, trastornos asociados a terapia con citoquinas, demencia pugilística, enfermedades desmielinizantes, fiebre hemorrágica por dengue, dermatitis, afecciones dermatológicas, diabetes, diabetes mellitus, enfermedad arteriosclerótica diabética, enfermedad con cuerpos de Lewy difusos, miocardiopatía congestiva dilatada, trastornos de los ganglios basales, síndrome de Down en la madurez, trastornos del movimiento inducidos por fármacos, inducidos por fármacos que bloquean los receptores de dopamina del SNC, sensibilidad a fármacos, eccema, encefalomiелitis, endocarditis, endocrinopatía, epiglotitis, infección por el virus Epstein-Barr, eritromelalgia, trastornos extrapiramidales y del cerebelo, linfocitosis hematofagocítica familiar, rechazo al implante de timo fetal, ataxia de Friedreich, trastornos arteriales periféricos funcionales, sepsis fúngica, gangrena gaseosa, úlcera gástrica, nefritis glomerular, rechazo a injerto de cualquier órgano o tejido, sepsis gram negativa, sepsis gram positiva, granulomas debidos a organismos intracelulares, leucemia de células pilosas, enfermedad de Hallerorden-Spatz, tiroiditis de Hashimoto, fiebre del heno, rechazo a trasplante de corazón, hemacromatosis, hemodiálisis, síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombótica, hemorragia, hepatitis (A), arritmias del haz de His, infección por VIH/neuropatía por VIH, enfermedad de Hodgkin, trastornos del movimiento hiperkinético, reacciones de hipersensibilidad, neumonitis por hipersensibilidad, hipertensión, trastornos del movimiento hipocinético, evaluación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal, enfermedad de Addison idiopática, fibrosis pulmonar idiopática, citotoxicidad mediada por anticuerpos, astenia, atrofia muscular espinal infantil, inflamación de la aorta, gripe A, exposición a radiaciones ionizantes, iridociclitis/uveítis/neuritis óptica, lesión por isquemia-reperusión, apoplejía isquémica, artritis reumatoide juvenil, atrofia muscular espinal juvenil, sarcoma de Kaposi, rechazo a trasplante renal, legionela, leishmaniasis, lepra, lesiones del sistema corticoespinal, lipedema, rechazo a trasplante de hígado, linfedermia, malaria, linfoma maligno, histiocitosis maligna, melanoma maligno, meningitis, meningococemia, metabólica/idiopática, dolor de cabeza por migraña, trastorno multisistémico mitocondrial, enfermedad mixta del tejido conectivo, gammapatía monoclonal, mieloma múltiple, degeneraciones de múltiples sistemas (Mencel Dejerine-Thomas Shi-Drager y Machado-Joseph), miastenia gravis, *Mycobacterium Avium* intracelular, *Mycobacterium tuberculosis*, síndrome mieloplásico, infarto de miocardio, trastornos isquémicos del miocardio, carcinoma nasofaríngeo, enfermedad pulmonar crónica neonatal, nefritis, nefrosis, enfermedades neurodegenerativas, atroñas musculares neurogénicas I, fiebre neutropénica, linfoma no Hodgkin, oclusión de la aorta abdominal y sus ramas, trastornos arteriales oclusivos, terapia con okt3, orquitis/epididimitis, orquitis/procedimientos de reversión de vasectomía, organomegalia, osteoporosis, rechazo a trasplante de páncreas, carcinoma pancreático, síndrome paraneoplásico/hipercalcemia de neoplasia, rechazo a trasplante paratiroideo, enfermedad inflamatoria pélvica, rinitis perenne, enfermedad pericárdica, enfermedad aterosclerótica periférica, trastornos vasculares periféricos, peritonitis, anemia perniciosa, neumonía por *Pneumocystis carinii*, neumonía, síndrome de POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammapatía monoclonal, y síndrome de cambios cutáneos), síndrome postperusión, síndrome postbomba, síndrome de cardiectomía post-MI, preeclampsia, parálisis supranuclear progresiva, hipertensión pulmonar primaria, terapia para radiación, fenómeno y enfermedad de Raynaud, enfermedad de Raynaud, enfermedad de Refsum, taquicardia por QRS estrecho regular, hipertensión renovascular, lesión por reperusión, cardiomiopatía restrictiva, sarcomas, esclerodermia, corea senil, demencia senil de tipo cuerpos de Lewy, artropatías seronegativas, choque, anemia de células falciformes, rechazo a aloinjerto de piel, síndrome de cambios cutáneos, rechazo a trasplante de intestino delgado, tumores sólidos, arritmias específicas, ataxia espinal, degeneraciones espinocerebelares, miositis estreptocócica, lesiones estructurales del cerebelo, panencefalitis esclerosante subaguda, síncope, sífilis del sistema cardiovascular, anafilaxis sistémica, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, artritis reumatoide juvenil de inicio sistémico, ALL de linfocitos T o FAB, telangiectasia, tromboangeítis obliterante, trombocitopenia, toxicidad, trasplantes, traumatismos/hemorragias, reacciones de hipersensibilidad de tipo III, hipersensibilidad de tipo IV, angina de pecho inestable, uremia, urosepsis, urticaria, enfermedades de las válvulas cardíacas, venas varicosas, vasculitis, enfermedades venosas, trombosis venosa, fibrilación ventricular, infecciones virales y fúngicas, encefalitis vital/meningitis aséptica, síndrome hemafagocítico vital-asociado, síndrome de Wernicke-Korsakoff, enfermedad de Wilson, rechazo a xenoinjerto de cualquier órgano o tejido, síndromes coronarios agudos, polineuritis idiopática aguda, poliirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria aguda, isquemia aguda, enfermedad de Still en adultos, alopecia areata, anafilaxis, síndrome de anticuerpos antifosfolipídicos, anemia aplásica, arteriosclerosis, eccema atópico, dermatitis atópica, dermatitis autoinmune, trastorno autoinmune asociado a infección por *Streptococcus*, enteropatía autoinmune,

5 pérdida de audición autoinmune, síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS), miocarditis autoinmune, insuficiencia ovárica prematura autoinmune, blefaritis, bronquiectasia, pénfigo buloso, enfermedad cardiovascular, síndrome antifosfolípido catastrófico, enfermedad celíaca, espondilosis cervical, isquemia crónica, pénfigo cicatricial, síndrome clínicamente aislado (CIS) con riesgo de esclerosis múltiple, conjuntivitis, trastorno pediátrico de inicio en la infancia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), dacriocistitis, dermatomiositis, retinopatía diabética, diabetes mellitus, hernia de disco, prolapso de disco, anemia hemolítica inmune inducida por fármacos, endocarditis, endometriosis, endoftalmitis, epiescleritis, eritema multiforme, eritema multiforme grave, pénfigo gestacional, síndrome de Guillain-Barré (GBS), fiebre del heno, síndrome de Hughes, enfermedad de Parkinson idiopática, neumonía intersticial idiopática, alergia mediada por IgE, anemia hemolítica inmune, miositis por cuerpos de inclusión, enfermedad inflamatoria ocular infecciosa, enfermedad desmielinizante inflamatoria, enfermedad cardíaca inflamatoria, enfermedad renal inflamatoria, IPF/UIP, iritis, queratitis, queratoconjuntivitis sicca, enfermedad de Kussmaul o enfermedad de Kussmaul-Meier, parálisis de Landry, histiocitosis de células de Langerhan, livedo reticularis, degeneración ocular, poliangiitis microscópica, Morbus Bechterev, trastornos de las neuronas motoras, pénfigo de membranas mucosas, insuficiencia orgánica múltiple, miastenia gravis, síndrome mielodisplásico, miocarditis, trastornos de las raíces nerviosas, neuropatía, hepatitis no A no B, neuritis óptica, osteólisis, JRA pauciarticular, enfermedad oclusiva de las arterias periféricas (PAOD), enfermedad vascular periférica (PVD), enfermedad arterial periférica (PAD), flebitis, poliarteritis nodosa (o periarteritis nodosa), policondritis, polimialgia reumática, poliosis, JRA poliarticular, síndrome de deficiencia poliendocrina, polimiositis, polimialgia reumática (PMR), síndrome postbomba, Parkinson primario, prostatitis, aplasia pura de glóbulos rojos, insuficiencia adrenal primaria, neuromielitis óptica recurrente, reestenosis, enfermedad cardíaca reumática, SAPHO (sinovitis, acné, pustulosis, hiperostosis, y osteítis), esclerodermia, amiloidosis secundaria, choque pulmonar, escleritis, ciática, insuficiencia adrenal Secundaria, enfermedad del tejido conectivo asociada a sílicona, dermatosis de Sneddon-Wilkinson, espondilitis anquilosante, síndrome de Stevens-Johnson (SJS), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, arteritis temporal, retinitis toxoplásmica, necrólisis epidérmica tóxica, mielitis transversa, TRAPS (receptor del factor de necrosis tumoral), reacción alérgica de tipo 1, diabetes de tipo II, urticaria, neumonía intersticial habitual (UIP), vasculitis, conjuntivitis vernal, retinitis viral, síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada (síndrome de VKH), degeneración macular húmeda, y cicatrización de heridas.

30 En otro aspecto, las proteínas de unión de la divulgación son para uso en el tratamiento de un trastorno seleccionado entre el grupo que consiste en leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adrenocortical, cáncer anal, cáncer de apéndice, astrocitoma del cerebelo, astrocitoma cerebral, carcinoma de células basales, cáncer de los conductos biliares, extrahepático, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno, glioma del tronco encefálico, tumor cerebral, glioma del tronco encefálico, astrocitoma cerebral/glioma maligno, ependimoma, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, glioma de las vías ópticas e hipotalámico, cáncer de mama, adenomas/carcinoides bronquiales, tumor carcinoide, tumor carcinoide, carcinoma gastrointestinal de origen desconocido, linfoma del sistema nervioso central, astrocitoma primario del cerebelo, cáncer de cuello uterino, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, cáncer colorrectal, linfoma cutáneo de linfocitos T, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer de esófago, familia de tumores de Ewing, tumor extracraneal de células germinales, tumor extragonadal de células germinales, cáncer extrahepático de conductos biliares, cáncer ocular, melanoma intraocular, retinoblastoma, cáncer de la vesícula biliar, cáncer gástrico (estómago), tumor carcinoide gastrointestinal, tumor del estroma gastrointestinal (GIST), tumor extracraneal de células germinales, tumor extragonadal de células germinales, tumor ovárico de células germinales, tumor trofoblástico gestacional, glioma, glioma del tronco encefálico, astrocitoma cerebral, glioma, glioma de las vías ópticas e hipotalámico infantil, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular (hígado), linfoma de Hodgkin, cáncer hipofaríngeo, melanoma intraocular, carcinoma de células de los islotes (páncreas endocrino), sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón (células renales), cáncer de laringe, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, leucemia de células pilosas, cáncer de labios y cavidad oral, cáncer de hígado, cáncer de pulmón de células no microcíticas, cáncer de pulmón de células microcíticas, linfoma relacionado con SIDA, linfoma de Burkitt, linfoma cutáneo de linfocitos T, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma de sistema nervioso central primario, macroglobulinemia de Waldenstrom, histiocitoma fibroso maligno de huesos/osteosarcoma, meduloblastoma, melanoma, melanoma intraocular (ojo), carcinoma de células de Merkel, mesotelioma maligno, cáncer escamoso de cuello metastásico con tumor primario oculto, cáncer de boca, síndrome de neoplasia endocrina múltiple, mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas, leucemia mielógena, leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple, trastornos mieloproliferativos, cáncer de cavidades nasales y senos paranasales, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer oral, cáncer de la cavidad oral, cáncer de labios y orofaríngeo, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de huesos, cáncer ovárico, cáncer epitelial ovárico, tumor ovárico de células germinales, tumor ovárico de bajo potencial maligno, cáncer pancreático, cáncer pancreático de células de los islotes, cáncer de senos paranasales y cavidades nasales, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, cáncer faríngeo, feocromocitoma, pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, tumor de la pituitaria, neoplasias de células plasmáticas/mieloma múltiple, blastoma pleuropulmonar, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de células renales (riñón), pelvis renal y uréter, cáncer de células transicionales, retinoblastoma, cáncer de las glándulas salivales, sarcoma, familia de tumores de Ewing, sarcoma de Kaposi, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma uterino, síndrome de Sézary, cáncer de piel (no melanoma), cáncer de piel (melanoma), carcinoma cutáneo de células de Merkel, cáncer de intestino

delgado, carcinoma de células escamosas, cáncer escamoso de cuello metastásico con tumor primario oculto, cáncer de estómago (gástrico), tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, linfoma cutáneo de linfocitos T, cáncer testicular, cáncer de garganta, timoma, timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer de células transicionales de la pelvis renal y uréter, tumor trofoblástico gestacional, uréter y pelvis renal, cáncer de células transicionales, cáncer de uretra, cáncer uterino, sarcoma uterino endometrial, cáncer vaginal, glioma de las vías ópticas e hipotalámico, cáncer vulvar, macroglobulinemia de Waldenstrom, tumor de Wilms.

Otro aspecto desvelado en el presente documento es una proteína de unión como se ha desvelado anteriormente para su uso en un método de tratamiento de un paciente que padece un trastorno en el que IL-13 humana es perjudicial que comprende la etapa de administrar una cualquiera de las proteínas de unión desveladas anteriormente antes, durante, o después de la administración de un segundo agente, como se ha discutido anteriormente. En una realización preferente, el agente terapéutico adicional se puede administrar conjuntamente y/o formular conjuntamente con uno o más antagonistas de IL-13 (por ejemplo, anticuerpos anti-IL-13 o fragmentos de los mismos), que incluyen, pero no se limitan a, uno o más de: esteroides inhalados; esteroides orales; beta-agonistas, por ejemplo, beta-agonistas de acción rápida o de acción prolongada; antagonistas de leucotrienos o receptores de leucotrienos; fármacos de combinación tales como ADVAIR; inhibidores de IgE, por ejemplo, anticuerpos anti-IgE (por ejemplo, XOLAIR); inhibidores de la fosfodiesterasa (por ejemplo, inhibidores de PDE4); xantinas; fármacos anticolinérgicos; agentes estabilizantes de mastocitos tales como cromolina; inhibidores de IL-4; inhibidores de IL-5; inhibidores de eotaxina/CCR3; antagonistas de histamina o sus receptores incluyendo H1, H2, H3, y H4, y antagonistas de prostaglandina D o sus receptores (DPI y CRTH2). Tales combinaciones se pueden usar para tratar el asma y otros trastornos respiratorios. Los ejemplos adicionales de agentes terapéuticos que se pueden coadministrar y/o coformular con uno o más anticuerpos anti-IL-13 o fragmentos de los mismos incluyen uno o más de: agonistas del TNF (por ejemplo, un fragmento soluble de un receptor de TNF, por ejemplo, receptor de TNF humano p55 o p75 o derivados de los mismos, por ejemplo, TNFR-IgG de 75 kD (proteína de fusión a receptor de TNF-IgG de 75 kD, ENBREL)); agonistas enzimáticos del TNF, por ejemplo, inhibidores de enzima convertidora del TNF (TACE); antagonistas de receptores muscarínicos; antagonistas de TGF-beta; interferón gamma; perfenidona; agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, metotrexato, leflunomida o un sirolimus (rapamicina) o un análogo de los mismos, por ejemplo, CCI-779; inhibidores de COX2 y cPLA2; AINE, inmunomoduladores; inhibidores de p38, inhibidores de TPL-2, MK-2 y NFkB, entre otros. El segundo agente adicional se selecciona entre el grupo que consiste en budesónida, factor de crecimiento epidérmico, corticosteroides, ciclosporina, sulfasalazina, aminosalicilatos, 6-mercaptopurina, azatioprina, metronidazol, inhibidores de la lipoxigenasa, mesalamina, olsalazina, balsalazida, antioxidantes, inhibidores de tromboxano, antagonistas de receptores de IL-1, anticuerpos monoclonales anti-IL-1 β , anticuerpos monoclonales anti-IL-6, factores de crecimiento, inhibidores de elastasa, compuestos de piridinil-imidazol, anticuerpos o agonistas de TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, y PDGF, anticuerpos de CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 o sus ligandos, metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato de mofetilo, leflunomida, AINE, ibuprofeno, corticosteroides, prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores de complementos, agentes adrenérgicos, IRAK, NIK, IKK, p38, inhibidores de la MAP quinasa, inhibidores de enzima convertidora de IL-1 β , inhibidores de enzima convertidora de TNF α , inhibidores de la señalización de linfocitos T, inhibidores de metaloproteinasas, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de enzima convertidora de angiotensina, receptores solubles de citoquinas, receptor soluble p55 del TNF, receptor soluble p75 del TNF, sIL-IRI, sIL-IRII, SIL-6R, citoquinas antiinflamatorias, IL-4, IL-10, IL-11, y TGF β .

En un aspecto preferente de la divulgación, las composiciones farmacéuticas desveladas anteriormente son para uso en administración al sujeto mediante al menos un modo seleccionado entre parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intracelular, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocárdico, intraóseo, intrapélvico, intrapericardiaco, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretiniano, intraespinal, intrasinovial, intratorácico, intrauterino, intravesical, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, y transdérmico.

Un aspecto de la divulgación proporciona al menos un anticuerpo anti-idiotipo IL-13 frente al menos una proteína de unión a IL-13 de la presente divulgación. El anticuerpo anti-idiotipo incluye cualquier molécula que contiene proteínas o péptidos que comprende al menos una parte de una molécula de inmunoglobulina tal como, pero no limitada a, al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera o una parte de unión a ligando de la misma, una región variable de cadena pesada o cadena ligera, una región constante de cadena pesada o cadena ligera, una región marco, o; cualquier parte de la misma, que se pueda incorporar a una proteína de unión de la presente divulgación.

En una tercera realización la presente invención proporciona un anticuerpo anti-IL-13 recombinante, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de la primera realización de la invención o una composición farmacéutica de la segunda realización de la invención para uso en reducir la actividad de IL-13 humana en un sujeto humano que padece un trastorno en donde es perjudicial la actividad de IL-13, en el que dicho trastorno se selecciona entre el grupo que consiste en trastornos respiratorios; asma; asma alérgica y no alérgica; asma debida a infección; asma debida a infección con virus respiratorio sincitial (RSV); enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD); otras afecciones que implican inflamación de las vías respiratorias; eosinofilia; fibrosis y exceso de producción de mucosidad; fibrosis quística; fibrosis pulmonar; trastornos atópicos; dermatitis atópica; urticaria; eccema; rinitis

alérgica; enterogastritis alérgica: afecciones inflamatorias y/o autoinmunes de la piel; afecciones inflamatorias y/o autoinmunes de órganos gastrointestinales; enfermedades intestinales inflamatorias (IBD); colitis ulcerosa; enfermedad de Crohn; afecciones inflamatorias y/o autoinmunes del hígado; cirrosis hepática; fibrosis hepática; fibrosis hepática causada por virus de la hepatitis B y/o C; esclerodermia; tumores o cánceres; carcinoma hepatocelular; glioblastoma; linfoma; linfoma de Hodgkin; infecciones virales; infección por HTLV-1; supresión de expresión de respuestas inmunitarias protectoras de tipo 1; y supresión de expresión de respuestas inmunitarias protectoras de tipo 1 durante la vacunación.

En una cuarta realización, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo anti-IL-13 recombinante, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de la primera realización de la invención.

En una quinta realización, la presente invención proporciona un vector que comprende un ácido nucleico aislado de acuerdo con la cuarta realización de la invención.

En una sexta realización, la presente invención proporciona una célula hospedadora que comprende un vector de acuerdo con la quinta realización de la invención.

En una séptima realización, la presente invención proporciona un método de producción de una proteína capaz de unirse a IL-13 que comprende cultivar una célula hospedadora de la sexta realización de la invención en un medio de cultivo en condiciones suficientes para producir una proteína de unión capaz de unirse a IL-13.

En una octava realización, la presente invención proporciona una proteína de unión capaz de unirse a IL-13 producida de acuerdo con el método de la séptima realización de la invención.

Descripción detallada de la invención

El ámbito de la presente invención se define mediante las reivindicaciones anexas. En la medida en que otros aspectos de la divulgación estén fuera del ámbito de la presente invención según se define en las reivindicaciones anexas, se presentan con fines comparativos.

La presente divulgación se refiere a proteínas de unión a IL-13 humana, en particular anticuerpos anti-IL-13, o partes de unión a antígeno de los mismos, que se unen a IL-13. Diversos aspectos de la invención se refieren a anticuerpos y fragmentos de anticuerpo, y a composiciones farmacéuticas de los mismos, así como a ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes y células hospedadoras para preparar tales anticuerpos y fragmentos. Los métodos de uso de los anticuerpos de la divulgación para detectar IL-13 humana, para inhibir la actividad de IL-13 humana, ya sea *in vitro* o *in vivo*; y para regular la expresión génica también están incluidos en la divulgación.

A menos que se definan de otro modo en el presente documento, los términos científicos y técnicos que se usan en conexión con la presente divulgación tendrán los significados que entienden habitualmente los expertos habituales en la materia. El significado y ámbito de los términos deberían ser claros aunque, sin embargo, en el caso de cualquier ambigüedad latente, las definiciones proporcionadas en el presente documento prevalecen sobre cualquier diccionario o definición extrínseca. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos en singular incluirán el plural y los términos en plural incluirán el singular. En la presente solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique de otro modo. Además, el uso del término "incluir", así como otras formas, tales como "incluye" y "incluido", no es limitante. Además, términos tales como "elemento" o "componente" abarcan tanto elementos y componentes que comprenden una unidad como elementos y componentes que comprenden más de una subunidad a menos que se indique específicamente de otro modo.

En general, las nomenclaturas usadas en relación con técnicas de cultivo celular y tisular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de proteínas y ácidos nucleicos e hibridación descritas en el presente documento son las bien conocidas y usadas habitualmente en la técnica. Los métodos y técnicas de la presente divulgación se llevan a cabo generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva a menos que se indique de otro modo. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se llevan a cabo de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se consigue habitualmente en la técnica o como se describe en el presente documento. Las nomenclaturas usadas en relación con los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética y química farmacéutica y médica descritas en el presente documento son las bien conocidas y usadas habitualmente en la técnica. Se usan técnicas convencionales para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación, y suministro, y tratamiento de pacientes.

Para que la presente divulgación se comprenda con mayor facilidad, a continuación se definen términos seleccionados.

El término "polipéptido", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier cadena polimérica de aminoácidos. Los términos "péptido" y "proteína" se usan de forma intercambiable con el término polipéptido y también se refieren a una cadena polimérica de aminoácidos. El término "polipéptido" incluye proteínas nativas o

artificiales, fragmentos de proteína y análogos de polipéptido de una secuencia proteica. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico.

5 La expresión "proteína aislada" o "polipéptido aislado" es una proteína o un polipéptido que, en virtud de su origen o fuente de procedencia, no está asociado a componentes asociados naturalmente que lo acompañen en su estado nativo; está sustancialmente exento de otras proteínas de la misma especie; se expresa mediante una célula de una especie diferente; o no es de origen natural. De ese modo, un polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente de la célula a partir de la que se origina naturalmente estará "aislado" de sus componentes asociados naturalmente. Una proteína también puede convertirse en sustancialmente exenta de componentes asociados naturalmente por aislamiento, usando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en la técnica.

15 El término "recuperar", como se usa en el presente documento, se refiere al proceso de hacer que una especie química, tal como un polipéptido, esté sustancialmente exenta de componentes asociados naturalmente por aislamiento, por ejemplo, usando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en la técnica.

20 Las expresiones "IL-13 humana" y "tipo silvestre de IL-13 humana" (abreviadas en el presente documento h IL-13, h IL-13wt), como se usan en el presente documento, incluyen una citoquina humana segregada principalmente por linfocitos T auxiliares 2. Las expresiones incluyen una proteína monomérica de un polipéptido de 13 kDa. La estructura de la IL-13 humana se describe adicionalmente, por ejemplo, en Moy, Diblasio *et al.* 2001 J Mol Biol 310 219-30. Se pretende que la expresión IL-13 humana incluya IL-13 humana recombinante (rh IL-13), que se puede preparar mediante métodos de expresión recombinante convencionales. La Tabla 1 muestra la secuencia de aminoácidos de IL-13 humana, SEQ ID NO: 1, que se conoce en la técnica.

Tabla 1: Secuencia de IL-13 humana

Proteína	Identificador de secuencia	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
IL-13 Humana	SEQ ID NO: 1	MALLLTTVIALTCLGGFASPGVPPSTALREL IEELVNI TQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGMYC AALES LINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVS AQFSSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLLHLKLFRE GRFN

25 La expresión "variante de IL-13 humana" (abreviada en el presente documento h IL-13v), como se usa en el presente documento, incluye una variante de IL-13 humana en donde el resto de aminoácido 130 de la SEQ ID NO: 1 cambia de arginina a glutamina (R130Q).

30 "Actividad biológica", como se usa en el presente documento, se refiere a todas las propiedades biológicas inherentes de la citoquina. Las propiedades biológicas de IL-13 incluyen, pero no se limitan a, unión al receptor de IL-13; (otros ejemplos incluyen intercambio de isotipo de inmunoglobulina a IgE en linfocitos B humanos y supresión de la producción de citoquinas inflamatorias).

35 Las expresiones "unión específica" o "unido específicamente", como se usan en el presente documento, por referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína, o un péptido con una segunda especie química, significan que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (por ejemplo, un determinante antigénico o epítipo) de la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura proteica específica en lugar de a proteínas en general. Si un anticuerpo es específico para un epítipo "A", la presencia de una molécula que contiene el epítipo A (o A libre sin marcar), en una reacción que contiene "A" marcado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo.

45 El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a cualquier molécula de inmunoglobulina (Ig) comprendida por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), o cualquier fragmento funcional, mutante, variante, o derivación de la misma, que retiene las características esenciales de unión a epítipo de una molécula de Ig. Tales formatos de anticuerpo mutante, variante, o derivado se conocen en la técnica. Posteriormente se discuten realizaciones no limitantes de los mismos.

50 En un anticuerpo de cadena completa, cada cadena pesada está comprendida por una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está comprendida por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está comprendida por una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está comprendida por un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden estar subdivididas además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas,

denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL está comprendida por tres CDR y cuatro FR, dispuestas del extremo amino terminal al extremo carboxi terminal el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IGE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2) o subclase.

5 La expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "parte de anticuerpo"), como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, hIL-13). Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede llevar a cabo mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Tales realizaciones de anticuerpo también pueden ser formatos diespecíficos, de especificidad doble, o de especificidad múltiple; unión específica a dos o más antígenos diferentes. Algunos ejemplos de fragmentos de unión incluidos en la expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento divalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un brazo individual de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) Nature 341:544-546, Winter *et al.*, documento de publicación PCT WO 90/05144 A1), que comprende un solo dominio variable; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, estén codificados por genes distintos, se pueden unir, usando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que les permita prepararse en forma de una sola cadena proteica en la que la pareja de regiones VL y VH forma moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena individual (scFv); véanse, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) Science 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). También se pretende que tales anticuerpos de cadena individual estén incluidos en la expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo. También se incluyen otras formas de anticuerpos de cadena individual, tales como dianticuerpos. Los dianticuerpos son anticuerpos divalentes diespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena polipeptídica, pero usando un conector que es demasiado corto para permitir que se emparejen entre los dos dominios de la misma cadena, forzando de ese modo a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (véanse, por ejemplo, Holliger, P., *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R.J., *et al.* (1994) Structure 2:1121-1123). Tales partes de unión a anticuerpo se conocen en la técnica (Kontermann y Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. Nueva York, pág. 790 (ISBN 3-540-41354-5)).

La expresión "construcción de anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que comprende una o más de las partes de unión a antígeno de la divulgación unidas a un polipéptido conector o un dominio constante de inmunoglobulina. Los polipéptidos conectores comprenden dos o más restos de aminoácido unidos mediante enlaces peptídicos y se usan para unir una o más partes de unión a antígeno. Tales polipéptidos conectores se conocen en la técnica (véanse, por ejemplo, Holliger, P., *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R.J., *et al.* (1994) Structure 2:1121-1123). Un dominio constante de inmunoglobulina se refiere a un dominio constante de cadena pesada o ligera. Las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de cadena ligera y cadena pesada de IgG humana se conocen en la técnica y se representan en la Tabla 2.

Tabla 2: Secuencia de dominio constante de cadena pesada y dominio constante de cadena ligera de IgG humana

Proteína	Identificador de secuencia	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
Región constante de gamma-1 Ig	SEQ ID NO: 2	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTISWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDITLMISRTEPVCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK

Mutante de región constante de gamma-1 Ig	SEQ ID NO: 3	ASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCEVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
Región constante de Kappa de Ig	SEQ ID NO: 4	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNFFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSY YLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
Región constante de Lambda de Ig	SEQ ID NO: 5	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTSPKQSNK YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS

Además, un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo puede ser parte de una molécula de inmunoadhesión mayor, formada mediante asociación covalente o no covalente del anticuerpo o parte de anticuerpo con uno o más proteínas o péptidos distintos. Algunos ejemplos de tales moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región núcleo de estreptoavidina para preparar una molécula de scFv tetrámera (Kipriyanov, S.M., *et al.* (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101) y el uso de un resto de cisteína, un péptido marcador y una etiqueta de polihistidina C-terminal para preparar moléculas de scFv divalentes y biotinadas (Kipriyanov, S.M., *et al.* (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058). Las partes de anticuerpo, tales como los fragmentos Fab y F(ab')₂, se pueden preparar a partir de anticuerpos completos usando técnicas convencionales, tales como digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de los anticuerpos completos. Además, se pueden obtener anticuerpos, partes de anticuerpo y moléculas de inmunoadhesión usando técnicas convencionales de ADN recombinante, como se describe en el presente documento.

Un "anticuerpo aislado", como se usa en el presente documento, pretende referirse a un anticuerpo que está básicamente exento de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a hIL-13 está sustancialmente exento de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos que hIL-13). Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a hIL-13, puede tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de IL-13 de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente exento de otro material celular y/o compuestos químicos.

La expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes procedentes de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humanas. Los anticuerpos humanos de la divulgación pueden incluir restos de aminoácido no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humanas (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis *in vitro* aleatoria o específica de sitio o mediante mutación *in vivo* somática), por ejemplo en las CDR y, en particular, en CDR3. Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que se han injertado secuencias de CDR procedentes de la línea germinal de otras especies de mamífero, tales como un ratón) en secuencias marco humanas.

La expresión "anticuerpo humano recombinante", como se usa en el presente documento, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan mediante medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión transfectado en una célula hospedadora (descritos adicionalmente en la Sección II C posterior), anticuerpos aislados de una librería de anticuerpos humana combinatoria recombinante (Hoogenboom H.R., (1997) TIB Tech. 15:62-70; Azzazy H., y Highsmith W.E., (2002) Clin. Biochem. 35:425-445; Gavilondo J.V., y Larrick J.W. (2002) BioTechniques 29:128-145; Hoogenboom H., y Chames P. (2000) Immunology Today 21:371-378), anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, Taylor, L. D., *et al.* (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Kellermann S-A., y Green L.L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13:593-597; Little M. *et al.* (2000) Immunology Today 21:364-370) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante otros medios que impliquen corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes procedentes de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humanas. Sin embargo, en ciertas realizaciones, tales anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis *in vivo* somática) y, de ese modo, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de

los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque proceden y están relacionadas con secuencias de VH y VL de línea germinal humanas, pueden no existir de forma natural en el repertorio *in vivo* de línea germinal de anticuerpos humanos. Una realización proporciona anticuerpos completamente humanos capaces de unirse a IL-13 humana que se pueden generar usando técnicas bien conocidas en la técnica, tales como, pero no limitadas a, usando librerías de fagos de Ig humana tales como las desveladas en Jermutus *et al.*, documento de Publicación PCT n.º WO 2005/007699 A2.

La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de una especie y secuencias de región constante de otras especies, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de cadena pesada y ligera murinas unidas a regiones constantes humanas.

La expresión "anticuerpo injertado con CDR" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de regiones variables de cadena pesada y ligera de una especie, pero en las que las secuencias de una o más de las regiones CDR de VH y/o VL están reemplazadas con secuencias de CDR de otras especies, tal como anticuerpos que tienen regiones variables de cadena pesada y ligera murinas en las que se han reemplazado una o más de las CDR murinas (por ejemplo, CDR3) con secuencias de CDR humanas.

La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de regiones variables de cadena pesada y ligera de una especie no humana (por ejemplo, un ratón), pero en los que al menos una parte de la secuencia de VH y/o VL se ha alterado para que sea más "de tipo humano", es decir, más similar a secuencias variables de línea germinal humanas. Un tipo de anticuerpo humanizado es un anticuerpo injertado con CDR, en el que se introducen secuencias de CDR humanas en secuencias de VH y VL no humanas para reemplazar las secuencias de CDR no humanas correspondientes. En una realización, se proporcionan anticuerpos humanizados y partes de unión a antígeno anti-IL-13 humana. Tales anticuerpos se generaron obteniendo anticuerpos monoclonales anti-hIL-13 murinos usando tecnología de hibridoma convencional seguida de humanización usando ingeniería genética *in vitro*, tal como las que se desvela en Kasaian *et al.*, documento de publicación PCT n.º WO 2005/123126 A2.

Las expresiones "numeración de Kabat", "definiciones de Kabat" y "marcaje de Kabat" se usan de forma intercambiable en el presente documento. Estas expresiones, que se reconocen en la técnica, se refieren a un sistema de numeración de restos de aminoácido que son más variables (es decir, hipervariables) que otros restos de aminoácido en las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo, o una parte de unión a antígeno del mismo (Kabat *et al.* (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391 y, Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication n.º 91-3242). Para la región variable de cadena pesada, la región hipervariable varía de las posiciones de aminoácido 31 a 35 para CDR1, las posiciones de aminoácido 50 a 65 para CDR2, y las posiciones de aminoácido 95 a 102 para CDR3. Para la región variable de cadena ligera, la región hipervariable varía de las posiciones de aminoácido 24 a 34 para CDR1, las posiciones de aminoácido 50 a 56 para CDR2, y las posiciones de aminoácido 89 a 97 para CDR3.

Como se usa en el presente documento, el término "aceptor" y la expresión "anticuerpo aceptor" se refieren al anticuerpo o la secuencia de ácido nucleico aunque proporciona o codifica al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o un 100 % de las secuencias de aminoácidos de una o más de las regiones marco. En algunas realizaciones, el término "aceptor" se refiere a la secuencia de aminoácidos o ácido nucleico de anticuerpo que proporciona o codifica una o más de las regiones marco y la región o regiones constantes. En una realización específica, el término "aceptor" se refiere a una secuencia de aminoácidos o ácido nucleico de anticuerpo que proporciona o codifica al menos un 80 %, preferentemente, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, o un 100 % de las secuencias de aminoácidos de una o más regiones marco. De acuerdo con esta realización, un aceptor puede contener al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, o al menos 10 restos de aminoácido que no se encuentran en una o más posiciones específicas de un anticuerpo humano. Una región marco aceptora y/o región o regiones constantes aceptoras pueden provenir u obtenerse, por ejemplo, de un gen de anticuerpo de línea germinal, un gen de anticuerpo maduro, un anticuerpo funcional (por ejemplo, anticuerpos bien conocidos en la técnica, anticuerpos en desarrollo, o anticuerpos disponibles en el mercado).

Como se usa en el presente documento, el término "CDR" se refiere a la región determinante de complementariedad de las secuencias variables de anticuerpo. Existen tres CDR en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, que se denominan CDR1, CDR2 y CDR3, para cada una de las regiones variables. La expresión "conjunto de CDR", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de tres CDR que se encuentran en una región variable individual capaz de unirse al antígeno. El sistema descrito por Kabat (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) y (1991)) no solo proporciona un sistema de numeración de restos inequívoco aplicable a cualquier región variable de un anticuerpo, sino también proporciona los límites de restos precisos que definen las tres CDR. Estas CDR se pueden denominar CDR de Kabat. Chothia y colaboradores (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) y Chothia *et al.*, Nature 342:877-883 (1989)) descubrieron que ciertas subporciones de las CDR de Kabat adoptan conformaciones de cadena principal peptídica casi idénticas, a pesar de tener una gran diversidad a nivel de la

5 secuencia de aminoácidos. Estas subporciones se denominaron L1, L2 y L3 o H1, H2 y H3, donde la "L" y la "H" indican las regiones de cadena ligera y cadena pesada, respectivamente. Estas regiones se pueden denominar CDR de Chothia, que tienen límites que se superponen con las CDR de Kabat. Se han descrito otros límites que definen CDR que se superponen con las CDR de Kabat mediante Padlan (FASEB J. 9:133-139 (1995)) y MacCallum (J Mol Biol 262(5):732-45 (1996)). Otras definiciones de límites de CDR adicionales pueden no seguir estrictamente uno de los sistemas anteriores, pero no obstante se superpondrán con las CDR de Kabat, aunque se acortarán o alargarán en vista de predicción o descubrimientos experimentales siempre y cuando los restos particulares o grupos de restos o incluso las CDR completas no tengan un impacto significativo en la unión al antígeno. Los métodos usados en el presente documento pueden utilizar CDR definidas de acuerdo con cualquiera de estos sistemas, aunque las realizaciones preferentes usan las CDR definidas por Kabat o Chothia.

10 Como se usa en el presente documento, el término resto "canónico" se refiere a un resto en una CDR o un marco que define una estructura de CDR canónica según se define por Chothia *et al.* (J. Mol. Biol. 196:901-907 (1987); Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 227:799 (1992)). De acuerdo con Chothia *et al.*, partes críticas de las CDR de numerosos anticuerpos tienen conformaciones de cadena principal peptídica casi idénticas a pesar de una gran diversidad a nivel de secuencia de aminoácidos. Cada estructura canónica especifica principalmente un conjunto de ángulos de torsión de la cadena principal peptídica para un segmento contiguo de restos de aminoácido que forman un bucle.

15 Como se usa en el presente documento, el término "donador" y la expresión "anticuerpo donador" se refieren a un anticuerpo que proporciona una o más CDR. En una realización preferente, el anticuerpo donador es un anticuerpo de una especie diferente al anticuerpo del que se obtienen o proceden las regiones marco. En el contexto de un anticuerpo humanizado, la expresión "anticuerpo donador" se refiere a un anticuerpo no humano que proporciona una o más CDR.

20 Como se usa en el presente documento, el término "marco" o la expresión "secuencia de marco" se refiere a las secuencias remanentes de una región variable menos las CDR. Debido a que la definición exacta de una secuencia de CDR se puede determinar mediante diferentes sistemas, el significado de una secuencia de marco es sujeto de diferentes interpretaciones de forma correspondiente. Las seis CDR (CDR-L1, CDR-L2, y CDR-L3 de cadena ligera y CDR-H1, CDR-H2, y CDR-H3 de cadena pesada) también dividen las regiones marco de la cadena ligera y la cadena pesada en cuatro subregiones (FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada cadena, en las que CDR1 se sitúa entre FR1 y FR2, CDR2 entre FR2 y FR3, y CDR3 entre FR3 y FR4. Sin especificar las subregiones particulares como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región marco, según otra denominación, representa las FR combinadas en la región variable de una cadena de inmunoglobulina individual de origen natural. Como se usa en el presente documento, una FR representa una de las cuatro subregiones, y las FR representan dos o más de las cuatro subregiones que constituyen una región marco.

25 Las secuencias aceptoras de cadena pesada y cadena ligera humanas se conocen en la técnica. En una realización de la divulgación, las secuencias aceptoras de cadena pesada y cadena ligera humanas se seleccionan entre las secuencias descritas en la Tabla 3 y la Tabla 4.

40

TABLA 3: SECUENCIAS ACEPTORAS DE CADENA PESADA

SEQ ID NO:	Región de la proteína	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
6	FR1 VH1-18 y JH6	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT
7	FR2 VH1-18 y JH6	WVRQAPGQGLEWMMG
8	FR3 VH1-18 y JH6	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
9	FR4 VH1-18 y JH6	WGQGTITVTVSS
6	FR1 21/28 y JH4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT
10	FR2 21/28 y JH4	WVRQAPGQRLEWMMG
11	FR3 21/28 y JH4	RVTITRDTASASTAYMELSSLRSED TAVYYCAR
12	FR4 21/28 y JH4	WGQGTILVTVSS
13	FR1 VH2-26 y JH6	QVTILKESGPVLVKPTETLT LTCTVSGFSL S
14	FR2 VH2-26 y JH6	WIRQPPGKALEWLAH
15	FR3 VH2-26 y JH6	RLTISKDTSKSQVVLTMNMDPVD TATYYCAR

9	FR4 VH2-26 y JH6	WGQGITVTVSS
16	FR1 M60 y JH4	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTLYGFSL
17	FR2 M60 y JH4	WIRQPPGKALEWLA
18	FR3 M60 y JH4	RLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATATYYCAR
12	FR4 M60 y JH4	WGQGTLLVTVSS

SEQ ID NO:	Región de la proteína	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
6	FR1 VH1-46 y JH6	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
7	FR2 VH1-46 y JH6	WVRQAPGQGLEWMMG
19	FR3 VH1-46 y JH6	RVIMTRDITSTIVYMESSLRSEDTAVYYCAR
9	FR4 VH1-46 y JH6	WGQGITVTVSS

TABLA 4 SECUENCIAS ACEPTORAS DE CADENA LIGERA

SEQ ID NO:	Región de la proteína	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
20	FR1 A20 y JK4	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC
21	FR2 A20 y JK4	WYQQKPGKVPKLLIY
22	FR3 A20 y JK4	GVPDRFSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYC
23	FR4 A20 y JK4	FGGGTKVEIKR
20	FR1 III-3R y JK4	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC
24	FR2 III-3R y JK4	WYQQKPGKAPKLLIY
25	FR3 III-3R y JK4	GVPDRISGSGTDFTFTISLQPEDVATYYC
23	FR4 III-3R y JK4	FGGGTKVEIKR
26	FR1 A1 y JK4	DVVMTQSPSLPVTILGQPASISC
27	FR2 A1 y JK4	WFQQRPGQSPRRLIY
28	FR3 A1 y JK4	GVPDRFSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYYC
23	FR4 A1 y JK4	FGGGTKVEIKR
29	FR1 01 y JK2	DIVMTQTPSLPVTIPGEPASISC
30	FR2 01 y JK2	WYLQKPGQSPQLLIY
28	FR3 01 y JK2	GVPDRFSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYYC
31	FR4 01 y JK2	FGQGTKLEIKR

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "gen de anticuerpo de línea germinal" o "fragmento génico" se refiere a una secuencia de inmunoglobulina codificada por células no linfoides que no ha experimentado el proceso de maduración que conduce a redistribución y mutación genética para expresión de una inmunoglobulina particular (véanse, por ejemplo, Shapiro *et al.*, Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200 (2002); Marchalonis *et al.*, Adv Exp Med Biol. 484:13-30 (2001)). Una de las ventajas provistas por diversas realizaciones de la presente divulgación radica en el reconocimiento de que es más probable que los genes de anticuerpo de línea germinal conserven las estructuras de secuencias de aminoácidos esenciales características de los individuos de la especie que los genes de anticuerpos maduros, y por tanto es menos probable que se reconozcan como una fuente extraña cuando se usan terapéuticamente en esa especie.

10

- 5 Como se usa en el presente documento, la expresión restos "clave" se refiere a ciertos restos en la región variable que tienen más impacto en la especificidad y/o afinidad de unión de un anticuerpo, en particular un anticuerpo humanizado. Un resto clave incluye, pero no se limita a, uno o más de los siguientes: un resto que es adyacente a una CDR, un sitio de glicosilación potencial (puede ser un sitio de N- u O-glicosilación), un resto poco frecuente, un resto capaz de interactuar con el antígeno, un resto capaz de interactuar con una CDR, un resto canónico, un resto de contacto entre la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera, un resto en la zona de Vernier, y un resto en la región que se superpone entre la definición de Chothia de una cadena pesada variable CDR1 y la definición de Kabat del primer marco de cadena pesada.
- 10 Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo o una variante, derivado, análogo o fragmento del mismo que se une de forma inmunespecífica a un antígeno de interés y que comprende una región marco (FR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano y una región determinante de complementariedad (CDR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo no humano. Como se usa en el presente documento, el término "sustancialmente", en el contexto de un anticuerpo, se refiere a una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, preferentemente al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de una CDR de un anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente la totalidad de al menos uno, y por lo general dos, dominios variables (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv) en los que todas o sustancialmente todas las regiones de CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, anticuerpo donador) y todas o sustancialmente todas las regiones marco son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. Preferentemente, un anticuerpo humanizado también comprende al menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, por lo general la de una inmunoglobulina humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado contiene tanto la cadena ligera como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3, y CH4 de la cadena pesada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado solo contiene una cadena ligera humanizada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado solo contiene una cadena pesada humanizada. En realizaciones específicas, un anticuerpo humanizado solo contiene un dominio variable humanizado de una cadena ligera y/o una cadena pesada humanizada.
- 20 El anticuerpo humanizado se puede seleccionar entre cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo, sin limitación, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y se pueden seleccionar dominios constantes particulares para optimizar funciones efectoras deseadas usando técnicas bien conocidas en la técnica.
- 25 Las regiones marco y CDR de un anticuerpo humanizado no necesitan corresponder de forma precisa con las secuencias precursoras, por ejemplo, la CDR del anticuerpo donador o el marco de consenso pueden presentar una mutación por sustitución, inserción y/o delección de al menos un resto de aminoácido de un modo tal que el resto de CDR o marco en ese sitio no corresponda con el del anticuerpo donador o el marco de consenso. Sin embargo, en una realización preferente, tales mutaciones no serán extensas. Habitualmente, al menos un 80 %, preferentemente al menos un 85 %, más preferentemente al menos un 90 %, y lo más preferentemente al menos un 95 % de los restos de anticuerpo humanizado corresponderán con los de las secuencias de FR y CDR precursoras. Como se usa en el presente documento, la expresión "marco de consenso" se refiere a una región marco en la secuencia de inmunoglobulina de consenso. Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia de inmunoglobulina de consenso" se refiere a la secuencia formada por los aminoácidos (o nucleótidos) que aparecen con la mayor frecuencia en una familia de secuencias de inmunoglobulina relacionadas (véase, por ejemplo, Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania 1987). En una familia de inmunoglobulinas, cada posición en la secuencia de consenso está ocupada por el aminoácido que aparece con la mayor frecuencia en esa posición en la familia. Si dos aminoácidos aparecen con igual frecuencia, cualquiera de los dos puede estar incluido en la secuencia de consenso.
- 30 Como se usa en el presente documento, zona de "Vernier" se refiere a un subconjunto de restos de marco que pueden encajar en una estructura de CDR y afinar de forma precisa el ajuste al antígeno como describen Foote y Winter (1992, J. Mol. Biol. 224:487-499). Los restos de la zona de Vernier forman una capa subyacente a las CDR y puede tener impacto en la estructura de las CDR y la afinidad del anticuerpo.
- 35 La expresión "proteína de unión multivalente" se usa en la presente memoria descriptiva para indicar una proteína de unión que comprende dos o más sitios de unión a antígeno. Preferentemente, la proteína de unión multivalente se somete a ingeniería para que tenga tres o más sitios de unión a antígeno, y generalmente no es un anticuerpo de origen natural. La expresión "proteína de unión multiespecífica" se refiere a una proteína de unión capaz de unirse a dos o más dianas relacionadas o sin relacionar. Proteínas de unión de dominio variable doble (DVD), como se usa en el presente documento, son proteínas de unión que comprenden dos o más sitios de unión a antígeno y son proteínas de unión tetravalentes o multivalentes. Tales DVD pueden ser monoespecíficas, es decir, capaces de unirse a un antígeno, o multiespecíficas, es decir, capaces de unirse a dos o más antígenos. Las proteínas de unión de DVD que comprenden dos polipéptidos de DVD de cadena pesada y dos polipéptidos de DVD de cadena ligera se denominan Ig de DVD. Cada mitad de una Ig de DVD comprende un polipéptido de DVD de cadena pesada, y un polipéptido de DVD de cadena ligera, y dos sitios de unión a antígeno. Cada sitio de unión comprende un dominio

variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera con un total de 6 CDR implicadas en la unión a antígeno por sitio de unión a antígeno.

5 Como se usa en el presente documento, el término "neutralizante" se refiere a la neutralización de la actividad biológica de una citoquina cuando una proteína de unión se une específicamente a la citoquina. Preferentemente, una proteína de unión neutralizante es un anticuerpo neutralizante cuya unión a hIL-13 y/o hIL-13 da como resultado la inhibición de una actividad biológica de hIL-13 y/o hIL-13. Preferentemente, la proteína de unión neutralizante se une a hIL-13 y/o hIL-13 y reduce una actividad biológica de IL-13 y/o hIL-13 en al menos aproximadamente un 20 %, 40 %, 60 %, 80 %, 85 % o más. La inhibición de una actividad biológica de hIL-13 y/o hIL-13 mediante una proteína de unión neutralizante se puede evaluar por medición de uno o más indicadores de la actividad biológica de hIL-13 y/o hIL-13 conocidos en la técnica. Por ejemplo, la inhibición de producción inducida por IL-13 humana de TARC (CCL-17) por parte de células A-549 (véase el Ejemplo 1.1.C).

15 El término "actividad" incluye actividades tales como la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo por un antígeno, por ejemplo, un anticuerpo anti-hIL-13 que se une a un antígeno IL-13 y/o la potencia neutralizante de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-hIL-13 cuya unión a hIL-13 inhibe la actividad biológica de hIL-13, por ejemplo, la inhibición de producción inducida por IL-13 humana de TARC (CCL-17) por parte de células A-549 (véase el Ejemplo 1.1.C).

20 El término "epítipo" incluye cualquier determinante polipeptídico capaz de unirse específicamente a un receptor de inmunoglobulina o linfocito T. En ciertas realizaciones, los determinantes de epítipo incluyen agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, fosforilo, o sulfonilo y, en ciertas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno a la que se une un anticuerpo. En ciertas realizaciones, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce preferentemente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

30 La expresión "resonancia plasmónica superficial", como se usa en el presente documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas en una matriz biosensora, por ejemplo, usando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, N. J.). Para descripciones adicionales, véanse Jönsson, U., *et al.* (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jönsson, U., *et al.* (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnson, B., *et al.* (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; y Johnson, B., *et al.* (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277.

35 El término " K_{on} ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de velocidad de asociación para la asociación de un anticuerpo al antígeno para formar el complejo anticuerpo/antígeno, como se conoce en la técnica.

40 El término " K_{off} ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de velocidad de disociación para la disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno, como se conoce en la técnica.

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

45 La expresión "proteína de unión marcada", como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína con una marca incorporada que proporciona la identificación de la proteína de unión. Preferentemente, la marca es un marcador detectable, por ejemplo, la incorporación de un aminoácido radiomarcado o unión a un polipéptido de restos biotinados que se puede detectar mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptoavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que se puede detectar mediante métodos ópticos o colorimétricos).
50 Algunos ejemplos de marcas para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, las siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, 3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , o ^{153}Sm); marcas fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantánido), marcas enzimáticas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, luciferasa, fosfatasa alcalina); marcadores quimioluminiscentes; grupos biotinados; epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítipo); y agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio.

60 La expresión "conjugado de anticuerpo" se refiere a una proteína de unión, tal como un anticuerpo, unida químicamente a un segundo resto químico, tal como un agente terapéutico o citotóxico. El término "agente" se usa en el presente documento para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica, o un extracto realizado a partir de materiales biológicos. Preferentemente, el agente terapéutico o citotóxico incluye, pero no se limita a, toxina de *B. pertussis*, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona,
65 glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos.

Los términos "cristal", y "cristalizado", como se usan en el presente documento, se refieren a un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, que existe en forma de un cristal. Los cristales son una forma del estado sólido de la materia, que es distinta de otras formas tales como el estado sólido amorfo o el estado cristalino líquido. Los cristales están compuestos por conjuntos tridimensionales repetitivos regulares de átomos, iones, moléculas (por ejemplo, proteínas tales como anticuerpos), o ensamblajes moleculares (por ejemplo, complejos antígeno/anticuerpo). Estos conjuntos tridimensionales se disponen de acuerdo con relaciones matemáticas específicas que se comprenden bien en el campo. La unidad fundamental, o elemento constitutivo, que se repite en un cristal se denomina unidad asimétrica. La repetición de la unidad asimétrica en una disposición que conforma una simetría cristalográfica bien definida dada proporciona la "celdilla unidad" del cristal. La repetición de la celdilla unidad mediante traslaciones regulares en las tres dimensiones proporciona el cristal. Véase, Giege, R. y Ducruix, A. Barrett, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 2ª ed., pág. 201-16, Oxford University Press, Nueva York, Nueva York, (1999).

El término "polinucleótido", al que se hace referencia en el presente documento, significa una forma polimérica de dos o más nucleótidos, ya sean ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas mono y bicatenarias de ADN, pero preferentemente es ADN bicatenario.

La expresión "polinucleótido aislado", como se usa en el presente documento, pretende indicar un polinucleótido (por ejemplo, de origen genómico, ADNc, o sintético, o alguna combinación de los mismos) que, en virtud de su origen, el "polinucleótido aislado": no está asociado con la totalidad o una parte de un polinucleótido con el que el "polinucleótido aislado" se encuentra naturaleza; está unido operativamente a un polinucleótido al que no está unido a la naturaleza; o no aparece en la naturaleza como parte de una secuencia mayor.

El término "vector", como se usa en el presente documento, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Otro tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular al que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde los segmentos de ADN adicionales pueden estar ligados al genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamífero) se pueden integrar en el genoma de una célula hospedadora tras la introducción en la célula hospedadora, y de ese modo se replican junto con el genoma hospedador. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Se hace referencia a tales vectores en el presente documento como "vectores de expresión recombinante" (o simplemente "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante se encuentran a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se pueden usar de forma intercambiable dado que el plásmido es la forma usada con la mayor frecuencia de un vector. Sin embargo, la invención pretende incluir tales otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados de replicación defectuosa), que sirven para funciones equivalentes.

La expresión "unido operativamente" se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos se encuentran en una relación que les permite funcionar en su manera pretendida. Una secuencia de control "unida operativamente" a una secuencia codificante está ligada de un modo tal que la expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatibles con la secuencia de control. Las secuencias "unidas operativamente" incluyen tanto secuencias de control de expresión que son contiguas al gen de interés como secuencias de control de expresión que actúan en *trans* o a una distancia para controlar el gen de interés. La expresión "secuencia de control de expresión", como se usa en el presente documento, se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de secuencias codificantes a las que están ligadas. Las secuencias de control de expresión incluyen secuencias apropiadas de iniciación de transcripción, terminación, promotor y potenciador; señales eficientes de procesamiento de ARN tales como señales de corte y empalme y poliladenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que mejoran la eficacia de la traducción (es decir, secuencia de consenso de Kozak); secuencias que mejoran la estabilidad de las proteínas; y, cuando se desee, secuencias que mejoran la secreción de proteínas. La naturaleza de tales secuencias de control difiere dependiendo del organismo hospedador; en los procariontes, tales secuencias de control incluyen por lo general promotor, sitio de unión ribosómico, y secuencia de terminación de transcripción; en los eucariotes, por lo general, tales secuencias de control incluyen promotores y secuencia de terminación de transcripción. La expresión "secuencias de control" pretende incluir componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de compañero de fusión. Las construcciones de proteínas de la presente invención se pueden expresar, y purificar, usando vectores de expresión y células hospedadoras conocidas en la técnica, incluyendo casetes de expresión, vectores, células hospedadoras recombinantes y métodos para la expresión recombinante y procesamiento proteolítico de poliproteínas y preproteínas recombinantes originarias de un marco de lectura abierto individual (por ejemplo, documento de Patente WO 2007/014162).

"Transformación", como se define en el presente documento, se refiere a cualquier proceso mediante el que el ADN exógeno entra en una célula hospedadora. La transformación se puede producir en condiciones naturales o artificiales usando diversos métodos bien conocidos en la técnica. La transformación puede depender de cualquier

método conocido para la inserción de secuencias de ácido nucleico extrañas en una célula hospedadora procarionota o eucariota. El método se selecciona basándose en la célula hospedadora que se transforma y puede incluir, pero no se limita a, infección viral, electroporación, lipofección, y bombardeo de partículas. Tales células "transformadas" incluyen células transformadas de forma estable en las que el ADN insertado es capaz de replicación como plásmido de replicación de forma autónoma o como parte del cromosoma hospedador. También pueden incluir células que expresan de forma transitoria el ADN o ARN insertado durante períodos limitados de tiempo.

La expresión "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora"), como se usa en el presente documento, pretende referirse a una célula en la que se ha introducido ADN exógeno. Se ha de entender que tales términos pretenden referirse no solo a la célula objeto particular, sino también a la progenie de tal célula. Debido a que se pueden producir ciertas modificaciones en las generaciones sucesivas debido a mutación o influencias del entorno, de hecho, tal progenie puede no ser idéntica a la célula precursora, pero aún está incluida en el ámbito de la expresión "célula hospedadora", como se usa en el presente documento. Preferentemente, las células hospedadoras incluyen células procarionotas y eucariotas seleccionadas entre cualquiera de los reinos vivos. Las células eucariotas preferentes incluyen células protistas, fúngicas, vegetales y animales. Lo más preferentemente, las células incluyen, pero no se limitan a, la línea celular procarionota *E. Coli*; líneas celulares de mamífero CHO, HEK 293 y COS; la línea celular de insecto Sf9; y la célula fúngica *Saccharomyces cerevisiae*.

Se pueden usar técnicas convencionales de ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, y cultivo y transformación tisular (por ejemplo, electroporación, lipofección). Se pueden llevar a cabo reacciones enzimáticas y técnicas de purificación de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se realiza habitualmente en la técnica o como se describe en el presente documento. Las técnicas y procedimientos anteriores se pueden llevar a cabo, en términos generales, de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)).

"Organismo transgénico", como se conoce en la técnica y se usa en el presente documento, se refiere a un organismo que tiene células que contienen un transgén, en donde el transgén introducido en el organismo (o un ascendiente del organismo) expresa un polipéptido que no se expresa de forma natural en el organismo. Un "transgén" es una construcción de ADN, que se integra de forma estable y operativa en el genoma de una célula a partir de la que se desarrolla un organismo transgénico, dirigiendo la expresión de un producto génico codificado en uno o más tipos celulares o tejidos del organismo transgénico.

Los términos "regular" y "modular" se usan de forma intercambiable y, como se usan en el presente documento, se refieren a un cambio o una alteración en la actividad de una molécula de interés (por ejemplo, la actividad biológica de hIL-13). La modulación puede ser un aumento o una disminución en la magnitud de cierta actividad o función de la molécula de interés. Algunas actividades y funciones a modo de ejemplo de una molécula incluyen, pero no se limitan a, características de unión, actividad enzimática, activación de receptores celulares, y transducción de señales.

De forma correspondiente, el término "modulador", como se usa en el presente documento, es un compuesto capaz de cambiar o alterar una actividad o función de una molécula de interés (por ejemplo, la actividad biológica de hIL-13). Por ejemplo, un modulador puede causar un aumento o disminución en la magnitud de cierta actividad o función de una molécula en comparación con la magnitud de la actividad o función observada en ausencia del modulador. En ciertas realizaciones, un modulador es un inhibidor, que disminuye la magnitud de al menos una actividad o función de una molécula. Algunos inhibidores a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, proteínas, péptidos, anticuerpos, peptidocuerpos, carbohidratos o moléculas orgánicas pequeñas. Se describen peptidocuerpos, por ejemplo, en el documento de Patente WO01/83525.

El término "agonista", como se usa en el presente documento, se refiere a un modulador que, cuando está en contacto con una molécula de interés, causa un aumento en una magnitud de cierta actividad o función de la molécula en comparación con la magnitud de la actividad o función observada en ausencia del agonista. Algunos agonistas particulares de interés pueden incluir, pero no se limitan a, polipéptidos de IL-13 o polipéptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos o cualquier otra molécula que se una a hIL-13.

El término "antagonista" o "inhibidor", como se usa en el presente documento, se refiere a un modulador que, cuando está en contacto con una molécula de interés, causa una disminución en la magnitud de cierta actividad o función de la molécula en comparación con la magnitud de la actividad o función observada en ausencia del antagonista. Algunos antagonistas particulares de interés incluyen los que bloquean o modulan la actividad biológica o inmunológica de hIL-13 y/o hIL-13. Los antagonistas e inhibidores de hIL-13 y/o hIL-13 pueden incluir, pero no se limitan a, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, o cualquier otra molécula, que se una a hIL-13 y/o hIL-13.

La expresión "inhibir la unión al receptor" se refiere a la capacidad de la proteína de unión para prevenir la unión de IL-13 a uno o más de sus receptores. Tal inhibición de la unión al receptor daría como resultado la disminución o eliminación de la actividad biológica mediada por la unión de IL-13 a su receptor o receptores.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de una terapia que es suficiente para reducir o mejorar la gravedad y/o duración de un trastorno o uno o más síntomas del mismo, prevenir el avance de un trastorno, causar la regresión de un trastorno, prevenir la recurrencia, desarrollo, aparición o progreso de uno o más síntomas asociados al trastorno, detectar un trastorno, o potenciar o mejorar el efecto o efectos profilácticos o terapéuticos de otra terapia (por ejemplo, agente profiláctico o terapéutico).

El término "muestra", como se usa en el presente documento, se usa en su sentido más amplio. Una "muestra biológica", como se usa en el presente documento, incluye, pero no se limita a, cualquier cantidad de una sustancia procedente de una entidad viva o una entidad anteriormente viva. Tales entidades vivas incluyen, pero no se limitan a, sujetos humanos, ratones, ratas, monos, perros, conejos y otros animales. Tales sustancias incluyen, pero no se limitan a, sangre, suero, orina, líquido sinovial, células, órganos, tejidos, médula ósea, ganglios linfáticos y bazo.

I. Anticuerpos que se unen a IL-13 humana

Un aspecto de la presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales murinos aislados, o partes de unión a antígeno de los mismos, que se unen a IL-13 con alta afinidad, baja constante de velocidad inversa (*off*) y alta capacidad neutralizante. Otro aspecto de la divulgación proporciona anticuerpos quiméricos que se unen a IL-13. Otro aspecto de la divulgación proporciona anticuerpos humanizados, o partes de unión a antígeno de los mismos, que se unen a IL-13. Preferentemente, los anticuerpos, o las partes de los mismos, son anticuerpos aislados. Preferentemente, los anticuerpos de la invención son anticuerpos neutralizantes anti-IL-13 humana y/o anti-IL-13 humana.

A. Métodos de preparación de anticuerpos anti-IL-13

Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden preparar mediante cualquiera de una diversidad de técnicas conocidas en la técnica.

1. Anticuerpos monoclonales anti-IL-13 usando tecnología de hibridoma

Se pueden preparar anticuerpos monoclonales usando una amplia diversidad de técnicas conocidas en la técnica que incluyen el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes, y de presentación de fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos monoclonales usando técnicas de hibridoma que incluyen las que se conocen en la técnica y se enseñan, por ejemplo, en Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling, *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, no se limita a anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridoma. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que procede de un clon individual, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota, o de fago, y no al método mediante el que se produce.

Los métodos para producir y analizar sistemáticamente anticuerpos específicos usando tecnología de hibridoma son rutinarios y se conocen bien en la técnica. En un aspecto, la presente divulgación proporciona métodos de generación de anticuerpos monoclonales así como anticuerpos producidos mediante el método que comprende cultivar una célula de hibridoma que segrega un anticuerpo de la invención en donde, preferentemente, el hibridoma se genera por fusión de esplenocitos aislados de un ratón inmunizado con un antígeno de la invención con células de mieloma y a continuación analizar sistemáticamente los hibridomas resultantes de la fusión para clones de hibridoma que segreguen un anticuerpo capaz de unirse a un polipéptido de la invención (véase el Ejemplo 1.2). El resumen, se pueden inmunizar ratones con un antígeno IL-13. En una realización preferente, el antígeno IL-13 se administra con un adyuvante para estimular la respuesta inmunitaria. Tales adyuvantes incluyen adyuvante de Freund completo o incompleto, RIBI (muramil dipéptidos) o ISCOM (complejos inmunoestimulantes). Tales adyuvantes pueden proteger al polipéptido de una rápida dispersión secuestrándolo en un depósito local, o pueden contener sustancias que estimulan al hospedador para segregar factores que son quimiotácticos para los macrófagos y otros componentes del sistema inmunitario. Preferentemente, si se administra un polipéptido, el programa de inmunización implicará dos o más administraciones del polipéptido, separadas varias semanas.

Después de la inmunización de un animal con un antígeno IL-13, se pueden obtener anticuerpos y/o células que producen anticuerpos a partir del animal. Se obtiene un suero que contiene anticuerpo anti-IL-13 del animal por sangrado o sacrificio del animal. El suero se puede usar tal como se obtiene a partir del animal, se puede obtener una fracción de inmunoglobulina a partir del suero, o se pueden purificar los anticuerpos anti-IL-13 a partir del suero. El suero o las inmunoglobulinas obtenidas de este modo son policlonales, teniendo de ese modo un conjunto heterogéneo de propiedades.

Una vez se detecta una respuesta inmunitaria, por ejemplo, se detectan anticuerpos específicos frente al antígeno IL-13 en el suero del ratón, se recoge el bazo del ratón y se aíslan los esplenocitos. Los esplenocitos se fusionan a continuación mediante técnicas bien conocidas a cualquier célula de mieloma adecuada, por ejemplo células de la línea celular SP20 disponible en la ATCC. Se seleccionan hibridomas y se clonan mediante dilución limitada. A

continuación, los clones de hibridoma se someten a ensayo mediante métodos conocidos en la técnica para células que segreguen anticuerpos capaces de unirse a IL-13. Se puede generar líquido ascítico, que por lo general contiene altos niveles de anticuerpos, por inmunización de ratones con clones de hibridoma positivos.

5 En otra realización, se pueden preparar hibridomas inmortalizados productores de anticuerpos a partir del animal inmunizado. Después de la inmunización, el animal se sacrifica y los linfocitos B esplénicos se fusionan a células de mieloma inmortalizadas como se conoce bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, citado anteriormente. En una realización preferente, las células de mieloma no segregan polipéptidos de inmunoglobulina (una línea celular no secretora). Después de fusión y selección con antibióticos, los hibridomas se analizan sistemáticamente usando IL-13, o una parte de la misma, o una célula que expresa IL-13. En una realización preferente, el análisis sistemático inicial se lleva a cabo usando un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) o un radioinmunoensayo (RIA), preferentemente un ELISA. Un ejemplo de análisis sistemático con ELISA se proporciona en el documento de Patente WO 00/37504.

15 Se seleccionan, clonan y analizan de forma sistemática adicionalmente hibridomas productores de anticuerpos anti-IL-13 para características deseables, incluyendo crecimiento de hibridoma robusto, alta producción de anticuerpos y características deseables de anticuerpos, como se discute adicionalmente con posterioridad. Los hibridomas se pueden cultivar y expandir *in vivo* en animales sinérgicos, en animales que carecen de sistema inmunitario, por ejemplo, ratones desnudos, o en cultivo celular *in vitro*. Los expertos habituales en la materia conocen bien los métodos de selección, clonación y expansión de hibridomas.

En una realización preferente, los hibridomas son hibridomas de ratón, como se ha descrito anteriormente. En otra realización preferente, los hibridomas se producen en una especie no humana que no es un ratón, tal como ratas, ovejas, cerdos, cabras, ganado o caballos. En otra realización, los hibridomas son hibridomas humanos, en los que un mieloma no secretor humano se condensa con una célula humana que expresa un anticuerpo anti-IL-13.

Se pueden generar fragmentos de anticuerpo que reconocen epítopos específicos mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, se pueden producir fragmentos Fab y F(ab')₂ de la invención mediante escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Los fragmentos F(ab')₂ contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada.

2. Anticuerpos monoclonales anti-IL-13 usando SLAM

35 En otro aspecto de la divulgación, se generan anticuerpos recombinantes a partir de linfocitos aislados individuales usando un procedimiento denominado en la técnica método de anticuerpos de linfocitos seleccionados (SLAM), como se describe en el documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.627.052, el documento de Publicación PCT WO 92/02551 y Babcock, J. S. *et al.* (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848. En este método, las células individuales que segregan anticuerpos de interés, por ejemplo, linfocitos procedentes de uno cualquiera de los animales inmunizados descritos en la Sección 1, se analizan sistemáticamente usando un ensayo en placa hemolítico específico de antígeno, en donde el antígeno IL-13, una subunidad de IL-13, o un fragmento del mismo, se acopla a eritrocitos de oveja usando un conector, tal como biotina, y se usa para identificar células individuales que segregan anticuerpos con especificidad por IL-13. Después de la identificación de las células que segregan anticuerpos de interés, se rescatan los ADNc de las regiones variables de cadena pesada y ligera de las células mediante PCR con transcriptasa inversa, y a continuación, estas regiones variables se expresan, en el contexto de regiones constantes de inmunoglobulina apropiadas (por ejemplo, regiones constantes humanas), en células hospedadoras de mamífero, tales como células COS o CHO. Las células hospedadoras transfectadas con las secuencias de inmunoglobulina amplificadas, procedentes de linfocitos seleccionados *in vivo*, pueden experimentar a continuación análisis adicional y selección *in vitro*, por ejemplo por selección de las células transfectadas para aislar células que expresan anticuerpos frente a IL-13. Las secuencias de inmunoglobulina amplificadas se pueden manipular adicionalmente *in vitro*, tal como mediante métodos de maduración por afinidad *in vitro* tales como los que se describen en el documento de Publicación PCT WO 97/29131 y el documento de Publicación PCT WO 00/56772.

3. Anticuerpos monoclonales anti-IL-13 usando animales transgénicos

55 En otro aspecto de la presente divulgación, se producen anticuerpos por inmunización de un animal no humano que comprende algunos, o todos, los sitios de inmunoglobulina humana con un antígeno IL-13. En una realización preferente, el animal no humano es un ratón transgénico XENOMOUSE, una cepa de ratón sometida a ingeniería genética que comprende grandes fragmentos de los sitios de inmunoglobulina humana y es deficiente en producción de anticuerpos de ratón. Véanse, por ejemplo, Green *et al.* Nature Genetics 7:13-21 (1994) y los documentos de Patente de Estados Unidos con números 5.916.771, 5.939.598, 5.985.615, 5.998.209, 6.075.181, 6.091.001, 6.114.598 y 6.130.364. Véanse también los documentos de Patente WO 91 /10741, publicado el 25 de julio de 1991, WO 94/02602, publicado el 3 de febrero de 1994, WO 96/34096 y WO 96/33735, publicados ambos el 31 de octubre de 1996, WO 98/16654, publicado el 23 de abril de 1998, WO 98/24893, publicado el 11 de junio de 1998, WO 98/50433, publicado el 12 de noviembre de 1998, WO 99/45031, publicado el 10 de septiembre de 1999, WO 99/53049, publicado el 21 de octubre de 1999, WO 00 09560, publicado el 24 de febrero de 2000 y WO 00/037504,

publicado el 29 de junio de 2000. El ratón transgénico XENOMOUSE produce un repertorio humano de tipo adulto de anticuerpos completamente humanos, y genera los mAb humanos específicos de antígeno. El ratón transgénico XENOMOUSE contiene aproximadamente un 80 % del repertorio de anticuerpo humano por introducción de fragmentos YAC de configuración de línea germinal dimensionados en megabase de los sitios de cadena pesada humano y x sitios de cadena ligera. Véanse Mendez *et al.*, *Nature Genetics* 15:146-156 (1997), Green y Jakobovits *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998).

4. Anticuerpos monoclonales anti-IL-13 usando librerías de anticuerpos recombinantes

También se pueden usar métodos *in vitro* para preparar los anticuerpos de la divulgación, en donde se analiza sistemáticamente una librería de anticuerpos para identificar un anticuerpo que tenga la especificidad de unión deseada. Los métodos para tal análisis sistemático de librerías de anticuerpos recombinantes se conocen bien en la técnica e incluyen los métodos descritos, por ejemplo, en Ladner *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.223.409; Kang *et al.*, documento de Publicación PCT n.º WO 92/18619; Dower *et al.*, documento de Publicación PCT n.º WO 91/17271; Winter *et al.*, documento de Publicación PCT n.º WO 92/20791; Markland *et al.*, documento de Publicación PCT n.º WO 92/15679; Breitling *et al.*, documento de Publicación PCT n.º WO 93/01288; McCafferty *et al.*, documento de Publicación PCT n.º WO 92/01047; Garrard *et al.*, documento de Publicación PCT n.º WO 92/09690; Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; McCafferty *et al.*, *Nature* (1990) 348:552-554; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J Mol Biol* 226:889-896; Clackson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrard *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137; y Barbas *et al.* (1991) *PNAS* 88:7978-7982, documento de publicación de solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 20030186374, y documento de Publicación PCT n.º WO 97/29131.

La librería de anticuerpos recombinantes puede proceder de un sujeto inmunizado con IL-13 o IL-13, o una parte de IL-13 o IL-13. Alternativamente, la librería de anticuerpos recombinantes puede proceder de un sujeto inexperto, es decir, el que no se ha inmunizado con IL-13, tal como una librería de anticuerpos humanos procedente de un sujeto humano que no se ha inmunizado con IL-13 humana. Los anticuerpos de la invención se seleccionan por análisis sistemático de la librería de anticuerpos recombinantes con el péptido que comprende IL-13 humana para seleccionar de ese modo los anticuerpos que reconocen IL-13. Los métodos para llevar a cabo tal análisis sistemático y selección se conocen en la técnica, tal como se describe en las referencias en el párrafo precedente. Para seleccionar anticuerpos de la divulgación que tengan afinidades de unión particulares por hIL-13, tales como las que se disocian de IL-13 humana con una constante de velocidad k_{off} particular, se puede usar el método conocido en la técnica de resonancia plasmónica superficial para seleccionar anticuerpos que tengan la constante de velocidad k_{off} deseada. Para seleccionar anticuerpos de la divulgación que tengan una actividad neutralizante particular para hIL-13, tales como aquellos con un valor de CI_{50} particular, se pueden usar métodos convencionales conocidos en la técnica para evaluar la inhibición de la actividad de hIL-13.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un anticuerpo aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, que se une a IL-13 humana. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo neutralizante. En diversos aspectos de la divulgación, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante o un anticuerpo monoclonal.

Por ejemplo, los anticuerpos de la presente divulgación también se pueden generar usando diversos métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en fagos, se presentan dominios de anticuerpos funcionales en la superficie de partículas de fago que portan las secuencias de polinucleótidos que los codifican. En una particular, tal fago se puede utilizar para presentar dominios de unión a antígeno expresados a partir de un repertorio o librería de anticuerpos combinatoria (por ejemplo, humano o murino). El fago que expresa un dominio de unión a antígeno que se une al antígeno de interés se puede seleccionar o identificar con antígeno, por ejemplo, usando antígeno marcado o antígeno unido a o capturado en una superficie sólida o perla. Los fagos usados en estos métodos son por lo general fagos filamentosos que incluyen dominios de unión fd y M13 expresados a partir del fago con dominios de anticuerpo Fab, Fv o Fv estabilizado con disulfuro fusionados de forma recombinante a la proteína del gen III o el gen VIII del fago. Algunos ejemplos de métodos de presentación en fagos que se pueden usar para preparar los anticuerpos de la presente divulgación incluyen los desvelados en Brinkman *et al.*, *J. Immunol. Methods* 182:41-50 (1995); Ames *et al.*, *J. Immunol. Methods* 184:177-186 (1995); Kettleborough *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 24:952-958 (1994); Persic *et al.*, *Gene* 187 9-18 (1997); Burton *et al.*, *Advances in Immunology* 57:191-280 (1994); documento de solicitud PCT n.º PCT/GB91/01134; documentos de publicación PCT con números WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y documentos de Patente de Estados Unidos con números 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

Como se describe en las referencias anteriores, después de la selección en fagos, las regiones que codifican el anticuerpo del fago se pueden aislar y usar para generar anticuerpos completos incluyendo anticuerpos humanos o cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado, y expresar en cualquier hospedador deseado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levaduras, y bacterias, por ejemplo, como se describe con detalle posteriormente. Por ejemplo, también se pueden emplear técnicas para producir de forma recombinante fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ usando métodos conocidos en la técnica tales como los desvelados en el documento

de publicación PCT n.º WO 92/22324; Mullinax *et al.*, *BioTechniques* 12(6):864-869 (1992); y Sawai *et al.*, *AJRI* 34:26-34 (1995); y Better *et al.*, *Science* 240:1041-1043 (1988). Algunos ejemplos de técnicas que se pueden usar para producir Fv de cadena individual y anticuerpos incluyen los descritos en los documentos de Patente de Estados Unidos con números 4.946.778 y 5.258.498; Huston *et al.*, *Methods in Enzymology* 203:46-88 (1991); Shu *et al.*, *PNAS* 90:7995-7999 (1993); y Skerra *et al.*, *Science* 240:1038-1040 (1988).

Alternativamente al análisis sistemático de librerías de anticuerpos recombinantes por presentación en fagos, se pueden aplicar otras metodologías conocidas en la técnica para analizar sistemáticamente grandes librerías combinatorias para la identificación de anticuerpos de especificidad doble de la divulgación. Un tipo de sistema de expresión alternativo es aquel en el que la librería de anticuerpos recombinantes se expresa en fusiones de ARN-proteína, como se describe en el documento de Publicación PCT n.º WO 98/31700 de Szostak y Roberts, y en Roberts, R.W. y Szostak, J.W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12297-12302. En este sistema, se crea una fusión covalente entre un ARNm y el péptido o proteína que codifica mediante traducción *in vitro* de los ARNm sintéticos que portan puromicina, un antibiótico aceptor de peptidilo, en su extremo 3'. De ese modo, se puede enriquecer un ARNm específico de una mezcla compleja de ARNm (por ejemplo, una librería combinatoria) basada en las propiedades del péptido o proteína codificado, por ejemplo, anticuerpo, o parte del mismo, tal como unión del anticuerpo, o la parte del mismo, al antígeno con especificidad doble. Las secuencias de ácido nucleico que codifican los anticuerpos, o las partes de los mismos, recuperadas del análisis sistemático de tales librerías se pueden expresar por medios recombinantes como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, en células hospedadoras de mamífero) y, además, se pueden someter a maduración por afinidad adicional mediante rondas adicionales de análisis sistemático de fusiones ARNm-péptidos en las que se han introducido mutaciones en la secuencia o secuencias seleccionadas originalmente, o mediante otros métodos para maduración por afinidad *in vitro* de anticuerpos recombinantes, como se ha descrito anteriormente.

En otro enfoque, los anticuerpos de la presente divulgación también se puede generar usando métodos de presentación en levaduras conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en levaduras, se usan métodos genéticos para unir dominios de anticuerpos a la pared celular de la levadura y presentarlos en la superficie de la levadura. En particular, tal levadura se puede utilizar para presentar dominios de unión a antígeno expresados a partir de un repertorio o librería de anticuerpos combinatoria (por ejemplo, humano o murino). Algunos ejemplos de métodos de presentación en levaduras que se pueden usar para preparar los anticuerpos de la presente divulgación incluyen los desvelados en Wittrup, *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos n.º 6.699.658.

B. Producción de anticuerpos frente a IL-13 recombinantes

Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden producir mediante cualquiera de una diversidad de técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, expresión a partir de células hospedadoras, en donde el vector o vectores de expresión que codifican las cadenas ligera y pesada se transfectan en una célula hospedadora mediante técnicas convencionales. Las diversas formas del término "transfección" pretenden incluir una amplia diversidad de técnicas usadas habitualmente para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedadora procarionota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano, y similares. Aunque es posible expresar los anticuerpos de la invención en células hospedadoras procarionotas o eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas es preferente, y lo más preferente en células hospedadoras de mamífero, debido a que es más probable que tales células eucariotas (y en particular células de mamífero) ensamblen y segreguen un anticuerpo plegado de forma apropiada e inmunológicamente activo que las células procarionotas. Algunas células hospedadoras de mamífero preferentes para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células CHO dhfr-, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, usadas con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo, como se describe en R.J. Kaufman y P.A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican los genes del anticuerpo se introducen en las células hospedadoras de mamífero, los anticuerpos se producen por cultivo de las células hospedadoras durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras o, más preferentemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que crecen las células hospedadoras. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteínas convencionales.

También se pueden usar células hospedadoras para producir fragmentos de anticuerpo funcionales, tales como fragmentos Fab o moléculas de scFv. Se ha de entender que las variaciones en el procedimiento anterior están dentro del ámbito de la presente divulgación. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula hospedadora con ADN que codifica fragmentos funcionales de la cadena ligera y/o la cadena pesada de un anticuerpo de la presente divulgación. También se puede usar tecnología de ADN recombinante para retirar cierta cantidad, o la totalidad, del ADN que codifica cualquiera de las dos o ambas de las cadenas ligera y pesada que son necesarias para unirse a los antígenos de interés. Las moléculas expresadas a partir de tales moléculas de ADN truncadas también están incluidas en los anticuerpos de la divulgación. Además, se pueden producir anticuerpos difuncionales en los que una cadena pesada y una cadena ligera son un anticuerpo de la divulgación y otra cadena pesada y otra cadena ligera son específicas para un antígeno distinto de los antígenos de interés mediante reticulación de un anticuerpo de la divulgación con un segundo anticuerpo mediante métodos de reticulación química convencionales.

En un sistema preferente para expresión recombinante de un anticuerpo, o una parte de unión a antígeno del mismo, de la divulgación, un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo se introduce en células CHO dhfr- mediante transfección mediada con fosfato de calcio. En el vector de expresión recombinante, los genes de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo están unidos cada uno operativamente a los elementos reguladores potenciador de CMV/promotor de AdMLP para conseguir altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también porta un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que se han transfectado con el vector usando selección/amplificación con metotrexato. Las células hospedadoras transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo y se recupera el anticuerpo intacto del medio de cultivo. Se usan técnicas convencionales de biología molecular para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células hospedadoras, seleccionar las transformantes, cultivar las células hospedadoras y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. Además, la divulgación proporciona un método de síntesis de un anticuerpo recombinante de la divulgación por cultivo de una célula hospedadora de la invención en un medio de cultivo adecuado hasta que se sintetiza un anticuerpo recombinante de la invención. El método puede comprender además aislar el anticuerpo recombinante del medio de cultivo.

1. Anticuerpos anti-IL-13

La Tabla 5 es una lista de secuencias de aminoácidos de regiones VH y VL de anticuerpos anti-hIL-13 preferentes de la divulgación.

Tabla 5 Lista de secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de la presente divulgación

SEQ ID NO:	Región de proteína		Secuencia
			123456789012345678901234567890
32	VH 25C8		QVQLQQPGAELVRPGASVQLSCKASGYFTF SSWIHWVNQRPGQGLEWIGMIHPDSETRL NQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSED SAVYYCAS TATDFDY WGQGTTTLTVSS
	CDR-H1 VH 25C8	Restos 31-35 de SEQ ID NO: 32	SSWIH
	CDR-H2 VH 25C8	Restos 50-66 de SEQ ID NO: 32	MIHPDSETRLNQKFKD
	CDR-H3 VH 25C8	Restos 99-105 de SEQ ID NO: 32	TATDFDY
33	VL 25C8		DVVLITQTPLSLSPVNIQDQASISCKSTKSL NSDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLVSNRF SGAPDRFSGSGSDFTLTKISRVEAEDLGV YYCFQHNYLPLTFGAGTNLELKR
	CDR-L1 VL 25C8	Restos 24-39 de SEQ ID NO: 33	KSTKSLNSDGFTYLD
	CDR-L2 VL 25C8	Restos 55-61 de SEQ ID NO: 33	LVSNRFS
	CDR-L3 VL 25C8	Restos 94-102 de SEQ ID NO: 33	FQHNYLPLT
34	VH 9C11		QVRLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYFTF SSWIHWVNQRPGQGLEWIGMIHPDSETRL NQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSED SAVYYCAS TATDFDY WGQGTTTLTVSS
	CDR-H1 VH 9C11	Restos 31-35 de SEQ ID NO: 34	SSWIH
	CDR-H2 VH 9C11	Restos 50-66 de SEQ ID NO: 34	MIHPDSETRLNQKFKD
	CDR-H3 VH 9C11	Restos 99-105	TATDFDY

		de SEQ ID NO: 34	
35	VL 9C11		DVVLQTPLSLPVLNIGDQASISCRSTQTLN NSDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLVSNRFS SGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDLGV YYCFQNNYLPLTFGAGTKLELKR
	CDR-L1 VL 9C11	Restos 24-39 de SEQ ID NO: 35	RSTQTLNNSDGFTYLD
	CDR-L2 VL 9C11	Restos 55-61 de SEQ ID NO: 35	LVSNRFS
	CDR-L3 VL 9C11	Restos 94-102 de SEQ ID NO: 35	FQNNYLPLT
36	VH 21D9		QVQLQQSGDDLKPGASVKLSCKASGYFTF SYWINWIKQRPGQGLEWIGHIAPGSGETYD NEMFKDKAKLTVDTSSNTAYIHLSSLSSD SAVYFCARGSF TF FFYAMDYWGQGTSTVSS
	CDR-H1 VH 21D9	Restos 31-35 de SEQ ID NO: 36	SYWIN
	CDR-H2 VH 21D9	Restos 50-66 de SEQ ID NO: 36	HIAPGSGETYDNEMFKD
	CDR-H3 VH 21D9	Restos 99-109 de SEQ ID NO: 36	GSF TF FFYAMDY
37	VL 21D9		DVLMQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQNI HSNGKTYLEWYLQRPQSPKLLIYKVSNRFS SGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDLGV YYCFQGSHPYTFGGGKLEIKR
	CDR-L1 VL 21D9	Restos 24-39 de SEQ ID NO: 37	RSSQNI VH HSNGKTYLE
	CDR- L2 VL 21D9	Restos 55-61 de SEQ ID NO: 37	KVSNRFS
	CDR-L3 VL 21D9	Restos 94-102 de SEQ ID NO: 37	FQGSHPYTF
38	VH 22D10		QVQLQQSGDDLKPGASVKLSCKASGYFTF SYWINWIKQRPGQGLEWIGHIAPGSGETYD NEMFKDKAKLTVDTSSSTAYIHLSSLSSD SAVYFCARGSF TF FFYAMDYWGQGTSTVSS
	CDR-H1 VH 22D10	Restos 31-35 de SEQ ID NO: 38	SYWIN
	CDR-H2 VH 22D10	Restos 50-66 de SEQ ID NO: 38	HIAPGSGETYDNEMFKD
	CDR-H3 VH 22D10	Restos 99-109 de SEQ ID NO: 38	GSF TF FFYAMDY
37	VL 22D10		DVLMQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQNI HSNGKTYLEWYLQRPQSPKLLIYKVSNRFS SGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDLGV YYCFQGSHPYTFGGGKLEIKR
	CDR-L1 VL 22D10	Restos 24-39 de SEQ ID NO: 37	RSSQNI VH HSNGKTYLE
	CDR-L2 VL 22D10	Restos 55-61 de SEQ ID NO: 37	KVSNRFS
	CDR-L3 VL 22D10	Restos 94-102 de SEQ ID NO: 37	FQGSHPYTF

39	VH 5F1		QVQLQQSGAELARPGTSVKLSCKASGYTFT TYGIS WVKQRTIGQGLEWIG EIYPGSYNTYY NEKFRG KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSED SAVYFC SRWRTSYFSDYGYFDY WGQGTTLT VSS
	CDR-H1 VH 5F1	Restos 31-35 de SEQ ID NO: 39	TYGIS
	CDR-H2 VH 5F1	Restos 50-66 de SEQ ID NO: 39	EIYPGSYNTYYNEKFRG
	CDR-H3 VH 5F1	Restos 99-109 de SEQ ID NO: 39	WRTSYFSDYGYFDY
40	VL 5F1		DVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLV HSHGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYTVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDLGV YFC SQSTHVPYTFGGG TKLEIKR
	CDR-L1 VL 5F1	Restos 24-39 de SEQ ID NO: 40	RSSQSLVHSHGNTYLH
	CDR-L2 VL 5F1	Restos 55-61 de SEQ ID NO: 40	TVSNRFS
	CDR-L3 VL 5F1	Restos 94-102 de SEQ ID NO: 40	SQSTHVPYT
41	VH 5G1		QVQLQQSGAELARPGTSVKLSCKASGYTFT TYGVS WVKQRTIGQGLEWIG EIYPGNYNTYY NEKFRG KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSED SAVYFC SRWRTSYFSDYGYFDY WGQGTTLT VSS
	CDR-H1 VH 5G1	Restos 31-35 de SEQ ID NO: 41	TYGVS
	CDR-H2 VH 5G1	Restos 50-66 de SEQ ID NO: 41	EIYPGNYNTYYNEKFRG
	CDR-H3 VH 5G1	Restos 99-109 de SEQ ID NO: 41	WRTSYFSDYGYFDY
40	VL 5G1		DVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLV HSHGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYTVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDLGV YFC SQSTHVPYTFGGG TKLEIKR
	CDR-L1 VL 5G1	Restos 24-39 de SEQ ID NO: 40	RSSQSLVHSHGNTYLH
	CDR-L2 VL 5G1	Restos 55-61 de SEQ ID NO: 40	TVSNRFS
	CDR-L3 VL 5G1	Restos 94-102 de SEQ ID NO: 40	SQSTHVPYT
42	VH 3H7		EVQLVESGGGLVLPKPGGSLKLSKAASGFTFS TYAMS WVRQTPEKRLIEWV AGISSGGSYTY PETMKG RFTISRDNARNTLYLQMSLRS EDTAIYYCT RG SWGQGSVTVSS
	CDR-H1 VH 3H7	Restos 31-35 de SEQ ID NO: 42	TYAMS
	CDR-H2 VH 3H7	Restos 50-66 de SEQ ID NO: 42	GISSGGSYTYYPETMKG
	CDR-H3 VH 3H7	Restos 99-100 de SEQ ID NO: 42	GS

43	VL 3H7		DVVLQTPLTLTSLVTIGQPASISCKSSQSLL DSDGETYLNWLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLD SGVPDRFTGSGSGTDFTLTKISRVEAEDLGV YYC WQGT HFPWTFGGGKLEIKR
	CDR-L1 VL 3H7	Restos 24-39 de SEQ ID NO: 43	KSSQSLLDSDGETYLN
	CDR-L2 VL 3H7	Restos 55-61 de SEQ ID NO: 43	LVSKLDS
	CDR-L3 VL 3H7	Restos 94-102 de SEQ ID NO: 43	WQGT HFPWT
44	VH 14B2		EVKLVESGGGLVVRPGGSLKLSCAASGFTFS SYAMN WVRQTPEKRLEWVA SISSGGNIYYS DSVKGR FTISRDNARNTLHLQMSSLRSEDT AMYYCARD DGYLYAMDY WGQGTSVTVSS
	CDR-H1 VH 14B2	Restos 31-35 de SEQ ID NO: 44	SYAMN
	CDR-H2 VH 14B2	Restos 50-65 de SEQ ID NO: 44	SISSGGNIYYS DSVKG
	CDR-H3 VH 14B2	Restos 98-106 de SEQ ID NO: 44	DGYLYAMDY
45	VL 14B2		DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQNLL YSSNQKNYLA WYQQKPGQSPKLLIYW ASTR ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLA VYYC QQYYSYPFT FGSGTKLEIKR
	CDR-L1 VL 14B2	Restos 24-40 de SEQ ID NO: 45	KSSQNLLYSSNQKNYLA
	CDR-L2 VL 14B2	Restos 56-62 de SEQ ID NO: 45	WASTRES
	CDR-L3 VL 14B2	Restos 95-103 de SEQ ID NO: 45	QQYYSYPFT
46	VH 13C5		QVTLKESGPGILQPSQTLTLTCSFSGFSL TSDMGVDWIRQPSGKGLEWLAHIWDDV KR YNPALKS RSLTISKDTSSSQVFLMLASVDIA DIATYYCAR TVSSGYIYYAMDY WGQGTSVT VSS
	CDR-H1 VH 13C5	Restos 312-378 de SEQ ID NO: 46	TSDMGVDW
	CDR-H2 VH 13C5	Restos 52-67 de SEQ ID NO: 46	HIWDDVKRYNPALKS
	CDR-H3 VH 13C5	Restos 100-112 de SEQ ID NO: 46	TVSSGYIYYAMDY
47	VL 13C5		DIQMTQTASSLSASLGDVRTISCRASQDIR NYLN WYQRKPDGTVKLLIF YTSKLHS GVPS RFGSGSGTDYSLTIRNLEQEDIATYFC QQ GNTLPLT FGGGKLEIKR
	CDR-L1 VL 13C5	Restos 24-34 de SEQ ID NO: 47	RASQDIRNYLN
	CDR-L2 VL 13C5	Restos 50-56 de SEQ ID NO: 47	YTSKLHS
	CDR-L3 VL 13C5	Restos 89-97 de SEQ ID NO: 47	QQGNTLPLT

48	VH 29G5		QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSL TSDMGVD WIRQPSGKDLEWLAHIWDDV KR YNPALKS RLTISKDTSSSQVFLMLASVDTA DIATYYCAR IVSSGYIYYALDY WGQGTSVT VSS
	CDR-H1 VH 29G5	Restos 31-37 de SEQ ID NO: 46	TSDMGVD
	CDR-H2 VH 29G5	Restos 52-67 de SEQ ID NO: 46	HIWDDVKRYNPALKS
	CDR-H3 VH 29G5	Restos 100-112 de SEQ ID NO: 46	IVSSGYIYYALDY
49	VL 29G5		DIQMTQTASSLSASLGDRVTIS CRA SQDIR NYLN WYQRKPDGTVKLLI Y Y T S R L H S GVPS RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC QQ GNTLPLTFGGG TKLEIKR
	CDR-L1 VL 29G5	Restos 24-34 de SEQ ID NO: 47	RASQDIRNYLN
	CDR-L2 VL 29G5	Restos 50-56 de SEQ ID NO: 47	YTSRLHS
	CDR-L3 VL 29G5	Restos 89-97 de SEQ ID NO: 47	QQGNTLPLT
50	VH 33C3		QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSL TSDLG VGWIRQPSGKLEWLAHIWDDV KR YNPALKS RLTISKDTSSSQVFLMIASVDTA DIATYYCAR IGSSGYIYYEMDY WGQGTSVT VSS
	CDR-H1 VH 33C3	Restos 31-37 de SEQ ID NO: 50	TSDLG VG
	CDR-H2 VH 33C3	Restos 52-67 de SEQ ID NO: 50	HIWDDVKRYNPALKS
	CDR-H3 VH 33C3	Restos 100-112 de SEQ ID NO: 50	IGSSGYIYYEMDY
51	VL 33C3		DIQMTQTSSLSASLGDRVTIT CRA SQDIR NYLN WYQQKPDGTVKLLI Y Y T S R L H S GVPS RFSGSGSGTDYSLTISNLDQEDIATYFC QQ GNTLPLTFGGG TRLEIKR
	CDR-L1 VL 33C3	Restos 24-34 de SEQ ID NO: 51	RASQDIRNYLN
	CDR-L2 VL 33C3	Restos 60-66 de SEQ ID NO: 51	YTSRLHS
	CDR-L3 VL 33C3	Restos 89-97 de SEQ ID NO: 51	QQGNTLPLT
52	VH 4A8		EVQLQQSGAEFVRPGALVKLSCKASGFNIK DYYMY WVKQRPEQGLEWIG RIDPENGNTIY DPKFQ GKASITGDTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCARY YAYYGPF DYWGQGTTLTVSS
	CDR-H1 VH 4A8	Restos 31-35 de SEQ ID NO: 52	DYYMY
	CDR-H2 VH 4A8	Restos 50-66 de SEQ ID NO: 52	RIDPENGNTIYDPKFQ
	CDR-H3 VH 4A8	Restos 99-107 de SEQ ID NO: 52	YAYYGPF DY

53	VL 4A8		QAVVTIQESALTTSPGETVTLICRSSIGTVT TNNYANWVQEKPDHLFTGLIGSTNNRAP GV PARFSGSLIGDKAALTIITGAQTEDEAIYFC ALWYSNHWV FGGGTKLTVLG
	CDR-L1 VL 4A8	Restos 23-36 de SEQ ID NO: 53	RSSIGTVTTNNYAN
	CDR-L2 VL 4A8	Restos 52-68 de SEQ ID NO: 53	STNNRAP
	CDR-L3 VL 4A8	Restos 91-99 de SEQ ID NO: 53	ALWYSNHWV
54	VH 1B6		QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLT GYGVNWVRQPPGKLEWLGMIWGDERIDYN SALKSRLSITKDNSKSQVFLKMNSLQDDT GRYFCARDGYFPYAMDYWGQTSVTVSS
	CDR-H1 VH 1B6	Restos 31-35 de SEQ ID NO: 54	GYGVN
	CDR-H2 VH 1B6	Restos 50-65 de SEQ ID NO: 54	MIWGDERIDYNSALKS
	CDR-H3 VH 1B6	Restos 98-107 de SEQ ID NO: 54	DGYFPYAMDY
55	VL 1B6		NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASETVD SYGKSYLHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLES GVPARFSGSGSRIDFTLIIDPVEADDAATY YCCQNNNEGPRTFGGGKLEIKR
	CDR-L1 VL 1B6	Restos 24-38 de SEQ ID NO: 55	RASETVD SYGKSYLH
	CDR-L2 VL 1B6	Restos 54-60 de SEQ ID NO: 55	LASNLES
	CDR-L3 VL 1B6	Restos 93-101 de SEQ ID NO: 55	QNNNEGPRT
56	VH 3E5		QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLT GSSINWVRQPPGKLEWLGMIWGGRIDYN SVLKSRLSISKDSSKSQVFLKMNSLQADDT ARYYCARDGYYPYAMVYWGQTSVTVSS
	CDR-H1 VH 3E5	Restos 31-35 de SEQ ID NO: 56	GSSIN
	CDR-H2 VH 3E5	Restos 50-65 de SEQ ID NO: 56	MIWGGRIDYNSVLKS
	CDR-H3 VH 3E5	Restos 98-107 de SEQ ID NO: 56	DGYYPYAMVY
57	VL 3E5		NIVLTQSPASLAVSLGQRATIFCRASESVD SYGNSFMHWYQQKSGQPPKLLIYLASNLES GVPARFSGSGSRIDFTLIIDPVEADDAATF YCCQNNENPRTFGGGKLEIKR
	CDR-L1 VL 3E5	Restos 24-38 de SEQ ID NO: 57	RASESVD SYGNSFMH
	CDR-L2 VL 3E5	Restos 54-60 de SEQ ID NO: 57	LASNLES
	CDR-L3 VL 3E5	Restos 93-101 de SEQ ID NO: 57	QNNENPRT

58	VH 6C8		QVQLKESGPGLVAPSQSLSICTVSEFSLT GSSVNWVRQPPGKGLEWLGMIWGDGRIDYN SALKSRLSISKDNSKSVFLKMNSLQTD DDTARYYCARDGYYPYAMNYWGQGT SVTVSS
	CDR-H1 VH 6C8	Restos 31-35 de SEQ ID NO: 58	GSSVN
	CDR-H2 VH 6C8	Restos 50-65 de SEQ ID NO: 58	MIWGDGRIDYNSALKS
	CDR-H3 VH 6C8	Restos 98-107 de SEQ ID NO: 58	DGYYPYAMNY
59	VL 6C8		NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASEVD SYGNSFMHWYQQKPGQPPELLIY LASNLESGVPARFSGSGSRADFL TIDPVEADDAATY YCQQNNENPRT FGGGKLEIKR
	CDR-L1 VL 6C8	Restos 24-38 de SEQ ID NO: 59	RASEVDSYGNSFMH
	CDR-L2 VL 6C8	Restos 54-60 de SEQ ID NO: 59	LASNLES
	CDR-L3 VL 6C8	Restos 93-101 de SEQ ID NO: 59	QQNNENPRT
60	VH 5D3		QVQLKESGPGLVAPSQSLSICTVSGFSLT GYNINWVRQPPGKGLEWLG LIWGDGNTAFNSALKSRLSISK DNSKSVFLKLNLSLQTD DDTARYYCARDGYYPYAIKYWGQGT SVTVSS
	CDR-H1 VH 5D3	Restos 31-35 de SEQ ID NO: 60	GYNIN
	CDR-H2 VH 5D3	Restos 50-65 de SEQ ID NO: 60	LIWGDGNTAFNSALKS
	CDR-H3 VH 5D3	Restos 98-107 de SEQ ID NO: 60	DGYYPYAIKY
61	VL 5D3		NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASETVD SYGNSFMHWYQQKPGQPPELLIY LASNLESGVPARFSGSGSRIDFL TIDPVEADDAATY YCQQNNE DPRTFGGGKLEIKR
	CDR-L1 VL 5D3	Restos 24-38 de SEQ ID NO: 61	RASETVDSYGNSFMH
	CDR-L2 VL 5D3	Restos 54-60 de SEQ ID NO: 61	LASNLES
	CDR-L3 VL 5D3	Restos 93-101 de SEQ ID NO: 61	QQNNEPRT
62	VH 8B6		QVQLKESGPGLVAPSQSLSICTVSGFSLT GHNINWVRQPPGKGLEWLGMIWGD GNTDFNSALKSRLSISKDNSKSV FLKLNLSLQTD DDTARYYCARDGYYPYAIKF WGQGT SVTVSS
	CDR-H1 VH 8B6	Restos 31-35 de SEQ ID NO: 62	GHNIN
	CDR-H2 VH 8B6	Restos 50-65 de SEQ ID NO: 62	MIWGDGNTDFNSALKS
	CDR-H3 VH 8B6	Restos 98-107 de SEQ ID NO: 62	DGYYPYAIKF

63	VL 8B6		HIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASETVD SYGSSFLHWYQQKPGQPPKLLIYLASKLES GVPARFSGSGSRITDFTLTIDPVEADDAATY YCQQNEGPRTFGGGSKLEIKR
	CDR-L1 VL 8B6	Restos 24-38 de SEQ ID NO: 63	RASETVDSYGSSFLH
	CDR-L2 VL 8B6	Restos 54-60 de SEQ ID NO: 63	LASKLES
	CDR-L3 VL 8B6	Restos 93-101 de SEQ ID NO: 63	QQNEGPRT

5 Las secuencias de CDR de anticuerpo anti-IL-13 aisladas anteriores establecen una nueva familia de proteínas de unión a IL-13, aisladas de acuerdo con la presente divulgación, y que comprenden polipéptidos que incluyen las secuencias de CDR enumeradas en la siguiente Tabla 6. Para generar y seleccionar CDR de la divulgación que posean unión a IL-13 y/o actividad neutralizante con respecto a hIL-13 y/o hIL-13 preferentes, se pueden usar métodos convencionales conocidos en la técnica para generar proteínas de unión de la presente divulgación y evaluar la unión a IL-13 y/o IL-13 y/o las características neutralizantes de las proteínas de unión, que incluyen, pero no se limitan a, los descritos específicamente en el presente documento.

Tabla 6: Ligandos de afinidad de CDR de IL-13 de consenso (se enumeran restos alternativos debajo de cada posición de aminoácido; - indica que el resto puede estar ausente).

Región de CDR	Identificador de secuencia	Secuencia de consenso
CDR-H1	SEQ ID NO: 64	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ T S D M G V D D S W I H G Y Y M S S L A Y H S N N G
CDR-H2	SEQ ID NO: 65	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ M I H P S D S E T R L N Q K F K D E - Y S G G Y N I Y Y P E M L R G H A W E S G Y K I D S D S V Q S R D G D E V D F D P T M S S N R A S A G W V τ
CDR-H3	SEQ ID NO: 66	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ W R T S Y F S D Y G Y F D Y T A F T F Y Y L A M V F G S Y Y G I Y P S N Y G S F P E L K D V I I
CDR-L1	SEQ ID NO: 67	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ K S S Q N L L Y S S N Q K N Y L A R A T K S T Q N I D G F T F A D I T S V H T N N S M E G D H E H E T Y S N

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

2. Anticuerpos quiméricos anti-IL-13

5 Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que las diferentes partes del anticuerpo proceden de diferentes especies animales, tales como anticuerpos que tienen una región variable procedente de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos se conocen en la técnica y se discuten con detalle en el Ejemplo 2.1. Véanse, por ejemplo, Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi *et al.*, BioTechniques 4:214 (1986); Gillies *et al.*, (1989) J. Immunol. Methods 125:191-202; documentos de Patente de Estados Unidos con números 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397. Además, se pueden usar técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison *et al.*, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855; Neuberger *et al.*, 1984, Nature 312:604-608; Takeda *et al.*, 1985, Nature 314:452-454) mediante corte y empalme de genes de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad antigénica apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada.

15 En un aspecto, los anticuerpos quiméricos de la divulgación se producen por reemplazo de la región constante de cadena pesada de los anticuerpos anti-IL-13 humana monoclonales murinos descritos en la sección 1 con una región constante de IgG1 humana. En una realización específica, el anticuerpo quimérico de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada (V_H) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 42; SEQ ID NO: 46 y una región variable de cadena ligera (V_L) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 43; o SEQ ID NO: 47.

3. Anticuerpos humanizados anti-IL-13

25 Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo procedentes de anticuerpos de especies no humanas que se unen al antígeno deseado que tienen una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las especies no humanas y regiones marco de una molécula de inmunoglobulina humana. Se desvelan secuencias de Ig humana conocidas, por ejemplo, www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/online-comp.html; www.public.iastate.edu/about.pedro/research_tools.html; www.mgen.uniheidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/mikeimages.html; www.antibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html; www.immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/about.hcenter/index.-html; www.biotech.ufl.edu/about/hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.mn.ehime-u.ac.jp/about.yasuhito-/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.ic-net.uk/axp/facs/davies/links.html; www.biotech.ufl.edu/about.fccl/protocol.html; www.isac-net.org/sites_geo.html; aximtl.imt.unimarburg.de/about.rek/AEP-Start.html; baserv.uci.kun.nl/aboutjraats/links.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; im-gt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/about.martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.unizh.ch/about.honegger/AHOseminar/SlideOI.html; www.cryst.bbk.ac.uk/about.ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm; www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/humanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html; www.bio-sci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/about.fmolina/Webpages/Pept/spottech.html; www.jerini.de/fr; roducts.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html. Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health

(1983), cada uno incorporado en su totalidad en el presente documento por referencia. Dichas secuencias importadas se pueden usar para reducir la inmunogenicidad o reducir, mejorar o modificar la unión, afinidad, velocidad de asociación, velocidad de disociación, avidéz, especificidad, semivida, o cualquier otra característica adecuada, como se conoce en la técnica.

5 Los restos de los marcos en las regiones marco humanas se pueden sustituir con el correspondiente resto del anticuerpo donador de CDR para alterar, preferentemente mejorar, la unión a antígeno. Estas sustituciones en el marco se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante modelado de las interacciones de los restos de CDR y marco para identificar los restos de marco importantes para la unión a antígeno y comparación de secuencias para identificar los restos de marco inusuales en posiciones particulares (véanse, por ejemplo, Queen *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.585.089; Riechmann *et al.*, Nature 332:323 (1988), que se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad). Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas se encuentran disponibles habitualmente y son familiares para los expertos en la técnica. Están disponibles programas de ordenador que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias candidatas seleccionadas de inmunoglobulinas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en la funcionalidad de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta forma, se pueden seleccionar restos de FR y combinarse con los de consenso e importar secuencias de un modo tal que se consiga la característica deseada del anticuerpo, tal como aumento de la afinidad por el antígeno o antígenos diana. En general, los restos de CDR están implicados directamente y de la forma más sustancial en influir en la unión al antígeno. Los anticuerpos se pueden humanizar usando una diversidad de técnicas conocidas en la técnica, tales como, pero no limitadas a, las descritas en Jones *et al.*, Nature 321:522 (1986); Verhoeven *et al.*, Science 239:1534 (1988), Sims *et al.*, J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol. 151:2623 (1993), Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka *et al.*, Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska *et al.*, PNAS 91:969-973 (1994); documentos de publicación PCT WO 91/09967, PCT/US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246, EP 592,106; EP 519,596, EP 239,400, documentos de Patente de Estados Unidos con números 5.565.332, 5.723.323, 5.976.862, 5.824.514, 5.817.483, 5.814.476, 5.763.192, 5.723.323, 5.766.886, 5.714.352, 6.204.023, 6.180.370, 5.693.762, 5.530.101, 5.585.089, 5.225.539; 4.816.567.

C. Producción de anticuerpos y líneas celulares productoras de anticuerpos

35 Preferentemente, los anticuerpos anti-IL-13 de la presente divulgación exhiben una alta capacidad para reducir o neutralizar la actividad de IL-13, por ejemplo, según se evalúa mediante uno cualquiera de diversos ensayos *in vitro* e *in vivo* conocidos en la técnica (por ejemplo, véase el Ejemplo 1.1.C). Por ejemplo, estos anticuerpos neutralizan la producción inducida por IL-13 de TARC mediante células A-549 con valores de CI_{50} en el intervalo de al menos aproximadamente 10^{-8} M, aproximadamente 10^{-9} M, o aproximadamente 10^{-10} M.

40 En aspectos preferentes de la presente divulgación, el anticuerpo aislado, o la parte de unión a antígeno del mismo, se une a IL-13 humana, en donde el anticuerpo, o la parte de unión a antígeno del mismo, se disocia de IL-13 humana con una constante de velocidad de disociación k_{off} de aproximadamente $0,1 \text{ s}^{-1}$ o menos, según se determina mediante resonancia plasmónica superficial, o que inhibe la actividad de IL-13 humana y/o IL-13 humana con una CI_{50} de aproximadamente 1×10^{-6} M o menos. Alternativamente, el anticuerpo, o una parte de unión a antígeno del mismo, se puede disociar de IL-13 humana con una constante de velocidad de disociación k_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ o menos, según se determina mediante resonancia plasmónica superficial, o puede inhibir la actividad de IL-13 humana y/o IL-13 humana con una CI_{50} de aproximadamente 1×10^{-7} M o menos. Alternativamente, el anticuerpo, o una parte de unión a antígeno del mismo, se puede disociar de IL-13 humana con una constante de velocidad de disociación k_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o menos, según se determina mediante resonancia plasmónica superficial, o puede inhibir la actividad de IL-13 humana y/o IL-13 humana con una CI_{50} de aproximadamente 1×10^{-8} M o menos. Alternativamente, el anticuerpo, o una parte de unión a antígeno del mismo, se puede disociar de IL-13 humana con una constante de velocidad de disociación k_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o menos, según se determina mediante resonancia plasmónica superficial, o puede inhibir la actividad de IL-13 y/o IL-13 humana con una CI_{50} de aproximadamente 1×10^{-9} M o menos. Alternativamente, el anticuerpo, o una parte de unión a antígeno del mismo, se puede disociar de IL-13 humana con una constante de velocidad de disociación k_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o menos, según se determina mediante resonancia plasmónica superficial, o puede inhibir la actividad de IL-13 y/o IL-13 humana con una CI_{50} de aproximadamente 1×10^{-10} M o menos. Alternativamente, el anticuerpo, o una parte de unión a antígeno del mismo, se puede disociar de IL-13 humana con una constante de velocidad de disociación k_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ o menos, según se determina mediante resonancia plasmónica superficial, o puede inhibir la actividad de IL-13 y/o IL-13 humana con una CI_{50} de aproximadamente 1×10^{-11} M o menos.

65 IL-13 Ejerce sus acciones por unión al receptor de IL-13 (IL-13R) en la superficie celular, el heterodímero comprendido por la cadena de IL-13R α 1 (IL-13R α 1) y la cadena de IL-4R (IL-4R). IL-13 se une en primer lugar a IL-13R α 1 con baja afinidad ($K_D = 2\text{-}10 \text{ nM}$) y a continuación recluta IL-4R para el complejo, generando un receptor de

alta afinidad ($K_D = 0,03-0,4$ nM) (Aman, M. J., *et al.* 1996 J. Biol. Chem. 271, 29265-29270; Miloux, *et al.* 1997 FEBS Lett. 401,163-166; Andrews, *et al.* 2002 J. Biol. Chem. 277, 46073-46078). La heterodimerización de IL-13R causa la activación de las quinasas de Jano, TYK2 y JAK1, asociadas constitutivamente a IL-13R α 1 e IL-4R, respectivamente, seguido de la activación del transductor de señal y activador de transcripción 6 (STAT6) (Izuhara, K., y Arima, K. 2004 Drug News Perspect. 17, 91-98). Existe otra unidad de unión a IL-13, la cadena de IL-13R α 2 (IL-13R α 2), que se une a IL-13 con alta afinidad (0,25-1,2 nM) (Caput, *et al.* 1996 J. Biol. Chem. 271, 16921-16926; Donaldson *et al.* 1998 J. Immunol. 161,2317-2324). No se conoce que esté implicada ninguna otra molécula receptora en el complejo IL-13/IL-13R2. Inicialmente se cree que IL-13R2 actúa como un receptor "señuelo" sin señalización. Sin embargo, se descubrió posteriormente que se puede unir a IL-13 y señala a través de la ruta AP-1, conduciendo a la producción de TNF-beta en ciertos tipos de células que incluyen macrófagos, que a su vez conduce a fibrosis pulmonar (Fichtner-Feigl, 2006 Nat Med 12:99-106). Por lo tanto, tanto la ruta de IL-13R α 1/IL-4R α como la de IL-13R α 2 contribuyen a la fisiopatología general del asma y otras afecciones inflamatorias pulmonares. Por lo tanto, un anticuerpo anti-IL-13 terapéutico que bloquee la unión de IL-13 a ambos receptores será más eficaz que los que bloquean solo un receptor.

Los presentes inventores han aislado anticuerpos monoclonales que bloquean la unión de IL-13 tanto a IL-13R α 1 como a IL-13R α 2. Tanto un ensayo de unión a receptores basado en ELISA como un ensayo de unión a IL-13 marcado con 125-I han demostrado que 13C5, tanto la versión murina como la versión humanizada (es decir, 13C5.5), fue capaz de bloquear eficazmente la unión de IL-13 a ambos receptores. Anticuerpos de los mismos linajes que 13C5, incluyendo 25C8 y 33C3, también fueron capaces de bloquear la unión de IL-13 a ambos receptores. La formación de un mapa de epitopos de 13C5 indicó que su sitio o sitios de unión incluyeron la región de Hélice D C-terminal de IL-13 humana (restos VRDTK IEVAQ FVKDL LLHLK KLFRE GR, correspondientes a los aminoácidos 104-130 de SEQ ID NO: 1). Se ha propuesto que la región de Hélice D C-terminal está implicada en interacciones con el receptor de IL-13 (Zuegg *et al.* 2001 Immunol Cell Biol. 79:332-9). La estructura cristalina de IL-13 humana forma un complejo con la parte Fab del anticuerpo 13C5.5, lo que indica que 13C5.5 se une a la región de Hélice D C-terminal así como a la región de Hélice A N-terminal de IL-13 humana. Preferentemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, se une a IL-13 humana de un modo tal que IL-13 con dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, unido al epitopo definido por las regiones topográficas Ser26-Thr27-Ala28-Leu29-Arg30-Glu31-Leu32-Ile33-Glu34-Glu35-Leu36-Val37-Asn38 y Lys123-Lys124-Leu125-Phe126-Arg127-Glu128-Gly129-Arg130 de SEQ ID NO: 1 se inhibe de unirse al receptor de IL-13. Preferentemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, se une a IL-13 humana de un modo tal que IL-13 con dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, unido al epitopo definido por las regiones topográficas Arg30-Glu31-Leu32-Ile33-Glu34-Glu35-Leu36-Val37-Asn38 y Lys123-Lys124-Leu125-Phe126-Arg127 de SEQ ID NO: 1 se inhibe de unirse al receptor IL-13 α 2.

En ciertos aspectos de la presente divulgación, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada, tal como una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD. Preferentemente, la región constante de cadena pesada es una región constante de cadena pesada de IgG1 o una región constante de cadena pesada de IgG4. Además, el anticuerpo puede comprender una región constante de cadena ligera, ya sea una región constante de cadena ligera kappa o una región constante de cadena ligera lambda. Preferentemente, el anticuerpo comprende una región constante de cadena ligera kappa. Alternativamente, la parte de anticuerpo puede ser, por ejemplo, un fragmento Fab o un fragmento Fv de cadena individual.

Los reemplazos de restos de aminoácido en la parte Fc para alterar la función efectora del anticuerpo se conocen en la técnica (Winter, *et al.*, documentos de Patente de Estados Unidos con números 5.648.260; 5.624.821). La parte Fc de un anticuerpo media varias funciones efectoras importantes, por ejemplo, inducción de citoquinas, ADCC, fagocitosis, citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y semivida/tasa de aclaramiento de anticuerpo y complejos antígeno-anticuerpo. En algunos casos, estas funciones efectoras son deseables para un anticuerpo terapéutico pero en otros casos podrían ser innecesarias o incluso perjudiciales, dependiendo de los objetivos terapéuticos. Ciertos isotipos de IgG humanos, en particular IgG1 e IgG3, median ADCC y CDC mediante la unión a Fc γ Rs y complemento C1q, respectivamente. Los receptores de Fc neonatales (FcRn) son los componentes críticos que determinan la semivida circulante de anticuerpos. En aún otra realización, al menos un resto de aminoácido se reemplaza en la región constante del anticuerpo, por ejemplo la región Fc del anticuerpo, de un modo tal que se alteran las funciones efectoras del anticuerpo.

Un aspecto de la divulgación proporciona una proteína de unión marcada en donde un anticuerpo o una parte de unión de la divulgación se derivatiza o une a otra molécula funcional (por ejemplo, otro péptido o proteína). Por ejemplo, una proteína de unión marcada de la invención se puede derivatizar por unión funcional de un anticuerpo o parte de anticuerpo de la invención (por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más entidades moleculares distintas, tal como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo diespecifico o un dianticuerpo), un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, y/o una proteína péptido que puede mediar la asociación del anticuerpo o parte del anticuerpo con otra molécula (tal como una región central de estreptoavidina o una etiqueta de polihistidina).

Agentes detectables útiles con los que un anticuerpo o parte de anticuerpo de la divulgación se puede derivatizar incluyen compuestos fluorescentes. Algunos agentes detectables fluorescentes a modo de ejemplo incluyen

- fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina y similares. Un anticuerpo también se puede derivatizar con enzimas detectables, tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa y similares. Cuando se derivatiza un anticuerpo con una enzima detectable, se detecta por adición de reactivos adicionales que la enzima usa para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando está presente el agente detectable peroxidasa de rábano picante, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es detectable. Un anticuerpo también se puede derivatizar con biotina, y detectar mediante medición indirecta de la unión a avidina o estreptoavidina.
- Otro aspecto de la divulgación proporciona una proteína de unión cristalizada. Preferentemente, la invención se refiere a cristales de anticuerpos anti-IL-13 completos y fragmentos de los mismos como se desvelan en el presente documento, y formulaciones y composiciones que comprenden tales cristales. En un aspecto de la divulgación, la proteína de unión cristalizada tiene una mayor semivida *in vivo* que la contrapartida soluble de la proteína de unión. En otro aspecto de la divulgación, la proteína de unión retiene la actividad biológica después de la cristalización.
- La proteína de unión cristalizada de la divulgación se puede producir de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y como se desvela en el documento de patente WO 02072636, que se incorpora en el presente documento por referencia.
- Otro aspecto de la divulgación proporciona una proteína de unión glicosilada en donde el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo comprende uno o más restos de carbohidrato. La producción de proteína incipiente *in vivo* puede experimentar procesamiento adicional, conocido como modificación postraduccional. En particular, se pueden añadir restos de azúcar (glicosilo) de forma enzimática, un proceso conocido como glicosilación. Las proteínas resultantes que portan cadenas laterales de oligosacárido unidas covalentemente se conocen como proteínas glicosiladas o glicoproteínas. Los anticuerpos son glicoproteínas con uno o más restos de carbohidrato en el dominio Fc, así como en el dominio variable. Los restos de carbohidrato en el dominio Fc tienen un efecto importante en la función efectora del dominio Fc, con un efecto mínimo en la unión a antígeno o la semivida del anticuerpo (R. Jefferis, *Biotechnol. Prog.* 21 (2005), pág. 11-16). Por el contrario, la glicosilación del dominio variable puede tener efecto en la actividad de unión a antígeno del anticuerpo. La glicosilación en el dominio variable puede tener un efecto negativo en la afinidad de unión del anticuerpo, probablemente debido a impedimento estérico (Co, M.S., *et al.*, *Mol. Immunol.* (1993) 30:1361- 1367), o puede dar como resultado un aumento de afinidad por el antígeno (Wallick, S. C., *et al.*, *Exp. Med.* (1988) 168:1099-1109; Wright, A., *et al.*, *EMBO J.* (1991) 10:2717 2723).
- Un aspecto de la presente divulgación se refiere a generar mutantes de sitios de glicosilación en los que se realizan mutaciones en el sitio de O-glicosilación o glicosilación revinculada de la proteína de unión. El experto en la materia puede generar tales mutantes usando tecnologías convencionales bien conocidas. Los mutantes de sitios de glicosilación que retienen la actividad biológica, pero han aumentado o disminuido la actividad de unión, son otro objeto de la presente invención.
- En aún otro aspecto de la presente divulgación, se modifica la glicosilación del anticuerpo o la parte de unión a antígeno de la divulgación. Por ejemplo, se puede preparar un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo que carece de glicosilación). La glicosilación se puede alterar para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tales modificaciones de carbohidrato se pueden conseguir, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación en la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden realizar una o más sustituciones de aminoácidos que den como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de la región variable para eliminar de ese modo la glicosilación en ese sitio. Tal aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tal enfoque se describe con mayor detalle en el documento de Publicación PCT WO2003016466A2, y los documentos de Patente de Estados Unidos con números 5.714.350 y 6.350.861.
- Además, o alternativamente, se puede preparar un anticuerpo modificado de la divulgación que tenga un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tenga cantidades reducidas de restos de fucosilo o un anticuerpo que tenga un aumento de estructuras bisectrices de GlcNAc. Se ha demostrado que tales patrones alterados de glicosilación aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones de carbohidrato se pueden conseguir, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula hospedadora con una maquinaria alterada de glicosilación. Las células con una maquinaria alterada de glicosilación se han descrito en la técnica y se pueden usar como células hospedadoras en las que expresar anticuerpos recombinantes de la divulgación para producir de ese modo un anticuerpo con una glicosilación alterada. Véanse, por ejemplo, Shields, R. L. *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740; Umana *et al.* (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-1, así como el documento de Patente Europea n.º EP 1.176.195; documentos de Publicación PCT WO 03/035835; WO 99/5434280.
- La glicosilación de proteínas depende de la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés, así como de la célula hospedadora en la que se expresa la proteína. Diferentes organismos pueden producir diferentes enzimas de glicosilación (por ejemplo, glicosiltransferasas y glicosidas), y tener diferentes sustratos disponibles (azúcares nucleótidos). Debido a tales factores, el patrón de glicosilación de las proteínas, y la composición de los restos de glicosilo, puede diferir dependiendo del sistema hospedador en el que se expresa la proteína particular. Los restos de glicosilo útiles en la invención pueden incluir, pero no se limitan a, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, n-

acetilglucosamina y ácido siálico. Preferentemente, la proteína de unión glicosilada comprende restos de glicosilo de un modo tal que el patrón de glicosilación es humano.

Los expertos en la materia conocen que una glicosilación de proteínas diferente puede dar como resultado diferentes características de proteínas. Por ejemplo, la eficacia de una proteína terapéutica producida en un hospedador microorganismo, tal como levadura, y glicosilada utilizando la ruta endógena de levadura se puede reducir en comparación con la de la misma proteína expresada en una célula de mamífero, tal como una línea celular CHO. Tales glicoproteínas también pueden ser inmunogénicas en sujetos humanos y mostrar una reducción de semivida *in vivo* después de la administración. Receptores específicos en sujetos humanos y otros animales pueden reconocer restos de glicosilo específicos y promover el rápido aclaramiento de la proteína del torrente sanguíneo. Otros efectos adversos pueden incluir cambios en el plegado de la proteína, solubilidad, susceptibilidad a proteasas, tráfico, transporte, compartimentación, secreción, reconocimiento por otras proteínas o factores, antigenicidad, o alergenicidad. Por lo tanto, un profesional sanitario puede preferir una proteína terapéutica con una composición y patrón de glicosilación específicos, por ejemplo composición y patrón de glicosilación idénticos, o al menos similar, a los producidos en células humanas o en las células específicas de especie del animal objeto pretendido.

La expresión de proteínas glicosiladas diferentes de las de una célula hospedadora se puede conseguir modificando genéticamente la célula hospedadora para expresar enzimas de glicosilación heterólogas. Usando técnicas conocidas en la técnica, un profesional sanitario puede generar anticuerpos o partes de unión a antígeno del mismo que exhiban glicosilación de proteína humana. Por ejemplo, se han modificado genéticamente cepas de levadura para expresar enzimas de glicosilación de origen no natural tales como proteínas glicosiladas (glicoproteínas) producidas en estas cepas de levadura que exhiben una glicosilación de proteínas idéntica a las células animales, en especial células humanas (documentos de solicitud de patente de Estados Unidos con números 20040018590 y 20020137134 y documento de publicación PCT WO2005100584 A2).

Además de las proteínas de unión, la presente invención también se refiere a un anticuerpo anti-idiotípico (anti-Id) específico para tales proteínas de unión de la invención. Un anticuerpo anti-Id es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos asociados generalmente a la región de unión a antígeno de otro anticuerpo. El anti-Id se puede preparar por inmunización de un animal con la proteína de unión o una región de la misma que contiene CDR. El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo de inmunización y producirá el anticuerpo anti-Id. El anticuerpo anti-Id también se puede usar como "inmunógeno" para inducir una respuesta inmunitaria en otro animal, produciendo el denominado anticuerpo anti-anti-Id.

Además, el experto en la materia entenderá que se puede expresar una proteína de interés usando una librería de células hospedadoras sometidas a ingeniería genética para expresar diversas enzimas de glicosilación, de un modo tal que las células hospedadoras miembros de la librería produzcan la proteína de interés con patrones variables de glicosilación. A continuación, un profesional sanitario puede seleccionar y aislar la proteína de interés con nuevos patrones de glicosilación particulares. Preferentemente, la proteína que tiene un patrón de glicosilación nuevo seleccionado particularmente exhibe una mejora o alteración de propiedades biológicas.

D. Usos de anticuerpos anti-IL-13

Dada su capacidad para unirse a IL-13 humana, los anticuerpos anti-IL-13 humana, o las partes de los mismos, de la divulgación se pueden usar para detectar IL-13 humana (por ejemplo, en una muestra biológica, tal como suero o plasma), usando un inmunoensayo convencional, tal como un ensayo de inmunoadsorción asociado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica tisular. La invención proporciona un método para detectar IL-13 humana en una muestra biológica que comprende poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo, o parte de anticuerpo, de la invención y detectar anticuerpo (o parte de anticuerpo) unido a IL-13 humana o bien anticuerpo (o parte de anticuerpo) sin unir, para detectar de ese modo IL-13 humana en la muestra biológica. El anticuerpo está marcado directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o sin unir. Algunas sustancias detectables adecuadas incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos. Algunos ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; algunos ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptoavidina/biotina y avidina/biotina; algunos ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y algunos ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , o ^{153}Sm .

Alternativamente al marcaje del anticuerpo, se puede someter a ensayo IL-13 humana en fluidos biológicos mediante un inmunoensayo competitivo que utiliza estándares de rhIL-13 marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo anti-IL-13 humana sin marcar. En este ensayo, la muestra biológica, los estándares de rhIL-13 marcados y el anticuerpo anti-IL-13 humana se combinan y se determina la cantidad de estándar de rhIL-13 marcado unido al anticuerpo sin marcar. La cantidad de IL-13 humana en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de estándar de rhIL-13 marcado unido al anticuerpo anti-IL-13. Del mismo modo, también se puede someter a ensayo IL-13 humana en fluidos biológicos mediante un inmunoensayo competitivo que utilice estándares de rhIL-

13 marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo anti-IL-13 humana sin marcar.

Preferentemente, los anticuerpos y las partes de anticuerpo de la divulgación son capaces de neutralizar la actividad de IL-13 humana tanto *in vitro* como *in vivo*. Por lo tanto, tales anticuerpos y partes de anticuerpo de la divulgación se pueden usar para inhibir la actividad de hIL-13, por ejemplo, en un cultivo celular que contiene hIL-13, en sujetos humanos o en otros sujetos mamíferos que tengan IL-13 con el que el anticuerpo de la divulgación muestre reactividad cruzada. En una realización, la invención proporciona un método para inhibir la actividad de hIL-13 que comprende poner en contacto hIL-13 con un anticuerpo o parte de anticuerpo de la divulgación de un modo tal que se inhiba la actividad de hIL-13. Por ejemplo, en un cultivo celular que contiene, o se sospecha que contiene, hIL-13, se puede añadir un anticuerpo o parte de anticuerpo de la invención al medio de cultivo para inhibir la actividad de hIL-13 en el cultivo.

En el presente documento también se desvela un anticuerpo o parte de unión de la divulgación para su uso en un método para reducir la actividad de hIL-13 en un sujeto, de forma ventajosa un sujeto que padece una enfermedad o trastorno en el que es perjudicial la actividad de IL-13. En el presente documento se desvelan anticuerpos o partes de anticuerpo de la divulgación para su uso en métodos para reducir la actividad de IL-13 en un sujeto que padece tal enfermedad o trastorno, método que comprende administrar al sujeto el anticuerpo o parte de anticuerpo de la divulgación de un modo tal que se reduzca la actividad de IL-13 en un sujeto. Preferentemente, la IL-13 es IL-13 humana, y el sujeto es un sujeto humano. Alternativamente, el sujeto puede ser un mamífero que expresa una IL-13 a la que es capaz de unirse un anticuerpo de la divulgación. Además, el sujeto puede ser un mamífero en el que se ha introducido IL-13 (por ejemplo, por administración de IL-13 o por expresión de un transgén de IL-13). Se proporciona un anticuerpo de la divulgación para su uso en administración a un sujeto humano con fines terapéuticos. Además, se proporciona un anticuerpo de la divulgación para su uso en administración a un mamífero no humano que expresa una IL-13 con la que es capaz de unirse el anticuerpo con fines veterinarios o como modelo animal de enfermedad humana. Con respecto al último, tales modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la divulgación (por ejemplo, ensayo de dosificaciones y cursos temporales de administración).

Como se usa en el presente documento, la expresión "un trastorno en el que es perjudicial la actividad de IL-13" pretende incluir enfermedades u otros trastornos en los que se ha mostrado que la presencia de IL-13 en un sujeto que padece el trastorno es o se sospecha que es responsable de la fisiopatología del trastorno o un factor que contribuye a un empeoramiento del trastorno. Por lo tanto, un trastorno en el que es perjudicial la actividad de IL-13 es un trastorno en el que se espera que la reducción de la actividad de IL-13 alivie los síntomas y/o el progreso del trastorno. Tales trastornos se pueden evidenciar, por ejemplo, por aumento en la concentración de IL-13 en un fluido biológico de un sujeto que padece el trastorno (por ejemplo, un aumento en la concentración de IL-13 en suero, plasma, líquido sinovial, etc., del sujeto), que se puede detectar, por ejemplo, usando un anticuerpo anti-IL-13 como se ha descrito anteriormente. Algunos ejemplos no limitantes de trastornos que se pueden tratar con los anticuerpos de la divulgación incluyen los trastornos discutidos en la sección posterior que se refiere a composiciones farmacéuticas de los anticuerpos de la divulgación.

IL-13 se ha visto implicada en un papel principal en la causa de respuestas patológicas asociadas al asma. Sin embargo, también se han visto implicados otros mediadores de rutas inmunológicas diferenciales en la patogénesis del asma, y bloquear estos mediadores, además de IL-13, puede ofrecer un beneficio terapéutico adicional. De ese modo, las proteínas de unión de la divulgación se pueden incorporar a proteínas DVD-Ig donde DVD es capaz de unir pares de dianas que incluyen, pero no se limitan a, IL-13 y una citoquina proinflamatoria, tal como factor α de necrosis tumoral (TNF- α). TNF- α puede amplificar la respuesta inflamatoria en asma y puede estar asociado a la gravedad de la enfermedad (McDonnell, *et al.*, Progress in Respiratory Research (2001), 31 (New Drugs for Asthma, Allergy and COPD), 247-250.). Esto sugiere que bloquear tanto IL-13 como TNF- α puede tener efectos beneficiosos, en particular en enfermedad grave de las vías respiratorias. En una realización preferente, DVD-Ig de la invención se une a las dianas IL-13 y TNF- α y se usa para tratar asma.

En otro aspecto, las proteínas de unión de la divulgación se pueden usar para generar moléculas de DVD-Ig que se unan a IL-13 e IL-1beta, IL-13 e IL-9; IL-13 e IL-4; IL-13 e IL-5; IL-13 e IL-25; IL-13 y TARC; IL-13 y MDC; IL-13 y MIF; IL-13 y TGF- β ; IL-13 y agonista de LHR; IL-13 y CL25; IL-13 y SPRR2a; IL-13 y SPRR2b; e IL-13 y ADAM8. La presente divulgación también proporciona DVD-Ig capaces de unirse a IL-13 y una o más dianas implicadas en asma seleccionadas entre el grupo que consiste en CSF1 (MCSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (GCSF), FGF2, IFNA1, IFNB1, IFNG, histamina y receptores de histamina, IL1A, IL1B, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12A, IL12B, IL14, IL15, IL16, IL17, IL18, IL19, IL20, IL21, IL22, IL23, IL24, IL25, IL26, IL27, IL28, IL30, IL31, IL32, IL33, KITLG, PDGFB, IL2RA, IL4R, IL5RA, IL8RA, IL8RB, IL12RB1, IL12RB2, IL13RA1, IL13RA2, IL18R1, TSLP, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL22, CCL24, CX3CL1, CXCL1, CXCL2, CXCL3, XCL1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CX3CR1, GPR2, XCR1, FOS, GATA3, JAK1, JAK3, STAT6, TBX21, TGFB1, TNFSF6, YY1, CYSLTR1, FCER1A, FCER2, LTB4R, TB4R2, LTBR, y Quitinasa.

D. Composición farmacéutica

La divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de la divulgación y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos de la divulgación son para su uso en, pero no limitado a, diagnosticar, detectar, o monitorizar un trastorno, en prevenir, tratar, controlar, o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo, y/o en investigación. En un aspecto específico de la divulgación, una composición comprende uno o más anticuerpos de la divulgación. En otro aspecto de la divulgación, la composición farmacéutica comprende uno o más anticuerpos de la divulgación y uno o más agentes profilácticos o terapéuticos distintos de los anticuerpos de la invención para su uso en el tratamiento de un trastorno en el que es perjudicial la actividad de IL-13. Preferentemente, los agentes profilácticos o terapéuticos conocidos por ser útiles para o que se han usado o se usan en la actualidad en la prevención, tratamiento, control, o mejora de un trastorno o uno o más síntomas del mismo. De acuerdo con estas realizaciones, la composición puede comprender además un vehículo, diluyente o excipiente.

Los anticuerpos y partes de anticuerpo de la divulgación se pueden incorporar a composiciones farmacéuticas adecuadas para administración a un sujeto. Por lo general, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo o parte de anticuerpo de la divulgación y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, y similares, que son fisiológicamente compatibles. Algunos ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol, y similares, así como las combinaciones de los mismos. En numerosos casos, será preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio a la composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender además cantidades minoritarias de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulgentes, conservantes o tampones, que mejoran la vida en anaquel o la eficacia del anticuerpo o parte de anticuerpo.

Se conocen diversos sistemas de suministro y se pueden usar para administrar uno o más anticuerpos de la divulgación o la combinación de uno o más anticuerpos de la divulgación y un agente profiláctico o agente terapéutico útil para prevenir, controlar, tratar, o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, endocitosis mediada por receptores (véase, por ejemplo, Wu y Wu, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro vector, etc. Algunos métodos de administración de un agente profiláctico o terapéutico de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), administración epidural, administración intratumoral, y administración a mucosas (por ejemplo, rutas intranasal y oral). Además, se puede emplear administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente formador de aerosol. Véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de Estados Unidos con números 6.019.968, 5.985.320, 5.985.309, 5.934.272, 5.874.064, 5.855.913, 5.290.540, y 4.880.078; y los documentos de Publicación PCT con números WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, y WO 99/66903. En un aspecto de la divulgación, un anticuerpo de la invención, terapia de combinación, o una composición de la invención se administra usando la tecnología de suministro pulmonar de fármacos Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.). Los agentes profilácticos o terapéuticos de la divulgación se pueden administrar por vía intramuscular, intravenosa, intratumoral, oral, intranasal, pulmonar, o subcutánea. Los agentes profilácticos o terapéuticos se pueden administrar mediante cualquier ruta conveniente, por ejemplo por infusión o inyección de bolo, por absorción a través de los revestimientos epitelial o mucocutáneo (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

Puede ser deseable administrar los agentes profilácticos o terapéuticos de la divulgación localmente en el área con necesidad de tratamiento; esto se puede conseguir, por ejemplo, y no a modo de limitación, por infusión local, inyección, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso o no poroso, incluyendo membranas y matrices, tales como membranas sialásticas, polímeros, matrices fibrosas (por ejemplo, Tissuel®), o matrices de colágeno. Se proporciona una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos de la divulgación antagonistas para uso en administración local al área afectada a un sujeto para prevenir, tratar, controlar, y/o mejorar un trastorno o un síntoma del mismo. Se proporciona una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos de la invención para su uso en administración local al área afectada en combinación con una cantidad eficaz de una o más terapias (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos) distintas de un anticuerpo de la divulgación de un sujeto para prevenir, tratar, controlar, y/o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo.

En otro aspecto de la divulgación, el agente profiláctico o terapéutico de la divulgación se proporciona para su uso en el suministro de un sistema de liberación controlada o liberación sostenida. En un aspecto, se puede usar una bomba para conseguir liberación controlada sostenida (véanse Langer, citado anteriormente; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:20; Buchwald *et al.*, 1980, *Surgery* 88:507; Saudek *et al.*, 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574). En otra realización, se pueden usar materiales poliméricos para conseguir la liberación controlada o sostenida de las terapias de la invención (véanse, por ejemplo, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, 1983, *J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61;

véanse también Levy *et al.*, 1985, Science 228:190; During *et al.*, 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard *et al.*, 1989, J. Neurosurg. 71:105; documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.679.377; documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.916.597; documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.912.015; documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.989.463; documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.128.326; documento de Publicación PCT n.º WO 99/15154; y documento de Publicación PCT n.º WO 99/20253. Algunos ejemplos de polímeros usados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(etileno-co-acetato de vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinilpirrolidona), alcohol polivinílico, poliacrilamida, polietilenglicol, polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicólido) (PLGA), y polioctoésteres. En una realización preferente, el polímero usado en una formulación de liberación sostenida es inerte, exento de impurezas lixiviables, estable en almacenamiento, estéril, y biodegradable. En otra realización más, se puede situar un sistema de liberación controlada o sostenida en la proximidad de la diana profiláctica o terapéutica, requiriendo de ese modo solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, citado anteriormente, vol. 2, pág. 115-138 (1984)).

Se discuten sistemas de liberación controlada en la revisión de Langer (1990, Science 249:1527-1533). Se puede usar cualquier técnica conocida por el experto en la materia para producir formulaciones de liberación sostenida que comprendan uno o más agentes terapéuticos de la divulgación. Véanse, el documento de Patente de Estados Unidos n.º 4.526.938, el documento de Publicación PCT WO 91/05548, Publicación PCT WO 96/20698, Ning *et al.*, 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song *et al.*, 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397, Cleek *et al.*, 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854, y Lamet *et al.*, 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760.

En un aspecto específico, donde la composición de la divulgación es un ácido nucleico que codifica un agente profiláctico o terapéutico, el ácido nucleico se puede proporcionar para su uso en administración *in vivo* para estimular la expresión de su agente profiláctico o terapéutico codificado, por construcción del mismo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administración del mismo de un modo tal que llegue a ser intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retroviral (véase el documento de Patente de Estados Unidos n.º 4.980.286), o mediante inyección directa, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolistic, Dupont), o revestimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, o mediante administración del mismo en conexión con un péptido de tipo *homeobox* que se conoce que entra en el núcleo (véase, por ejemplo, Joliot *et al.*, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868). Alternativamente, se puede proporcionar un ácido nucleico para introducción intracelular e incorporar al ADN de la célula hospedadora para expresión mediante recombinación homóloga.

Una composición farmacéutica de la divulgación se formula para que sea compatible con su ruta pretendida de administración. Algunos ejemplos de rutas de administración incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, intranasal (por ejemplo, inhalación), transdérmica (por ejemplo, tópica), transmucosa, y rectal. En una realización específica, la composición se formula de acuerdo con procedimientos de rutina en forma de una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, oral, intranasal, o tópica a sujetos humanos. Por lo general, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente de solubilización y un anestésico local tal como lignocamne para aliviar el dolor en el sitio de la inyección.

Si las composiciones de la divulgación se proporcionan para su uso en administración tópica, las composiciones se pueden formular en forma de una pomada, crema, parche transdérmico, loción, gel, champú, pulverización, aerosol, solución, emulsión, u otra forma bien conocida por el experto en la materia. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19ª ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). Para formas de dosificación tópicas no pulverizables, se emplean por lo general formas de viscosas a semisólidas o sólidas que comprenden un vehículo y uno o más excipientes compatibles con aplicación tópica y que tienen una viscosidad dinámica preferentemente mayor que el agua. Algunas formulaciones adecuadas incluyen, sin limitación, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, pomadas, polvos, linimentos, pomada para heridas, y similares, que, si se desea, están esterilizadas o mezcladas con agentes auxiliares (por ejemplo, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, tampones, o sales) para influir en diversas propiedades tales como, por ejemplo, presión osmótica. Otras formas de dosificación tópicas adecuadas incluyen preparaciones en aerosol pulverizables en donde el ingrediente activo, preferentemente en combinación con un vehículo inerte sólido o líquido, se envasa en una mezcla con un compuesto volátil presurizado (por ejemplo, un propelente gaseoso, tal como freón) o en una botella apretable. También se pueden añadir hidratantes o humectantes a las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación, si se desea. Algunos ejemplos de tales ingredientes adicionales se conocen en la técnica.

Si el método desvelado en el presente documento comprende administración intranasal de una composición, la composición se puede formular en forma de aerosol, pulverización, nebulización o en forma de gotas. En particular,

los agentes profilácticos o terapéuticos para su uso de acuerdo con la presente divulgación se pueden suministrar de forma conveniente en forma de una presentación para pulverización en aerosol de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado (por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad dosificada. Las cápsulas y cartuchos (compuestos, por ejemplo, de gelatina) para su uso en un inhalador o insuflador se pueden formular para que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Si el método desvelado en el presente documento comprende administración oral, las composiciones se pueden formular por vía oral en forma de comprimidos, cápsulas, sellos, cápsulas de gel, soluciones, suspensiones, y similares. Se pueden preparar comprimidos o cápsulas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona, o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina, o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o almidón glicolato de sodio); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos se pueden revestir mediante métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, pero sin limitarse a, soluciones, jarabes o suspensiones, o se pueden presentar en forma de un producto seco para reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales preparaciones líquidas se pueden preparar mediante medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa, o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulgentes (por ejemplo, lecitina o goma arábica); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres aceitosos, alcohol etílico, o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales de tampones, aromatizantes, colorantes, y agentes edulcorantes, según sea apropiado. Las preparaciones para administración oral también se pueden formular de forma adecuada para liberación lenta, liberación controlada, o liberación sostenida de un agente o agentes profilácticos o terapéuticos.

El método desvelado en el presente documento puede comprender administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, de una composición formulada con un agente formador de aerosoles. Véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de Estados Unidos con números 6.019.968, 5.985.320, 5.985.309, 5.934.272, 5.874.064, 5.855.913, 5.290.540, y 4.880.078; y los documentos de Publicación PCT con números WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, y WO 99/66903. En una realización específica, un anticuerpo de la divulgación, terapia de combinación, y/o composición de la divulgación es para su uso en administración usando la tecnología de suministro de fármacos pulmonar Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.).

El método desvelado en el presente documento puede comprender la administración de una composición formulada para administración parenteral mediante inyección (por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua). Las formulaciones para inyección se pueden presentar en una forma de dosificación unitaria (por ejemplo, en ampollas o en recipientes de múltiples dosis) con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para reconstitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua estéril exenta de pirógenos) antes de su uso.

Los métodos desvelados en el presente documento pueden comprender además la administración de composiciones formuladas en forma de preparaciones de liberación retardada. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden administrar mediante implante (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. De ese modo, por ejemplo, las composiciones se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, en forma de una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles (por ejemplo, en forma de una sal poco soluble).

Los métodos desvelados en el presente documento incluyen administración de composiciones formuladas como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con aniones tales como los procedentes de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con cationes tales como los procedentes de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

Generalmente, los ingredientes de las composiciones se suministran por separado o mezclados conjuntamente en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en forma de un polvo liofilizado en seco o concentrado sin agua en un recipiente cerrado herméticamente tal como una ampolla o sobrecito que indica la cantidad del agente activo. Cuando el modo de administración es infusión, la composición se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua o solución salina estéril de calidad farmacéutica. Cuando el modo de administración es mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de un modo tal que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

En particular, la divulgación también proporciona que uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o las composiciones farmacéuticas de la divulgación, se envasen en un recipiente sellado herméticamente tal como una ampolla o sobrecito que indique la cantidad del agente. En un aspecto, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o las composiciones farmacéuticas de la divulgación, se suministran en forma de un polvo liofilizado esterilizado seco o concentrado sin agua en un recipiente sellado herméticamente y se pueden reconstituir (por ejemplo, con agua o solución salina) a la concentración apropiada para administración a un sujeto. Preferentemente, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se suministran en forma de un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente sellado herméticamente con una dosificación unitaria de al menos 5 mg, mas preferentemente al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg, al menos 75 mg, o al menos 100 mg. Los agentes profilácticos o terapéuticos o las composiciones farmacéuticas liofilizados de la invención se deberían almacenar entre 2 °C y 8 °C en su recipiente original y los agentes profilácticos o terapéuticos, o las composiciones farmacéuticas de la invención se deberían administrar en 1 semana, preferentemente en 5 días, en 72 horas, en 48 horas, en 24 horas, en 12 horas, en 6 horas, en 5 horas, en 3 horas, o en 1 hora después de reconstituirse. En un aspecto alternativo, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se suministran en forma líquida en un recipiente sellado herméticamente que indique la cantidad y la concentración del agente. Preferentemente, la forma líquida de la composición administrada se suministra en un recipiente sellado herméticamente a al menos 0,25 mg/ml, más preferentemente al menos 0,5 mg/ml, al menos 1 mg/ml, al menos 2,5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/kg, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml o al menos 100 mg/ml. La forma líquida se debería almacenar entre 2 °C y 8 °C en su recipiente original.

Los anticuerpos y las partes de anticuerpo de la divulgación se pueden incorporar a una composición farmacéutica adecuada para administración parenteral. Preferentemente, el anticuerpo o las partes de anticuerpo se prepararán en forma de una solución inyectable que contiene 0,1-250 mg/ml de anticuerpo. La solución inyectable puede estar compuesta por una forma de dosificación líquida o liofilizada en un vial *flint* o ámbar, ampolla, o jeringa precargada. El tampón puede ser L-histidina (1-50 mM), de forma óptima 5-10 mM, de pH 5,0 a 7,0 (de forma óptima pH 6,0). Otros tampones adecuados incluyen, pero no se limitan a, succinato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio o fosfato de potasio. Se puede usar cloruro de sodio para modificar la toxicidad de la solución a una concentración de 0-300 mM (de forma óptima 150 mM para una forma de dosificación líquida). Se pueden incluir crioprotectores en una forma de dosificación liofilizada, principalmente un 0-10 % de sacarosa (de forma óptima un 0,5-1,0 %). Otros crioprotectores adecuados incluyen trehalosa y lactosa. Se pueden incluir agentes de carga a una forma de dosificación liofilizada, principalmente un 1-10 % de manitol (de forma óptima un 2-4 %). Se pueden usar estabilizantes en formas de dosificación tanto líquidas como liofilizadas, principalmente L-Metionina 1-50 mM (de forma óptima 5-10 mM). Otros agentes de carga adecuados incluyen glicina, arginina, y se pueden incluir al 0-0,05 % en polisorbato-80 (de forma óptima 0,005-0,01 %). Algunos tensioactivos adicionales incluyen, pero no se limitan a, los tensioactivos polisorbato 20 y BRIJ. La composición farmacéutica que comprende los anticuerpos y las partes de anticuerpo de la invención preparada en forma de una solución inyectable para administración parenteral puede comprender además un agente útil como adyuvante, tal como los usados para aumentar la absorción, o dispersión de una proteína terapéutica (por ejemplo, anticuerpos). Un adyuvante particularmente útil es hialuronidasa, tal como Hylenex® (hialuronidasa humana recombinante). La adición de hialuronidasa a la solución inyectable mejora la biodisponibilidad humana después de administración parenteral, en particular administración subcutánea. También permite mayores volúmenes de sitio de inyección (por ejemplo, más de 1 ml) con menos dolor e incomodidad, e incidencia mínima de reacciones en el sitio de la inyección (véanse los documentos de Patente WO2004078140, US2006104968).

Las composiciones de la presente divulgación pueden estar en una diversidad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables o infundibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferente depende del modo pretendido de administración y la aplicación terapéutica. Las composiciones preferentes habituales están en forma de soluciones inyectables o infundibles, tales como composiciones similares a las que se usan para la inmunización pasiva de sujetos humanos con otros anticuerpos. El modo preferente de administración es parenteral (por ejemplo, intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular). En una realización preferente, el anticuerpo se administra mediante infusión o inyección intravenosa. En otra realización preferente, el anticuerpo se administra mediante inyección intramuscular o subcutánea.

Por lo general, las composiciones terapéuticas deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular en forma de una solución, microemulsión, dispersión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para alta concentración de fármaco. Se pueden preparar soluciones inyectables estériles incorporando un compuesto activo (es decir, anticuerpo o parte de anticuerpo) en la cantidad requerida a un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización mediante filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles liofilizados para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferentes de preparación son secado al vacío y secado por pulverización, lo que proporciona un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una

solución del mismo filtrada previamente para esterilidad. La fluidez apropiada de una solución se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Se puede provocar la absorción prolongada de composiciones inyectables incluyendo, en la composición, un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Los anticuerpos y las partes de anticuerpo de la presente divulgación se pueden proporcionar para su uso en administración mediante una diversidad de métodos conocidos en la técnica, aunque para numerosas aplicaciones terapéuticas, la ruta/modo preferente de administración es inyección subcutánea, inyección intravenosa o infusión. Como será evidente para un experto en la materia, la ruta y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. En ciertos aspectos, el compuesto activo se puede preparar con un vehículo que protegerá el compuesto frente a la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles tales como etileno acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, y poliortoésteres, y ácido poliláctico. Numerosos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o se conocen en términos generales por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

En ciertos aspectos, un anticuerpo o parte de anticuerpo de la divulgación se puede proporcionar para su uso en administración oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se desea) también se puede encerrar en una cápsula de gelatina de cápsula dura o blanda, comprimir en comprimidos, o incorporar directamente a la dieta del sujeto. Para administración terapéutica oral, los compuestos se pueden incorporar a excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, pastillas para disolver en la boca, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Para administrar un compuesto de la divulgación mediante administración distinta a la parenteral, puede ser necesario revestir el compuesto, o administrar conjuntamente el compuesto, con un material para prevenir su inactivación.

También se pueden incorporar compuestos activos suplementarios a las composiciones. En ciertos casos, un anticuerpo o parte de anticuerpo de la divulgación se formula conjuntamente y/o administra conjuntamente con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son útiles para tratar trastornos en los que es perjudicial la actividad de IL-13. Por ejemplo, un anticuerpo anti-hIL-13 o parte de anticuerpo de la invención se puede formular conjuntamente y/o administrar conjuntamente con uno o más anticuerpos adicionales que se unen a otras dianas (por ejemplo, anticuerpos que se unen a otras citoquinas o que se unen a moléculas de la superficie celular). Además, uno o más anticuerpos de la divulgación se pueden proporcionar para su uso en combinación con dos o más de los agentes terapéuticos anteriores. Tales terapias de combinación pueden utilizar de forma ventajosa dosificaciones inferiores de los agentes terapéuticos administrados, evitando de ese modo posibles toxicidades o complicaciones asociadas a las diversas monoterapias.

En ciertos aspectos, un anticuerpo frente a IL-13 o fragmento del mismo está unido a un vehículo prolongador de la semivida conocido en la técnica. Tales vehículos incluyen, pero no se limitan a, el dominio Fc, polietilenglicol, y dextrano. Tales vehículos se describen, por ejemplo, en el documento de Solicitud de Estados Unidos con n.º de serie 09/428.082 y el documento de Solicitud PCT publicada n.º WO 99/25044.

En un aspecto específico, se proporcionan secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican un anticuerpo de la divulgación u otro agente profiláctico o terapéutico de la divulgación para su uso en administración para tratar, prevenir, controlar, o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo por medio de terapia génica. Terapia génica se refiere a terapia llevada a cabo mediante la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. En este aspecto de la divulgación, los ácidos nucleicos producen su anticuerpo o agente profiláctico o terapéutico codificado de la divulgación que media un efecto profiláctico o terapéutico.

El anticuerpo o parte de anticuerpo de la presente divulgación se proporciona para su uso en cualquiera de los métodos para terapia génica disponibles en la técnica. Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, véanse Goldspiel *et al.*, 1993, *Clinical Pharmacy* 12:488-505; Wu y Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan, *Science* 260:926- 932 (1993); y Morgan y Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217; Mayo, 1993, *TIBTECH* 11(5):155-215. Se describen métodos conocidos habitualmente en la técnica de tecnología de ADN recombinante que se pueden usar en Ausubel *et al.* (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); y Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990). Se desvela una descripción detallada de diversos métodos de terapia génica en el documento de Patente US20050042664 A1.

En otro aspecto, la presente solicitud presenta un anticuerpo o parte de anticuerpo de la presente divulgación para su uso en un método de tratamiento (por ejemplo, cura, supresión, mejora, retraso o prevención del inicio de, o prevención de recurrencia o recaída de) o prevención de un trastorno asociado a IL-13, en un sujeto. El método incluye: administrar al sujeto un agente de unión a IL-13 (en particular, un antagonista), por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-13 o fragmento del mismo como se describe en el presente documento, en una cantidad suficiente para tratar o prevenir el trastorno asociado a IL-13. El antagonista de IL-13, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-13 o el fragmento

del mismo, se puede proporcionar para su uso en administración al sujeto, solo o en combinación con otras modalidades terapéuticas como se describen en el presente documento.

En un aspecto, el sujeto es un mamífero, por ejemplo, un sujeto humano que padece uno o más trastornos asociados a IL-13, que incluyen, por ejemplo, trastornos respiratorios (por ejemplo, asma (por ejemplo, asma alérgica y no alérgica), enfermedad pulmonar destructiva crónica (COPD), y otras afecciones que implican inflamación de las vías respiratorias, eosinofilia, fibrosis y exceso de producción de mucosidad; trastornos atópicos (por ejemplo, dermatitis atópica y rinitis alérgica); afecciones inflamatorias y/o autoinmunes de la piel, órganos gastrointestinales (por ejemplo, enfermedades intestinales inflamatorias (IBD), tales como colitis ulcerosa y/o enfermedad de Crohn), y hepáticas (por ejemplo, cirrosis, fibrosis); esclerodermia; tumores o cánceres, por ejemplo, linfoma de Hodgkin como se describe en el presente documento. Por lo tanto, la divulgación incluye el uso de un agente de unión a IL-13 (tal como un anticuerpo anti-IL-13 o fragmento del mismo descrito en el presente documento) para su uso en un tratamiento descrito en el presente documento y el uso de un agente de unión a IL-13 (tal como un anticuerpo anti-IL-13 o fragmento del mismo descrito en el presente documento) para preparar un medicamento para un tratamiento descrito en el presente documento.

Algunos ejemplos de trastornos asociados a IL-13 incluyen, pero no se limitan a, un trastorno elegido entre uno o más de: trastornos respiratorios, por ejemplo, asma (por ejemplo, asma alérgica y no alérgica (por ejemplo, asma debida a infección con, por ejemplo, virus respiratorio sincitial (RSV), en los niños más pequeños)), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), y otras afecciones que implican inflamación de las vías respiratorias, eosinofilia, fibrosis y exceso de producción de mucosidad, por ejemplo, fibrosis quística y fibrosis pulmonar; trastornos atópicos, por ejemplo, resultantes de un aumento de sensibilidad a IL-13 (por ejemplo, dermatitis atópica, urticaria, eccema, rinitis alérgica, y enterogastritis alérgica); afecciones inflamatorias y/o autoinmunes de la piel (por ejemplo, dermatitis atópica), órganos gastrointestinales (por ejemplo, enfermedades inflamatorias intestinales (IBD), tales como colitis ulcerosa y/o enfermedad de Crohn), hepáticas (por ejemplo, cirrosis, carcinoma hepatocelular), y esclerodermia; tumores o cánceres (por ejemplo, tumores de tejidos blandos o sólidos), tales como leucemia, glioblastoma, y linfoma, por ejemplo linfoma de Hodgkin; infecciones virales (por ejemplo, de HTLV-1); fibrosis de otros órganos, por ejemplo, fibrosis del hígado (por ejemplo, fibrosis causada por un virus de hepatitis B y/o C); y supresión de la expresión de las respuestas inmunitarias protectoras de tipo 1 (por ejemplo, durante la vacunación), como se describe en el presente documento.

En otros aspectos, la presente solicitud proporciona un anticuerpo o parte de anticuerpo de la presente divulgación para uso en un método de tratamiento (por ejemplo, reducción, mejora) o prevención de uno o más síntomas asociados a un trastorno respiratorio, por ejemplo, asma (por ejemplo, asma alérgica y no alérgica); alergias; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD); una afección que implica inflamación de las vías respiratorias, eosinofilia, fibrosis y exceso de producción de mucosidad, por ejemplo, fibrosis quística y fibrosis pulmonar. Por ejemplo, los síntomas de asma incluyen, pero no se limitan a, sibilancias, dificultad para respirar, broncoconstricción, hiperreactividad de las vías respiratorias, disminución de la capacidad pulmonar, fibrosis, inflamación de las vías respiratorias, y producción de mucosidad. El método comprende administrar al sujeto un antagonista de IL-13, por ejemplo, un anticuerpo frente a IL-13 o un fragmento del mismo, en una cantidad suficiente para tratar (por ejemplo, reducir, mejorar) o prevenir uno o más síntomas. El anticuerpo frente a IL-13 se puede proporcionar para su uso en administración terapéutica o profiláctica, o ambas. El antagonista de IL-13, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-13, o el fragmento del mismo, se puede proporcionar para su uso en administración al sujeto, solo o en combinación con otras modalidades terapéuticas como se describen en el presente documento. Preferentemente, el sujeto es un mamífero, por ejemplo, un sujeto humano que padece un trastorno asociado a IL-13 como se describe en el presente documento.

En otro aspecto, la presente solicitud proporciona un método para detectar la presencia de IL-13 en una muestra *in vitro* (por ejemplo, una muestra biológica, tal como suero, plasma, tejido, biopsia). El método objeto se puede usar para diagnosticar un trastorno, por ejemplo, un trastorno asociado a células inmunitarias. El método incluye: (i) poner en contacto la muestra o una muestra de control con el anticuerpo anti-IL-13 o el fragmento del mismo como se describe en el presente documento; y (ii) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-IL-13 o el fragmento del mismo, y la muestra o la muestra de control, en donde un cambio estadísticamente significativo en la formación del complejo en la muestra con respecto a la muestra de control es indicativo de la presencia de IL-13 en la muestra.

En otro aspecto más, la presente solicitud proporciona un anticuerpo o parte de anticuerpo de la presente divulgación para su uso en un método para detectar la presencia de IL-13 *in vivo* (por ejemplo, formación de imágenes *in vivo* en un sujeto). El método objeto se puede usar para diagnosticar un trastorno, por ejemplo, un trastorno asociado a IL-13. El método incluye: (i) administrar el anticuerpo anti-IL-13 o el fragmento del mismo como se describe en el presente documento a un sujeto o un sujeto de control en condiciones que permitan la unión del anticuerpo o el fragmento a IL-13; y (ii) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo o el fragmento e IL-13, en donde un cambio estadísticamente significativo en la formación del complejo en el sujeto con respecto al sujeto de control es indicativo de la presencia de IL-13.

Los anticuerpos de la divulgación, o las partes de unión a antígeno de los mismos se proporcionan para su uso solos

o en combinación para tratar tales enfermedades. Se ha de entender que los anticuerpos de la divulgación o las partes de unión a antígeno de los mismos se proporcionan para su uso solos o en combinación con un agente adicional, por ejemplo, un agente terapéutico, seleccionándose dicho agente adicional por el experto en la materia para su fin pretendido. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico que se reconoce en la técnica que es útil para tratar la enfermedad o afección que se está tratando con el anticuerpo de la presente divulgación. El agente adicional también puede ser un agente que imparte un atributo beneficioso a la composición terapéutica, por ejemplo, un agente que afecta a la viscosidad de la composición.

Además, se debería entender que las combinaciones que se han de incluir en la presente divulgación son las combinaciones útiles para su fin pretendido. Los agentes expuestos posteriormente son ilustrativos para los fines y no se pretende que sean limitantes. Las combinaciones, que son parte de la presente divulgación, pueden ser los anticuerpos de la presente divulgación y al menos un agente adicional seleccionado entre las listas posteriores. La combinación también puede incluir más de un agente adicional, por ejemplo, dos o tres agentes adicionales si la combinación es tal que la composición formada puede llevar a cabo su función pretendida.

Se pueden proporcionar uno o más antagonistas de IL-13, por ejemplo, anticuerpos anti-IL-13 o fragmentos de los mismos para su uso en terapia de combinación, se pueden formular conjuntamente, y/o administrar conjuntamente, con uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, uno o más inhibidores de citoquinas y factores de crecimiento, inmunosupresores, agentes antiinflamatorios (por ejemplo, agentes antiinflamatorios sistémicos), agentes antifibróticos, inhibidores metabólicos, inhibidores enzimáticos, y/o agentes citotóxicos o citostáticos, como se describe con mayor detalle en el presente documento.

Algunos ejemplos de agentes terapéuticos adicionales preferentes que se pueden proporcionar para su uso en la administración conjunta y/o formulación conjunta con uno o más antagonistas de IL-13, por ejemplo, anticuerpos anti-IL-13 o fragmentos de los mismos, incluyen, pero no se limitan a, uno o más de: esteroides inhalados; beta-agonistas, por ejemplo, beta-agonistas de acción corta o acción prolongada; antagonistas de leucotrienos o receptores de leucotrienos; fármacos de combinación tales como ADVAIR; inhibidores de IgE, por ejemplo, anticuerpos anti-IgE (por ejemplo, XOLAIR); inhibidores de fosfodiesterasa (por ejemplo, inhibidores de PDE4); xantinas; fármacos anticolinérgicos; agentes estabilizantes de mastocitos tales como cromolín; inhibidores de IL-4; inhibidores de IL-5; inhibidores de eotaxina/CCR3; antagonistas de histamina o sus receptores, incluyendo H1, H2, H3, y H4, y antagonistas de prostaglandina D o sus receptores (DP1 y CRTH2). Tales combinaciones se pueden usar para tratar asma y otros trastornos respiratorios. Algunos ejemplos adicionales de agentes terapéuticos que se pueden administrar conjuntamente y/o formular conjuntamente con uno o más anticuerpos anti-IL-13 o fragmentos de los mismos incluyen uno o más de: antagonistas de TNF (por ejemplo, un fragmento soluble de un receptor de TNF, por ejemplo, los receptores de TNF humano p55 o p75 o derivados de los mismos, por ejemplo, TNFR-IgG de 75 kD (proteína de fusión de receptor de TNF-IgG de 75 kD, ENBREL)); antagonistas enzimáticos de TNF, por ejemplo, inhibidores de la enzima convertidora de TNF (TACE); antagonistas de receptores muscarínicos; antagonistas de TGF-beta; interferón gamma; perfenidona; agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, metotrexato, leflunomida o un sirolimus (rapamicina) o un análogo del mismo, por ejemplo, CCI-779; inhibidores de COX2 y cPLA2; AINE; inmunomoduladores; inhibidores de p38, inhibidores de TPL-2, MK-2 y NFkB, entre otros.

Otras combinaciones preferentes son fármacos antiinflamatorios supresores de citoquinas (CSAID); anticuerpos frente a, o antagonistas de, otras citoquinas o factores de crecimiento sus manos, por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, IL-21, IL-31, interferones, EMAP-II, GM-CSF, FGF, EGF, PDGF, y edotelina-1, así como los receptores de estas citoquinas y factores de crecimiento. Los anticuerpos de la divulgación, o las partes de unión a antígeno de los mismos, se pueden proporcionar para su uso en combinación con anticuerpos frente a moléculas de la superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, CTLA o sus ligandos, incluyendo CD154 (gp39 o CD40L).

Las combinaciones preferentes de agentes terapéuticos pueden interferir en diferentes puntos en la cascada inflamatoria; algunos ejemplos preferentes incluyen antagonistas de TNF tales como anticuerpos frente a TNF quiméricos, humanizados o humanos, D2E7, (documento de Publicación PCT n.º WO 97/29131), CA2 (Remicade™), CDP 571, y los receptores solubles de TNF p55 o p75, derivados de los mismos (p75TNFR1gG (Enbrel™) o p55TNFR1gG (Lenercept)), y también inhibidores de la enzima convertidora de TNF (TACE); del mismo modo, los inhibidores de IL-1 (inhibidores de la enzima convertidora de interleuquina 1, IL-1RA etc.) pueden ser eficaces por la misma razón. Otras combinaciones preferentes incluyen interleuquina 4. Otra combinación preferente más incluye otros actores clave de la respuesta asmática que pueden actuar en paralelo a, dependiendo de o en concierto con la función de IL-13; son especialmente preferentes los antagonistas de IL-9 incluyendo anticuerpos frente a IL-9. Se ha mostrado que IL-13 e IL-9 tienen funciones superpuestas pero distintas y una combinación de antagonistas frente a ambos puede ser la más eficaz. Otra combinación preferente más son anticuerpos anti-IL-5. Otras combinaciones preferentes más incluyen antagonistas de quimioquinas que incluyen MCP-1, MCP-4, eotaxinas, RANTES, MDC, CCL-12 y CCL-17 (TARC) y receptores de quimioquinas que incluyen CCR2, CCR3, CCR4, y CXCR4. Combinaciones adicionales pueden incluir antagonistas de mediadores del asma que incluyen quitinasa ácida de mamífero, CRHT2, quimasa, S1P1, S1P2, Tyk2, ROCKII, Stat6, p38, NFkB, fosfodiesterasa 4 (PDE-4), tripsasa de mastocito, NO, adenosina, IKK2, GATA3, ICAM-1, VCAM-1, e ICOS.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de un anticuerpo o parte de anticuerpo de la divulgación. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado. La cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o parte de anticuerpo se puede terminar por el experto en la materia y puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o parte de anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo, o parte del anticuerpo, se ve compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Por lo general, dado que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes de o en la etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, se puede administrar un bolo individual, se pueden administrar varias dosis divididas en el tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Una forma unitaria de dosificación, como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos que se tratan; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Las especificaciones para las formas unitarias de dosificación de la invención están dictadas por y dependen directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico o profiláctico particular que se consigue, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de formación de compuestos de tal compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Un intervalo no limitante a modo de ejemplo para una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un anticuerpo o parte de anticuerpo de la invención es 0,1-20 mg/kg, más preferentemente 1-10 mg/kg. Se ha de observar que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y la gravedad de la afección que se alivia. Además, se ha de entender que para cualquier sujeto particular, se deberían ajustar los regímenes de dosificación específicos a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación expuestos en el presente documento son únicamente a modo de ejemplo y no pretenden limitar el ámbito o la práctica de la composición reivindicada.

Ejemplos

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

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

En el Ejemplo 1, se usaron los siguientes ensayos para identificar y caracterizar los anticuerpos anti-IL-13 humana, a menos que se indique de otro modo.

Ejemplo 1.1.A: ELISA

Se llevaron a cabo ensayos de inmunoabsorción asociada a enzimas para analizar sistemáticamente anticuerpos que se unen a IL-13 humana como sigue a continuación.

Se revistieron placas de ELISA (Corning Costar, Acton, MA) con 50 µl/pocillo de 5 µg/ml de IgG anti-ratón de cabra específica de Fc (Pierce n.º 31170, Rockford, IL.) en solución salina tamponada con fosfato (PS) durante una noche a 4 grados Celsius. Las placas se lavaron una vez con PBS que contenía Tween-20 al 0,05 %. Las placas se bloquearon por adición de 200 µl/pocillo de solución de bloqueo diluida al 2 % en PBS (BioRad n.º 170-6404, Hercules, CA.) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron una vez después del bloqueo con PBS que contenía Tween-20 al 0,05 %.

Se añadieron cincuenta microlitros por pocillo de sueros de ratón o sobrenadantes de hibridoma diluidos en PBS que contenía de albúmina de suero bovino al 0,1 % (BSA) (Sigma, St. Louis, MO.) a la placa de ELISA preparada como se ha descrito anteriormente y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron tres veces con PBS que contenía Tween-20 al 0,05 %. Se añadieron a cada pocillo cincuenta microlitros de variante de IL-13 humana (R110Q) purificada recombinante biotinada diluida a 100 ng/ml en PBS que contenía BSA al 0,1 % y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con PBS que contenía Tween-20 al 0,05 %. Se diluyó estreptoavidina HRP (Pierce n.º 21126, Rockland, IL.) 1:20000 en PBS que contenía BSA al 0,1 %; se añadieron 50 µl/pocillo y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con PBS que contenía Tween-20 al 0,05 %. Se añadieron a cada pocillo cincuenta microlitros de solución de TMB (Sigma n.º T0440, St. Louis, MO.) y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. La

reacción se detuvo por adición de ácido sulfúrico 1 N. Las placas se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm.

Ejemplo 1.1.B: Determinaciones de afinidad usando la tecnología BIACORE

5 El ensayo BIACORE (Biacore, Inc, Piscataway, NJ) determina la afinidad de los anticuerpos con mediciones cinéticas de las constantes de velocidad de asociación y disociación. La unión de anticuerpos a IL-13 humana purificada recombinante o variante de IL-13 humana (R110Q) purificada recombinante se determinaron mediante mediciones basadas en resonancia plasmónica superficial con un instrumento Biacore® 3000 (Biacore® AB, Uppsala, Suecia) usando un proceso HBS-EP (HEPES 10 mM [pH 7,4], NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, y tensioactivo P20 al 0,005 %) a 25 °C. Todos los compuestos químicos se obtuvieron en Biacore® AB (Uppsala, Suecia) o de otro modo a partir de una fuente diferente como se describe en el texto. Se inmovilizaron directamente aproximadamente 5000 RU de IgG anti-ratón de cabra, anticuerpo policlonal específico de fragmento (Fcy) (Pierce Biotechnologie Inc, Rockford, IL) diluido en acetato de sodio 10 mM (pH 4,5) a través de un chip biosensor de calidad de investigación CM5 usando un kit de acoplamiento de amina convencional de acuerdo con las instrucciones del fabricante y procedimientos a 25 µg/ml. Los restos sin reaccionar en la superficie del biosensor se bloquearon con etanolamina. Se usó una superficie de carboximetildextrano modificado en las celdas de flujo 2 y 4 como superficie de reacción. Se usó carboximetildextrano sin modificar sin IgG anti-ratón de cabra en las celdas de flujo 1 y 3 como superficie de referencia. Para el análisis cinético, se ajustaron ecuaciones de velocidad derivadas del modelo de unión de Langmuir 1:1 simultáneamente a las fases de asociación y disociación de las ocho inyecciones (usando análisis de ajuste globales) con el uso del software Biaevaluation 4.0.1. Se diluyeron los anticuerpos purificados en solución salina tamponada con HEPES para captura a través de superficies de reacción específicas de IgG anti-ratón de cabra. Los anticuerpos de ratón que se capturan como ligando (25 µg/ml) se inyectaron sobre matrices de reacción a un caudal de 5 µl/min. Las constantes de velocidad de asociación y disociación, k_{on} (en unidades de $M^{-1}s^{-1}$) y k_{off} (en unidades de s^{-1}) se determinaron a un caudal continuo de 25 µl/min. Las constantes de velocidad se obtuvieron realizando mediciones de unión cinética para diez concentraciones de antígeno diferentes que variaron de 10-200 nM. La constante de disociación de equilibrio (en unidades de M) de la reacción entre anticuerpos de ratón e IL-13 humana purificada recombinante o IL-13 humana purificada recombinante se calcularon a continuación a partir de las constantes de velocidad cinéticas mediante la siguiente fórmula: $K_D = k_{off}/k_{on}$. La unión se registra en función del tiempo y se calculan las constantes de velocidad cinéticas. En este ensayo, se pueden medir constantes de velocidad de asociación tan rápidas como $10^6 M^{-1}s^{-1}$ y constantes de disociación tan lentas como $10^{-6} s^{-1}$.

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

35 Para examinar la actividad funcional de los anticuerpos anti-IL-13 humana de la divulgación, los anticuerpos se usaron en los siguientes ensayos para medir la capacidad de un anticuerpo para inhibir la actividad de IL-13.

Ejemplo 1.1.C 1 Bioensayo de A-549

40 La capacidad de los anticuerpos anti-IL-13 humana para inhibir la producción de TARC (CCL-17) inducida por IL-13 humana mediante células A-549 se analizó como sigue a continuación. En el día uno, se sembraron células A-549 en una placa de 96 pocillos (2E5 células/pocillo) en medio de crecimiento RPMI (con FBS al 10 %). En el día dos, el medio se reemplazó con medio de crecimiento RPMI reciente que contenía 400 ng/ml de rhTNF (10 µl/pocillo). Mientras tanto, se preincubaron diversas concentraciones de suero de ratón inmunizado, sobrenadante de hibridoma murino o anticuerpos anti-IL-13 humana purificados durante una hora a 37 °C con 10 ng/ml de IL-13 o variante de IL-13 humana purificada recombinante en 100 µl de medio completo RPMI en una placa de microtitulación (fondo en U, 96 pocillos, Costar). El anticuerpo más la mezcla de IL-13 humana purificada recombinante se añadió a continuación (100 µl/pocillo) a las células A-549 tratadas con TNF, con un volumen final de 200 µl/pocillo (las concentraciones finales de IL-13 y TNF fueron de 5 ng/ml y 200 ng/ml, respectivamente) y se incubaron durante 18 horas a 37 °C. Después de la incubación, se retiraron 150 µl de sobrenadante exento de células de cada pocillo y se midió el nivel de TARC humana producida usando un ELISA de TARC (R&D Systems n.º de cat. DDN00).

Las células A-549 también responden a la IL-13 de otras especies, incluyendo mono cinomolgo, ratón, rata, y oveja, con valores de DE_{50} similares a los de la IL-13 humana. Por lo tanto, se empleó para el análisis de reactividad cruzada de mAb anti-hIL-13 frente a IL-13 de otras especies usando el mismo protocolo experimental.

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

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

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

Se inyectaron veinte microgramos de variante de IL-13 humana purificada recombinante (Peprotech) mezclada con adyuvante completo de Freund o adyuvante de inmunoensayo (Qiagen, Valencia, CA) por vía subcutánea en cinco ratones Balb/C de 6-8 semanas de edad, cinco ratones C57B/6, y cinco ratones AJ en el día 1. Los días 24, 38, y 49, se inyectaron por vía subcutánea veinte microgramos de variante de IL-13 humana purificada recombinante

mezclada con adyuvante incompleto de Freund o adyuvante de inmunoensayo a los mismos ratones. El día 84 o el día 112 o el día 144, se inyectaron por vía intravenosa a los ratones 1 ug de variante de IL-13 humana purificada recombinante.

5 **Ejemplo 1.2.B: Generación de hibridoma**

Los esplenocitos obtenidos de los ratones inmunizados descritos en el Ejemplo 1.2.A se fusionaron con células SP2/0-Ag-14 en una proporción de 5:1 de acuerdo con el método establecido descrito en Kohler, G. y Milstein 1975, Nature, 256:495 para generar hibridomas. Los productos de fusión se sembraron en placa en medio de selección que contenía azaserina e hipoxantina en placas de 96 pocillos a una densidad de $2,5 \times 10^6$ células de bazo por pocillo. De siete a diez días después de la fusión, se observaron colonias de hibridomas macroscópicas. El sobrenadante de cada pocillo que contenía colonias de hibridomas se sometió a ensayo por ELISA para determinar la presencia de anticuerpo frente a variante de IL-13 (como se describe en el Ejemplo 1.1.A). A continuación, se sometieron a ensayo los sobrenadantes que presentaron actividad específica frente a variante de IL-13 para la capacidad de neutralizar la variante de IL-13 y el tipo salvaje de IL-13 en el bioensayo de A-549 para TARC (como se describe en el Ejemplo 1.1.C).

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

20 Los hibridomas productores de anticuerpos que se unen a la variante de IL-13, generados de acuerdo con los Ejemplos 1.2.B y 1.2.C, y capaces de unirse a la variante de IL-13, específica y particularmente aquellos con valores de Cl_{50} en el bioensayo de A-549 de 5 nM o menos de 5 nM, se aumentaron de escala y se clonaron mediante dilución limitante.

25 Las células de hibridoma se expandieron en un medio que contenía un 10 % de suero bovino fetal con baja cantidad de IgG (Hyclone n.º SH30151, Logan, UT.). En promedio, se recogieron 250 ml de cada sobrenadante de hibridoma (procedente de una población clonal), se concentraron y se purificaron mediante cromatografía de afinidad a proteína A, como se describe en Harlow, E. y Lane, D. 1988 "Antibodies: A Laboratory Manual". La capacidad de los mAb purificados para inhibir la actividad de IL-13 se determinó usando el bioensayo de A-549 como se describe en el Ejemplo 1.1.C. La Tabla 7 muestra los valores de Cl_{50} de los bioensayos de A-549 para 17 anticuerpos monoclonales.

Tabla 7: Neutralización de IL-13 mediante mAb anti-IL-13 en bioensayo de A-549

Anticuerpo monoclonal murino	Isotipo	Cl_{50} media (nM) Tipo salvaje de IL-13 humana	Cl_{50} media (nM) Variante de IL-13 humana	Cl_{50} media (nM) IL-13 de cinomolgo
4A8	IgG1 λ	ND	2,70E-10	ND
6C8	IgG1k	7,20E-10	3,40E-10	1,61E-10
5F1	IgG1k	9,70E-11	9,00E-11	1,88E-09
1B6	IgG1k	8,40E-10	2,40E-10	5,21E-10
5G1	IgG1k	7,60E-11	4,80E-11	6,12E-10
29G5	IgG2ak	2,90E-10	2,00E-10	4,39E-09
33C3	IgG1k	1,50E-10	1,00E-10	8,47E-10
25C8	IgG1k	2,30E-10	2,60E-10	1,88E-10
13C5	IgG1k	1,90E-10	1,70E-10	5,00E-09
3E5	IgG2ak	1,30E-10	3,00E-10	1,61E-10
3H7	IgG2ak	NA	5,80E-10	7,97E-10
5D3	IgG1k	7,05E-10	2,90E-10	2,91E-10
8B6	IgG1k	ND	4,80E-10	3,95E-10
21D9	IgG2bk	6,82E-11	1,36E-10	3,40E-10
14B2	IgG1k	ND	4,36E-10	NA
9C11	IgG1k	1,06E-10	1,70E-10	6,40E-10
22D10	IgG1k	2,84E-10	5,40E-10	6,11E-09

Las afinidades de unión de los anticuerpos monoclonales frente a variante y tipo salvaje de IL-13 humana purificada

recombinante se determinaron usando medición de resonancia plasmónica superficial (Biacore®) como se describe en el Ejemplo 1.1.B. La Tabla 8 muestra la afinidad de los 18 anticuerpos monoclonales descritos anteriormente para IL-13 humana.

Tabla 8: Afinidad de mAb anti-IL-13 por IL-13 humana de tipo salvaje y variante

mAb	IL-13 de tipo salvaje humana			IL-13 variante humana		
	k_{on} (1/M•s)	k_{off} (1/s)	K_D (M)	k_{on} (1/M•s)	k_{off} (1/s)	K_D (M)
4A8			8,90E-11			1,57E-10
6C8	1,45E+06	7,02E-04	4,84E-10	9,78E+05	3,94E-04	4,03E-10
5F1	7,74E+05	2,24E-05	2,89E-11	5,02E+05	1,57E-05	3,14E-11
1B6	9,51 E+05	5,18E-04	5,45E-10	1,06E+05	2,22E-04	2,10E-10
5G1	6,26E+05	5,49E-06	8,77E-12	1,57E+05	2,05E-05	1,30E-10
29G5	8,59E+05	1,75E-04	2,04E-10	3,16E+05	1,04E-04	3,29E-10
33C3	2,33E+06	1,49E-04	6,39E-11	7,70E+05	9,59E-05	1,24E-10
25C8	3,45E+05	2,60E-05	7,54E-11	1,34E+05	8,45E-06	6,31 E-11
13C5	1,25E+06	9,31 E-05	7,45E-11	5,74E+05	4,35E-05	7,59E-11
3E5	1,44E+06	6,58E-04	4,57E-10	1,85E+06	4,68E-04	2,53E-10
3H7	NB			2,54E+05	5,58E-05	2,20E-10
5D3	1,63E+06	4,83E-04	2,96E-10	1,51E+06	5,84E-04	3,87E-10
8B6	1,16E+06	6,07E-04	5,23E-10	9,83E+05	9,60E-04	9,76E-10
21D9	8,52E+05	6,58E-05	7,72E-11	8,31 E+05	6,18E-05	7,44E-11
14B2	6,69E+05	1,84E-04	2,75E-10	8,08E+05	2,79E-04	3,46E-10
9C11	5,79E+05	6,50E-05	1,12E-10	6,37E+05	5,86E-05	9,21 E-11
22D10	1,82E+05	6,50E-05	3,56E-10	2,45E+05	1,55E-04	6,32E-10

5

Ejemplo 1.2.C.1: Especificidad de especie de anticuerpos monoclonales murinos anti-IL-13 humana

Para determinar si los 17 anticuerpos monoclonales descritos anteriormente reconocen IL-13 murina, se dispuso un ELISA indirecto revistiendo placas de ELISA con 5 µg/ml de IgG anti-ratón de cabra, anticuerpo específico de fragmento Fc (Pierce n.º 31170, Rockland, IL). Se prepararon mAb anti-IL-13 humana murinos a diversas concentraciones que varían de 0,1 a 100 ng/ml en PBS que contenía BSA al 0,1 %; se añadieron 50 µl de cada dilución de anticuerpo a la placa de ELISA revestida y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron 3 veces con PBS que contenía Tween-20 al 0,05 %. Se diluyó IL-13 de ratón biotinada recombinante (R&D Systems) a 0,1 µg/ml en PBS que contenía BSA al 0,1 %; se añadieron 50 µl/pocillo y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron 3 veces con PBS que contenía Tween-20 al 0,05 %. Se diluyó estreptoavidina HRP (Pierce n.º 21126, Rockland, IL.) 1:20000 en PBS que contenía BSA al 0,1 %; se añadieron 50 µl/pocillo y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con PBS que contenía Tween-20 al 0,05 %. Se añadieron cincuenta microlitros de solución de TMB (Sigma n.º T0440, St. Louis, MO.) a cada pocillo y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de ácido sulfúrico 1 N. Las placas se leyeron con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm. Los resultados del ELISA indirecto indicaron que mAb 3H7 fue capaz de unirse a IL-13. En un bioensayo posterior se demostró que 3H7 pudo inhibir la producción de TARC estimulada por mL-13 de una manera dependiente de la dosis, con un CI_{50} de 2,4 nM. El análisis de Biacore también demostró la unión positiva de 3H7 a mL-13, con una K_D de 12 nM. Todos los demás mAb de la tabla 8 no mostraron ninguna unión positiva a IL-13 de ratón.

También se midió la potencia de neutralización de los mAb anti-hIL-13 frente a IL-13 no humana de primate (cinomolgo) e IL-13 de oveja en el ensayo de A-548. Para generar IL-13 de cinomolgo y oveja, se obtuvo ADNc para cada proteína mediante PCR en plantilla de ADN genómico usando cebadores degenerados basados en la secuencia de IL-13 humana. Las proteínas recombinantes de IL-13 de cinomolgo y oveja se expresaron posteriormente en células COS transfectadas transitoriamente. También se generó IL-13 humana de tipo salvaje en paralelo como control en todos los estudios funcionales. Las células A-549 respondieron a la IL-13 tanto de cinomolgo como de oveja con un valor de DE_{50} similar al de la IL-13 humana. La mayoría de los mAb neutralizaron la

30

actividad de IL-13 de cinomolgo, demostrando reactividad cruzada con IL-13 de cinomolgo (Tabla 7). Sin embargo, ninguno de los anticuerpos mostró neutralización significativa de IL-13 de oveja.

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

La actividad de IL-13 está mediada por un complejo receptor que consiste en las cadenas de IL-13R α 1 e IL-4R α . En primer lugar, la citoquina experimenta una interacción de afinidad relativamente baja con IL-13R α 1 en la superficie de las células. El complejo IL-13/IL-13R α 1 recluta a continuación IL-4R α para formar el receptor de IL-13 completo, que se une a su ligando (IL-13) con alta afinidad (Zurawski *et al.* (1993) EMBO J. 12:2663; Zurawski *et al.* (1995) J. Biol. Chem. 270:23869). La unión de IL-13 con el receptor de alta afinidad envía a continuación señales corriente abajo mediante la cadena de IL-4R α que implica la ruta de transductor de señales de quinasas de Jano y activador de transcripción (JAK-STAT), por ejemplo, mediante la fosforilación de STAT6, que se puede monitorizar como una de las respuestas celulares más tempranas a IL-13 (Murata *et al.*, citado anteriormente).

Existe otro receptor de unión a IL-13, la cadena de IL-13R α 2 (IL-13R α 2), que se une a IL-13 con alta afinidad (0,25-1,2 nM) (Caput, *et al.* 1996 J. Biol. Chem. 271, 16921-16926; Donaldson *et al.* 1998 J. Immunol. 161,2317-2324). No se conoce que ninguna otra molécula receptora esté implicada en el complejo IL-13/IL-13R α 2. En principio, se pensó que IL-13R α 2 actúa como receptor "señuelo" sin señalización. Sin embargo, posteriormente se descubrió que se puede unir a IL-13, y transmite señales a través de la ruta de AP-1, lo que conduce a la producción de TGF-beta en ciertos tipos de células que incluyen macrófagos, lo que su vez conduce a fibrosis pulmonar (Fichtner-Feigl. 2006 Nat Med 12:99-106). Por lo tanto, las rutas tanto del complejo IL-13R α 1/IL-4R como de IL-13R α 2 contribuyen a la fisiopatología general del asma y otras enfermedades mediadas por IL-13. Se han usado varios enfoques, tales como formación de un mapa de epítomos, ensayos de unión a receptores, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), y ensayos BIACORE adicionales, para dilucidar la interacción entre los anticuerpos anti-IL-13 de la divulgación e IL-13 humana.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales descritos anteriormente son capaces de bloquear la unión de IL-13 a los receptores de IL-13 (IL-13R α 1 e IL-13R α 2), se desarrolló un ELISA de unión a receptores como sigue a continuación. Se revistieron placas de ELISA de 96 pocillos de alta unión con 4 ug/ml de IL-13R α 1/Fc o IL-13R α 2/Fc recombinante (R&D Systems) en 100 ul/pocillo de tampón de revestimiento (tampón de carbonato-bicarbonato, Pierce) a 4 °C. Después de 16 h, se retiró la solución de revestimiento por sacudida de los contenidos de la placa en un sumidero, y las placas se lavaron y se bloquearon 4 veces con Tampón de bloqueo Superblock (240 ul/pocillo) (Pierce). Se añadieron los mAb anti-IL-13 (en dilución seriada 1:4 desde 40 ul/ml, 50 ul/pocillo) y Biotina-IL-13 (50 ul/pocillo, concentraciones finales de 5 nM para hIL-13R α 1/Fc, y 0,5 nM para hIL-13R α 2/Fc) y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente (TA). Las placas se lavaron 5 veces con 300 ul de PBST al 0,1 %, y a continuación se añadieron 100 ul de mAb anti-biotina de ratón diluido 1:5000 (Jackson Immunosciences) y se incubaron a TA durante 45 minutos. Las placas se lavaron de nuevo 5 veces con 300 ul de PBST al 0,1 %, seguido de la adición de reactivo de sustrato de TMB (100 ul/pocillo, Pharmingen); se revelaron durante 5 minutos, y se detuvieron por adición de 50 ul de H₂SO₄ 2 M (VWR). Se determinaron las DO a 450 nm por espectrofotometría.

Además, se evaluaron también las propiedades de bloqueo de receptores de los mAb mediante un ensayo de unión a receptores usando células COS transfectadas con IL-13R α 2. Se marcó IL-13 humana recombinante con ¹²⁵I (Amersham, Arlington Heights, IL), usando el reactivo IODO-GEN (Pierce, Rockford, IL) como se ha descrito anteriormente (Obiri NI *et al.*, (1995) J Biol Chem. 270:8797-8804). Se estimó que la actividad específica de la IL-13 radiomarcada era de 158 μ Ci/ μ g de proteína. La IL-13 marcada exhibió una bioactividad similar a la IL-13 sin marcar, según se evaluó mediante el bioensayo de A-549. Para los experimentos de unión, las células COS se transfectaron transitoriamente con IL-13R α 2 humano mediante Lipofectamine 2000 (Invitrogen) y se incubaron durante 48 h. Se incubaron células COS transfectadas (5 x 10⁵ células en 100 μ l de tampón de unión: RPMI 1640 que contenía albúmina sérica humana al 0,2 % y 10 mmol de HEPES) con ¹²⁵I-IL-13 1,0 nM con o sin IL-13 sin marcar 1 uM a 4 °C durante 2 horas. La ¹²⁵I-IL-13 unida a células se separó de la ¹²⁵I-IL-13 no unida mediante centrifugación a través de un gradiente de aceite de ftalato, y se determinó la radiactividad con un contador gamma (Wallac, Gaithersburg, MD). Para el ensayo de desplazamiento de anticuerpos, se incubaron células COS transfectadas con ¹²⁵I-IL-13 (1,0 nM) con o sin concentraciones crecientes (hasta 50 ug/ml) de anticuerpos anti-IL-13, como se ha descrito anteriormente. Ambas formas de ensayo de unión a receptores demostraron lo siguiente: en primer lugar, 13C5 y 9C11 bloquearon la unión de IL-13 a IL-13R α 1; en segundo lugar, 13C5 bloqueó fuertemente la unión de IL-13 a IL-13R α 2 (CI₅₀ ~ 1-3 nM tanto en RBA de superficie celular y como en ELISA de RB), mientras que 9C11 bloqueó la unión de IL-13 a IL-13R α 2 con una potencia inferior (CI₅₀ > 10 nM); y en tercer lugar, 5G1 y 3E5 no pudieron bloquear la unión de IL-13 a IL-13R α 1 o IL-13R α 2. También se analizaron otros tres anticuerpos anti-IL-13, BAK502G9 (documento PCT WO 2005/007699 de CAT), mAb13.2 (documento PCT WO 2005/123126A2 de Wyeth) y MJ2-7 (documento PCT WO 2006/0073148A1 de Wyeth) para determinar su capacidad de bloquear la unión de IL-13 humana a IL-13R α 2 humano tanto en ELISA de unión a receptores como en RBA de superficie celular. El anticuerpo mAb13.2 no bloqueó la unión de IL-13 a IL-13R α 1 o IL-13R α 2. BAK502G9 y MJ2-7 fueron capaces de bloquear la unión de IL-13 a IL-13R α 1; sin embargo, mostraron una baja potencia en el bloqueo de la unión de IL-13 a IL-13R α 2 con concentraciones de anticuerpo de hasta 50 μ g/ml (330 nM).

También se analizó la interacción entre IL-13 e IL-13R α 1/ α 2 en presencia de mAb anti-IL-13 mediante BIACORE. Este análisis se llevó a cabo en varios formatos. En primer lugar, se unió IL-13R α 1/Fc al chip de Biacore y se hizo fluir IL-13 sobre el chip, en presencia y ausencia de mAb anti-IL-13. Los mAb 13C5 y 9C11, entre otros, pudieron bloquear la unión de IL-13 a IL-13R α 1, mientras que 5G1 y 3E5 fracasaron en inhibir la unión de IL-13 a IL-13R α 1, de forma consistente con los ensayos de unión a receptores. En segundo lugar, se unió IL-4R al chip de BIACORE, y se hizo fluir un complejo de IL-13 unida previamente a IL-13R α 1 sobre el chip. En ausencia de mAb anti-IL-13, se demostró la formación de un complejo trimolecular. Sin embargo, la adición del anticuerpo anti-IL-13 5G1 a la mezcla de IL-13 unida previamente a IL-13R α 1 evitó la unión a IL-4R en el chip. Esto indicó que, aunque 5G1 no podía bloquear la unión de IL-13 a IL-13R α 1, podía bloquear la unión de IL-13 a IL-4R, proporcionando una base mecanística para su actividad neutralizante de IL-13. Estas observaciones se confirmaron además mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), donde se observaron complejos heterotriméricos (mAb-IL-13-IL-13R α 1/Fc) para 5G1, pero no para 13C5. Los estudios de formación de mapas de epítomos posteriores usando procesamiento de proteinasa del complejo mAb-IL-13 seguido de análisis por espectrometría de masas indicaron lo siguiente: en primer lugar, 5G1 se une a restos de IL-13 incluyendo el péptido N-terminal de 11 aa (GPVPPSTALRE), que cubre parte de la región de Hélice A que se ha mostrado que interactúa con IL-4R (Moy *et al.* 2001 J Mol Biol. 310:219 y Horita *et al.*, (2001) J Mol Biol. 310:231); en segundo lugar, el anticuerpo 9C11 interactúa con una región entre la Hélice C y la Hélice D (VSAGQFSSLHVR); en tercer lugar, el anticuerpo 13C5 interacciona con restos de IL-13 que incluyen una región que cubre la Hélice D (VRDTK IEVAQ FVKDL LLHLK KLFRE GR correspondiente a los aminoácidos 104-130 de la SEQ ID NO: 1). Se ha demostrado que la Hélice D interactúa con los receptores de IL-13 (Moy *et al.* 2001 J Mol Biol. 310:219; Horita *et al.* 2001 J Mol Biol. 310:231; y Madhankumar *et al.* 2002 JBC 277:43194). Dado que 13C5 se une a la variante de IL-13 humana ($K_D = 50$ pM) con mucha más fuerza que a IL-13 de cinomolgo ($K_D = 1800$ pM), y la única diferencia de secuencia entre la variante de IL-13 humana e IL-13 de cinomolgo en esta posible región de epítomo de 13C5 es L en IL-13 humana, pero V en IL-13 de cinomolgo, en la posición 120, los presentes inventores generaron una IL-13 de cinomolgo mutante V120L y analizaron si esta mutación aumentaría la afinidad de unión a 13C5 con respecto a la IL-13 de cinomolgo de tipo salvaje. Basándose en los resultados de Biacore y el bioensayo, la afinidad de unión así como la potencia neutralizante de 13C5 para la IL-13 de cinomolgo mutante V120L fueron equivalentes a las de la IL-13 de cinomolgo de tipo salvaje, lo que indica que esta diferencia de V/L en la posición 120 en la región C-terminal no contribuye a la diferencia de afinidad de 13C5 por la variante de IL-13 humana frente a IL-13 de cinomolgo, y que debe haber otros restos fuera de la región C-terminal que contribuyan a la afinidad de unión diferencial de 13C5 a IL-13 humana y de cinomolgo. Esto es consistente con la observación de que 13C5 no reconoce IL-13 humana desnaturalizada mediante análisis de transferencia de Western, lo que indica que el epítomo de unión de 13C5 en la IL-13 humana es fuertemente conformacional.

Los estudios de unión y de formación de mapas de epítomos indicaron que 5G1 no inhibió la interacción de IL-13 con IL-13R α 1, sino que alteró la interacción de IL-13/IL-13R α 1 con IL-4R α . Se piensa que esta alteración interfiere en la formación de un complejo de señalización de IL-13 funcional. Estas observaciones proporcionan un modelo teórico para la actividad neutralizante de este anticuerpo en un sistema mediado por IL-13R α 1/IL-4R α tal como células A-549. Por el contrario, 13C5 bloqueó la unión de IL-13 tanto a IL-13R α 1 como a IL-13R α 2. De forma interesante, incluso aunque 9C11 fue capaz de bloquear la unión de IL-13 a IL-13R α 1, solo mostró inhibición parcial (o de baja potencia) de la unión de IL-13 a IL-13R α 2. Aunque IL-13R α 1 y R α 2 adoptan un plegamiento tridimensional y una orientación de unión a IL-13 similares, tienen una baja identidad de secuencia y por lo tanto los restos específicos responsables de la unión de IL-13 pueden variar (Arima 2005 JBC 280:24915; y Madhankumar *et al.* 2002 JBC 277:43194). Por consiguiente, los restos específicos en IL-13 para la unión a IL-13R α 1 e IL-13R α 2 pueden diferir, lo que podría explicar las propiedades diferenciales de bloqueo de receptores de 9C11.

Los ensayos de unión a receptores, formación de mapas de epítomos, Biacore, y bioensayo descritos anteriormente indican colectivamente que un anticuerpo anti-IL-13 neutralizante puede inhibir la actividad asociada a IL-13 a través de los siguientes mecanismos:

1) Inhibe la unión de IL-13 tanto a IL-13R α 1 como a IL-13R α 2 por interacción con IL-13 en la región implicada en la unión a receptores tanto para IL-13R α 1 como para IL-13R α 2. Un ejemplo de tal anticuerpo es 13C5. Tales anticuerpos inhibirán la señalización de IL-13 tanto a través del complejo IL-13R α 1/IL-4R α como a través de IL-13R α 2.

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

3) Inhibe la unión de IL-13 a IL-13R α 1, pero no inhibe de forma eficaz la unión de IL-13 a IL-13R α 2. Esto podría ocurrir por las siguientes razones: a) epítomo: una región que está implicada en la unión a IL-13R α 1 pero no en la unión a IL-13R α 2 o no tan fuertemente implicada en la unión a IL-13R α 2. Un ejemplo es 9C11; b) afinidad: dado que IL-13R α 2 tiene mucha mayor afinidad que IL-13R α 1 por IL-13, un anticuerpo de baja afinidad puede ser capaz de bloquear la unión de IL-13 a IL-13R α 1 pero no a IL-13R α 2 a las concentraciones fisiológicas de un anticuerpo terapéutico. Un ejemplo es BAK502G9, que presentó una afinidad de 2,11 nM frente a IL-13 humana de tipo salvaje recombinante según se evalúa mediante Biacore (documento PCT WO 2005/007699 de CAT). Otro ejemplo es MJ2-7, que presentó una afinidad de 1,4 nM frente a IL-13 humana de tipo salvaje recombinante

y una mayor afinidad (43 pM) por IL-13 de mono según se evalúa mediante Biacore (documento PCT WO 2006/0073148A1 de Wyeth). Debido a la diferencia de afinidad, este mAb puede inhibir la unión de IL-13 de mono a IL-13R α 2 de forma eficaz; sin embargo, inhibe la unión de IL-13 humana al mismo receptor con mucha menos potencia.

Los mAb BAK502G9 y MJ2-7 tienen epítopos similares (documento PCT WO 2005/007699 de CAT y documento PCT WO 2006/0073148A1 de Wyeth) y compiten por la unión a IL-13 según se evalúa mediante ELISA competitivo. En resumen, BAK502G9 se inmovilizó en una placa de ELISA seguido de lavado y bloqueo. A continuación, se añadió IL-13 humana biotinada (10 ng/ml) a la placa en presencia de diversas concentraciones de MJ2-7 (0,2 ng/ml a 20 ug/ml), seguido de lavado y detección usando anticuerpo anti-biotina conjugado con HRP. Este estudio demostró que MJ2-7 compitió de forma dependiente de dosis con BAK502G9 por la unión a IL-13 humana. Una IgG de control negativo no mostró competición con BAK502G9.

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

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

Ejemplo 2: Anticuerpos anti-IL-13 humana recombinantes

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

El ADN que codifica la región constante de cadena pesada de los anticuerpos monoclonales murinos anti-IL-13 humana 5G1, 13C5, 9C11, 21D9, y 3H7 se reemplazó por un fragmento de ADNc que codifica la región constante de IgG1 humana que contiene 2 mutaciones de aminoácidos de la región bisagra mediante recombinación homóloga en bacterias. Estas mutaciones son un cambio de leucina a alanina en la posición 234 (numeración EU) y un cambio de leucina a alanina en la posición 235 (Lund *et al.*, 1991, *J. Immunol.*, 147:2657). La región constante de cadena ligera de cada uno de estos anticuerpos se reemplazó por una región constante kappa humana. Los anticuerpos quiméricos de longitud completa se expresaron de forma transitoria en células COS mediante transfección conjunta de los ADNc de cadena pesada y ligera quiméricos ligados al plásmido de expresión pBOS (Mizushima y Nagata, *Nucleic Acids Research* 1990, vol. 18, pág. 5322). Los sobrenadantes celulares que contenían anticuerpo quimérico recombinante se purificaron mediante cromatografía en Sepharose de Proteína A y el anticuerpo unido se eluyó por adición de un tampón ácido. Los anticuerpos se neutralizaron y se dializaron en PBS.

Los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-IL-13 humana purificados se sometieron a ensayo a continuación para su capacidad de inhibir la producción de TARC inducida por IL-13 por parte de células A-549 como se describe en los Ejemplos 1.1.C2 y 1.1.C3. La Tabla 12 muestra los valores de CI₅₀ de los bioensayos de A-549 para tres anticuerpos quiméricos.

Tabla 9 Neutralización de rhIL-13 wt mediante anticuerpos anti-IL-13 quiméricos en bioensayo de A-549

Quimérico	CI ₅₀ media (M)
5G1-Quim	4,10E-11
13C5-Quim	1,91E-10
9C11-Quim	1,23E-10

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

Ejemplo 2.2.1: Selección de marcos de anticuerpos humanos

Cada secuencia génica de las cadenas pesada variable y pesada ligera murinas (como se describen en la Tabla 3) se alinearon por separado frente a 44 secuencias de cadenas pesadas variables de línea germinal de inmunoglobulina humana o 46 secuencias de cadenas ligeras variables de línea germinal (procedentes del sitio web NCBI Ig Blast en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/retrieveig.html>.) usando el software Vector NTI.

La humanización se basó en la homología de las secuencias de aminoácidos, el análisis de grupos de CDR, la frecuencia de uso entre anticuerpos humanos expresados, y la disponibilidad de información de las estructuras cristalinas de los anticuerpos humanos. Teniendo en cuenta posibles efectos de unión de anticuerpo, emparejamiento VH-VL, y otros factores, se realizaron mutaciones en restos murinos a restos humanos donde los restos marco murinos y humanos eran diferentes, con algunas excepciones. Se diseñaron estrategias de humanización adicionales basándose en un análisis de las secuencias humanas de anticuerpos de línea germinal, o un subgrupo de las mismas, que poseían un alto grado de homología, es decir, similitud de secuencia, con respecto a la secuencia real de aminoácidos de las regiones murinas variables de anticuerpos.

Se usó modelado de homología para identificar los restos únicos de las secuencias murinas de anticuerpos que se predice que son críticas para la estructura del sitio de combinación de anticuerpos (las CDR). El modelado de homología es un método computacional mediante el que se generan coordenadas tridimensionales aproximadas para una proteína. La fuente de coordenadas iniciales y la orientación para su refinado adicional son una segunda proteína, la proteína de referencia, para la que se conocen las coordenadas tridimensionales y cuya secuencia está relacionada con la secuencia de la primera proteína. La relación entre las secuencias de las dos proteínas se usa para generar una correspondencia entre la proteína de referencia y la proteína para la que se desean las coordenadas, la proteína diana. Las secuencias primarias de las proteínas de referencia y diana se alinean con las coordenadas de las partes idénticas de las dos proteínas transferidas directamente de la proteína de referencia a la proteína diana. Las coordenadas para las partes emparejadas de las dos proteínas, por ejemplo, de mutaciones, inserciones, o deleciones de restos, se construyen desde plantillas estructurales genéricas y se refina su energía para asegurar la consistencia con las coordenadas de modelo ya transferidas. Esta estructura proteica computacional se puede refinar adicionalmente o emplear directamente en estudios de moderado. Debería ser evidente a partir de esta descripción que la calidad de la estructura modelada viene determinada por la exactitud de la afirmación de que las proteínas de referencia y diana están relacionadas y la precisión con la que se construye la alineación de secuencia.

Para las secuencias murinas 5G1, 13C5 y 9C11, se usó una combinación de búsqueda de BLAST e inspección visual para identificar estructuras de referencia adecuadas. Se considera una identidad de secuencia de un 25 % entre las secuencias de aminoácidos de referencia y diana el mínimo necesario para intentar un ejercicio de modelado de homología. Las alineaciones de secuencias se construyeron manualmente y se generaron coordenadas de modelo con el programa Jackal (véase Petrey, D., Xiang, Z., Tang, C.L., Xie, L., Gimpelev, M., Mitros, T., Soto, C.S., Goldsmith-Fischman, S., Kernytsky, A., Schlessinger, A., *et al.* 2003. Using multiple structure alignments, fast model building, and energetic analysis in fold recognition and homology modeling. *Proteins* 53 (Supl. 6): 430-435).

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

La probabilidad de que un resto de marco dado tenga impacto en las propiedades de unión del anticuerpo depende de su proximidad a los restos de CDR. Por lo tanto, usando las estructuras modelo, los restos que difieren entre las secuencias murina y humana se clasificaron de acuerdo con su distancia desde cualquier átomo en las CDR. Los restos que están a menos de 4,5 Å de cualquier átomo de CDR se identificaron como los más importantes y se recomendaron para ser candidatos para retención del resto murino en el anticuerpo humanizado (es decir, mutación inversa).

Para la humanización de las regiones variables de 5G1, se siguió el enfoque general provisto en la presente divulgación. En primer lugar, se construyó un modelo molecular de las regiones variables de 5G1 con la ayuda de los programas de ordenador ABMOD y ENCAD (Levitt, M., *J. Mol. Biol.* 168: 595-620 (1983)). A continuación, basándose en una búsqueda de homología frente a secuencias humanas de segmentos V y J, se seleccionaron el segmento de VH 21/28 (Dersimonian, H., *et al.*, *J. Immunol.* 139: 2496-2501 (1987)) y el segmento de J JH4 (Ravetch, J.V., *et al.*, *Cell* 27: 583-591 (1981)) para proporcionar los marcos para la región variable de cadena pesada de Hu5G1. Para la región variable de cadena ligera de 5G1, se usaron el segmento de VL HF-21/28 (Chastagner, P., *et al.*, *Gene* 101: 305-306 (1991)) y el segmento de J JK4 (Hieter, P.A., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 257: 1516-1522 (1982)). La identidad de los aminoácidos de marco entre VH de 5G1 y los segmentos aceptores humanos 21/28 y JH4 fue de un 72 %, mientras que la identidad entre VL de 5G1 y los segmentos aceptores humanos HF21/28 y JK4 fue de un 83 %. En las posiciones de marco en las que el modelo computacional sugirió contacto significativo con las CDR, los aminoácidos de las regiones V de ratón se sustituyeron por los aminoácidos de marco

humanos originales. Esto se realizó en los restos 48, 67, 68, 70, 72, 74 y 97 de la cadena pesada. Para la cadena ligera, el reemplazo se realizó en el resto 50. Los restos de marco que aparecieron solo raras veces en sus posiciones respectivas en los subgrupos de la región V humana correspondientes se reemplazaron con aminoácidos de consenso humanos en estas posiciones. Esto se realizó en los restos 44 y 76 de la cadena pesada, y en los restos 2, 15, 41, 42, 44 y 51 de la cadena ligera.

Para la humanización de las regiones variables de 13C5, se siguió el enfoque general provisto en la presente divulgación. En primer lugar, se construyó un modelo molecular de las regiones variables de 13C5 con la ayuda de los programas de ordenador ABMOD y ENCAD (Levitt, M., J. Mol. Biol. 168: 595-620 (1983)). A continuación, basándose en una búsqueda de homología entre las secuencias humanas de segmentos V y J, se seleccionaron el segmento de VH M60 (Schroeder, Jr., H.W. y Wang, J.Y., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6146-6150 (1990)) y el segmento de J JH4 (Ravetch, J.V., et al., Cell 27: 583-591 (1981)) para proporcionar los marcos para la región variable de cadena pesada de Hu 13C5. Para la región variable de cadena ligera de Hu 13C5, se usaron el segmento de VL III-3R (Manheimer-Lory, A., et al., J. Exp. Med. 174: 1639-1652 (1991)) y el segmento de J JK4 (Hieter, P.A., et al., J. Biol. Chem. 257: 1516-1522 (1982)). La identidad de los aminoácidos de marco entre VH de 13C5 y los segmentos humanos aceptores M60 y JH4 fue de un 74 %, mientras que la identidad entre VL de 13C5 y los segmentos humanos aceptores III-3R y JK4 fue de un 75 %.

En las posiciones de marco en las que el modelo computacional sugirió un contacto significativo con las CDR, los aminoácidos de las regiones V de ratón se sustituyeron por los aminoácidos de marco humanos originales. Esto se realizó en los restos 22, 49 y 71 para la cadena ligera. Los restos de marco que aparecieron solo raras veces en sus respectivas posiciones en los subgrupos de la región V humana correspondientes se reemplazaron con aminoácidos de consenso humanos en esas posiciones. Esto se realizó en los restos 10, 46, 83, 84, 86 y 87 de la cadena pesada, y los restos 62 y 73 de la cadena ligera.

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

Tabla 10: Lista de secuencias de aminoácidos de mAb humanizados

SEQ ID NO:	Región de la proteína	Secuencia
		123456789012345678901234567890
70	VH 5G1.1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT TYGVSWVRQAPGQGLEWIG EIYPGNYNTYY NEKFRGKATMTIDTSTSTAYMELRSLRSD TAVYYCSR WRTSYFSDYGYFDY WGQGTITV VSS
71	VL 5G1.1	DVVMTQSPPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLV HSHGNTY LHWYQQRPGQSPRLLIYTVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC SQSTHVPYTFGGG TKVEIKR
72	VH 5G1.2	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT TYGVSWVRQAPGQGLEWIG EIYPGNYNTYY NEKFRGKATLTADKSTSTAYMELSSLRSD TAVYFCR WRTSYFSDYGYFDY WGQGTITV VSS
73	VL 5G1.2	DVVMTQSPPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLV HSHGNTY LHWYQQRPGQSPRLLIYTVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YFC SQSTHVPYTFGGG TKVEIKR
74	VH 5G1.3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT TYGVSWVRQAPGQGLEWIG EIYPGNYNTYY NEKFRGKATLTADKSTSTAYMELSSLRSD TAVYYCSR WRTSYFSDYGYFDY WGQGTITV VSS

75	VL 5G1.3		DIVMTQSPPLSLPVTTPGPASISCRSSQSLV HSHGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYTVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYC SQSTHVPYTFGGG TKVEIK
76	VH 13C5.1		EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTFSGFSLS T SDMGVDW IRQPPGKALEWLAHIWDDV KR YNPALKS RLTISKDTSKSQVVLMTNMDPV DTATYYCAR TVSSGYIYYAMDY WGQGTIVT VSS
77	VL 13C5.1		DIQMTQSPSSLSASVGDRTIITCRASQDIR NYLNWYQRKPGKVVKLLIYYSKHLHSGVPS RFGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC QQ GNTLPLTFGGG TKVEIKR
78	VH 13C5.2		EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTFSGFSLS T SDMGVDW IRQPPGKALEWLAHIWDDV KR YNPALKS RLTISKDTSKSQVVLMTNMDPV DTATYYCAR TVSSGYIYYAMDY WGQGTIVT VSS
79	VL 13C5.2		DIQMTQSPSSLSASVGDRTIITCRASQDIR NYLNWYQRKPGKVVKLLIFYTSKHLHSGVPS RFGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYFC QQ GNTLPLTFGGG TKVEIKR
80	VH 13C5.5 (INVENCIÓN)		EVTLRESGPGVLVKPTQTLTLTCTLYGFSLS T SDMGVDW IRQPPGKGLEWLAHIWDDV KR YNPALKS RLTISKDTSKNQVVLKLTSDVPV DTATYYCAR TVSSGYIYYAMDY WGQGTIVT VSS
81	VL 13C5.5 (INVENCIÓN)		DIQMTQSPSSLSASVGDRTIITCRASQDIR NYLNWYQQKPGKAPKLLIFYTSKHLHSGVPS RFGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYC QQ GNTLPLTFGGG TKVEIK
82	VH 9C11.1		EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT SSWIHWVRQAPGQGLEWIGMIHPSDSETRL NQKFKD RATMTVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAS TATDFDY WGQGTIVTVSS
83	VL 9C11.1		DVVLITQTPLSLPVTPGEPASISCRSTQ TLL NSDGF TYLDWYLQKPGQSPQLLIYLVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYC FQNNYLPLTFGAG TKLEIKR
84	VH 9C11.2		EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT SSWIHWVNQAPGQGLEWIGMIHPSDSETRL NQKFKD KATLTVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAS TATDFDY WGQGTIVTVSS
85	VL 9C11.2		DVVLITQTPLSLPVTPGEPASISCRSTQ TLL NSDGF TYLDWYLQKPGQSPQLLIYLVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYC FQNNYLPLTFGAG TKLEIKR
90	VH 5G1.5		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT TYGVS WVRQAPGQGLEWIG EIYPGN YNTYY NEKFRG KATLTADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCSR WRTSYFSDYGYFDY WGQGTIVT VSS

91	VL 5G1.5		DIVMTQSP S LSLPVTPGQPASISCRSSQSLV HSHGNTYLH WYLQKPGQSPKLLIYTVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCSQ STHVPYTF GGGTKVEIK
80	VH 13C5.5L2E		EVTLRESGPGLVKPTQTLTLTCTLYGFSL TSD MGVDW IRQPPGKGLEWLAHIWDDV KR YNPALKS RLLTISKDTSKNQVVLKLTSDVPV DTATYYCART TVSSGYIYYAMDY WGQGTLLV VSS
92	VL 13C5.5L2E		DIQ MTQSPSSLSASVGRVTISCRASQDIRNYL NWYQQKPGKAPKLLIF YTSMKPR GVPSRFS GSGSGTDYTLTISSLPEDIATYYC QQNT LPLTF GGGTKVEIK
80	VH 13C5.5L3F		EVTLRESGPGLVKPTQTLTLTCTLYGFSL TSD MGVDW IRQPPGKGLEWLAHIWDDV KR YNPALKS RLLTISKDTSKNQVVLKLTSDVPV DTATYYCART TVSSGYIYYAMDY WGQGTLLV VSS
93	VL 13C5.5L3F		DIQMTQSPSSLSASVGRVTISCRASQDIR NYLNWYQQKPGKAPKLLIF YTSKLNH SGVPS RFSGSGSGTDYTLTISSLPEDIATYYC QQ GLTPPLT FGGTKVEIK
80	VH 13C5.5L2EL3F		EVTLRESGPGLVKPTQTLTLTCTLYGFSL TSD MGVDW IRQPPGKGLEWLAHIWDDV KR YNPALKS RLLTISKDTSKNQVVLKLTSDVPV DTATYYCART TVSSGYIYYAMDY WGQGTLLV VSS
94	VL 13C5.5L2EL3F		DIQMTQSPSSLSASVGRVTISCRASQDIR NYLNWYQQKPGKAPKLLIF YTSMKPR GVPS RFSGSGSGTDYTLTISSLPEDIATYYC QQ GLTPPLT FGGTKVEIK

Ejemplo 2.2.2: Construcción de anticuerpos humanizados

5 Los anticuerpos humanizados construidos *in silico* descritos anteriormente se construyeron *de novo* usando oligonucleótidos. Para cada ADNc de región variable, se diseñaron 6 oligonucleótidos de 60-80 nucleótidos cada uno para superponerse entre sí en 20 nucleótidos en el extremo 5' y/o 3' de cada oligonucleótido. En una reacción de hibridación, los 6 oligonucleótidos se combinaron, se hicieron reaccionar y se hibridaron en presencia de dNTP. A continuación, se añadió ADN polimerasa I, fragmento grande (Klenow) (New England Biolabs n.º M0210, Beverley, MA) para rellenar los huecos de aproximadamente 40 pb entre los oligonucleótidos superpuestos. A continuación se realizó PCR para amplificar el gen completo de la región variable usando los dos cebadores más externos que contienen secuencias colgantes complementarias al sitio de clonación múltiple en un vector pBOS modificado (Mizushima, S. y Nagata, S., (1990) Nucleic acids Research vol. 18, n.º 17)). Los productos de la PCR procedentes de cada montaje de ADNc se separaron en un gel de agarosa y la banda correspondiente al tamaño de ADNc de región variable predicho se cortó y se purificó. La región pesada variable se insertó en marco en un fragmento de ADNc que codifica la región constante de IgG1 humana que contiene 2 mutaciones de aminoácidos de la región bisagra mediante recombinación homóloga en bacterias. Estas mutaciones son un cambio de leucina a alanina en la posición 234 (numeración EU) y un cambio de leucina a alanina en la posición 235 (Lund *et al.*, 1991, J. Immunol., 147:2657). La región de cadena ligera variable se insertó en marco con la región constante kappa humana mediante recombinación homóloga. Se aislaron colonias bacterianas y se extrajo el ADN de plásmido; los insertos de ADNc se secuenciaron en su totalidad. Las cadenas ligeras y pesadas humanizadas correctas correspondientes a cada anticuerpo se transfectaron conjuntamente en células COS para producir de forma transitoria anticuerpos humanizados anti-IL-13 humana de longitud completa. Para 13C5, se transfectaron conjuntamente en células COS vectores pBOS que contienen ADNc injertado de cadena pesada de 13C5 y ADNc injertado de cadena ligera de 13C5. Los sobrenadantes celulares que contenían anticuerpo quimérico recombinante se purificaron mediante cromatografía en Sepharose de Proteína A y el anticuerpo unido se eluyó mediante la adición de tampón ácido. Los anticuerpos se neutralizaron y se dializaron en PBS. Se describen varios anticuerpos humanizados en la Tabla 10.

La capacidad de los anticuerpos humanizados purificados para inhibir la actividad de IL-13 se determinó usando el

bioensayo de A-549 como se describe en los Ejemplos 1.1.C. Las afinidades de unión de los anticuerpos humanizados por la IL-13 humana recombinante se determinaron usando medición de resonancia plasmónica superficial (Biacore®) como se describe en el Ejemplo 1.1.B. La Tabla 11 muestra los valores de CI_{50} de los bioensayos de A-549 y la afinidad de los primeros seis anticuerpos humanizados descritos en la Tabla 10 para el tipo salvaje (wt) y la variante de IL-13 humana.

5

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

mAb	Potencia (CI_{50}), M		Afinidad por hIL-13wt		
	hIL-13wt	hIL-13v	k_{on} (1/M*s)	k_{off} (1/s)	K_D (M)
5G1-Quim	7,69E-11	6,92E-11	9,15E+05	3,82E-05	4,17E-11
5G1.1	2,90E-11	7,41 E-11	7,86E+05	2,14E-05	2,72E-11
5G1.2	2,95E-11	5,53E-11	8,35E+05	8,81 E-05	1,05E-10
5G1.5	1,14E-10	6,55E-11	8,69E+05	1,91E-05	2,20E-11
13C5-Quim	1,07E-10	3,70E-11	1,70E+06	9,65E-05	5,68E-11
13C5.1	8,68E-10	3,69E-10	6,68E+05	4,74E-04	7,10E-10
13C5.2	1,93E-10	1,30E-10	1,26E+06	1,23E-04	9,79E-11
13C5.5	1,24E-10	6,90E-11	2,51 E+06	1,76E-04	7,01E-11

Se realizaron mutaciones adicionales en las secuencias de CDR del anticuerpo humanizado 13C5.5 usando técnicas conocidas en la técnica, y se generaron tres anticuerpos humanizados adicionales. La capacidad de estos anticuerpos humanizados adicionales para inhibir la actividad de IL-13 humana, de cinomolgo y de Rhesus se determinó usando el bioensayo de A-549 que se describe en los Ejemplos 1.1.C. Las afinidades de unión de los anticuerpos humanizados adicionales por IL-13 recombinante humana, de cinomolgo y de Rhesus se determinaron usando medición de resonancia plasmónica superficial (Biacore®) como se describe en el Ejemplo 1.1.B. Además de la unión e inhibición de IL-13 humana, estos tres anticuerpos adicionales mostraron una mejora de la afinidad por IL-13 de cinomolgo y de Rhesus. La Tabla 12 muestra los valores de CI_{50} de los bioensayos de A-549, y la Tabla 13 muestra la afinidad de los anticuerpos humanizados adicionales por IL-13 humana, de cinomolgo y de Rhesus.

10

15

Tabla 12: Potencia de neutralización de mAb anti-IL-13 humanizados adicionales

mAb	Potencia (CI_{50} , nM)		
	IL-13 humana	IL-13 de cinomolgo	IL-13 de Rhesus
13C5.5L2E	0,18	1,20	0,40
13C5.5L3F	0,15	0,46	0,14
13C5.5L2EL3F	0,12	0,48	0,26

Tabla 13: Afinidad de unión de mAb anti-IL-13 humanizados adicionales

mAb	Afinidad (K_D , nM)		
	IL-13 humana	IL-13 de cinomolgo	IL-13 de Rhesus
13C5.5L2E	0,12	0,52	0,29
13C5.5L3F	0,24	0,19	0,11
13C5.5L2EL3F	0,25	0,32	0,13

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

Los presentes inventores aislaron anticuerpos monoclonales que bloquean la unión de IL-13 tanto a IL-13R α 1 como a IL-13R α 2. Tanto el ensayo de unión a receptores basado en ELISA como el ensayo de unión a IL-13 marcada con

¹²⁵I en la superficie celular demostraron que 13C5, tanto en la versión murina como en la versión humanizada (es decir, 13C5.5), fue capaz de bloquear de forma eficaz la unión de IL-13 a ambos receptores. Anticuerpos en el mismo linaje que 13C5, incluyendo 25C8 y 33C3, también fueron capaces de bloquear la unión de IL-13 a ambos receptores.

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

Para determinar la capacidad del anticuerpo humanizado 13C5.5 para bloquear la unión de IL-13 a los receptores de IL-13 (IL-13R α 1 e IL-13R α 2), se usó un ensayo de unión a receptores basado en ELISA. Se revistieron placas de ELISA de 96 pocillos de alta unión con 4 ug/ml de IL-13R α 1/Fc o IL-13R α 2/Fc humano recombinante (R&D Systems) en 100 ul/pocillo de tampón de revestimiento (tampón de carbonato-bicarbonato, Pierce) a 4 °C. Después de 16 h, se retiró la solución de revestimiento por sacudida de los contenidos de la placa en un sumidero, y las placas se lavaron y se bloquearon 4 veces con tampón de bloque Superblock (240 ul/pocillo) (Pierce). Se añadieron el mAb anti-IL-13 humanizado 13c5.5 y los mAb de control (en diluciones seriadas 1:4 desde 40 ug/ml, 50 ul/pocillo) y biotina-IL-13 (50 ul/pocillo, concentraciones finales de 5 nM para hIL-13R α 1/Fc, y 0,5 nM para hIL-13R α 2/Fc) y se incubaron durante 2 h temperatura ambiente (TA). Las placas se lavaron 5 veces con 300 ul de PBST al 0,1 %, y a continuación se añadieron 100 ul de mAb anti-biotina de ratón diluido 1:5000 (Jackson Immunosciences) y se incubaron a TA durante 45 min. Las placas se lavaron de nuevo 5 veces con 300 ul de PBST al 0,1 %, seguido de la adición de reactivo de sustrato de TMB (100 ul/pocillo, Pharmingen); se revelaron durante 5 min, y se detuvieron por adición de 50 ul de H₂SO₄ 2 M (VWR). Se determinaron las DO a 450 nm por espectrofotometría. Los resultados se muestran en la Tabla 14.

Además, se evaluaron también las propiedades de bloqueo de receptores de los mAb humanizados mediante un ensayo de unión a receptores basado en superficie celular usando células COS transfectadas con IL-13R α 2. Se marcó IL-13 humana recombinante con ¹²⁵I (Amersham, Arlington Heights, IL), usando el reactivo IODO-GEN (Pierce, Rockford, IL) como se ha descrito anteriormente (Obiri NI *et al.*, (1995) J Biol Chem. 270:8797-8804). Se estimó que la actividad específica de la IL-13 radiomarcada era de 158 μ Ci/ μ g de proteína. La IL-13 marcada exhibió una bioactividad similar a la IL-13 sin marcar, según se evaluó mediante el bioensayo de A-549. Para los experimentos de unión, las células COS se transfectaron de forma transitoria con IL-13R α 2 humano mediante Lipofectamine 2000 (Invitrogen), y se incubaron durante 48 h. Se incubaron células COS transfectadas (5 x 10⁵ células en 100 μ l de tampón de unión: RPMI 1640 que contenía albúmina sérica humana al 0,2 % y 10 mmol de HEPES) con ¹²⁵I-IL-13 1,0 nM con o sin IL-13 sin marcar 1 uM a 4 °C durante 2 horas. La ¹²⁵I-IL-13 unida a células se separó de la ¹²⁵I-IL-13 no unida mediante centrifugación a través de un gradiente de aceite de ftalato, y se determinó la radiactividad con un contador gamma (Wallac, Gaithersburg, MD). Para el ensayo de desplazamiento de anticuerpos, se incubaron células COS transfectadas con ¹²⁵I-IL-13 (1,0 nM) con o sin concentraciones crecientes (hasta 50 ug/ml) de anticuerpo anti-IL-13 humanizado 13C5.5, como se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14: Potencia de los mAb en el bloqueo de la unión de IL-13 humana (wt) a IL-13R α 2 humano en ensayos de unión a receptores basados en superficie celular y basados en ELISA

mAb	Potencia (CI ₅₀ , nM)	
	Superficie celular	ELISA
13C5.5	2,7	1,1
BAK502G9	75,8	34,3
5G1.5	P.B.	P.B.
mAb13.2	P.B.	P.B.
MJ2-7	17,6	19,0

P.B. Bloqueo parcial que no alcanza un 50 % de inhibición.

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

Tabla 15: Afinidad de unión de mAb anti-IL-13 según se evalúa mediante Biacore

mAb	Afinidad (K _D , nM)	
	IL-13 humana wt	IL-13 humana variante
13C5.5	0,07	0,05

BAK502G9	2,10	0,17
mAb13.2	0,11	0,20
MJ2-7	1,14	0,79

En ensayos de unión a receptores tanto basados en superficie celular como basados en ELISA, 13C5.5 exhibe alta potencia en el bloqueo de la unión de IL-13 humana a IL-13R α 2 humano, con un valor de CI₅₀ entre 1 y 3 nM. Aunque tanto BAK502G9 como MJ2-7 también fueron capaces de reducir la señal de unión, sus potencias fueron mucho menores que las de 13C5.5 (véase la Tabla 14), al menos parcialmente debido a su menor afinidad por IL-13 humana wt (véase la Tabla 15). MAb13.2 fue notable al inhibir la unión de IL-13 a IL-13R α 2, consistente con su epítipo. Además, 13C5.5 pudo conseguir un 100 % inhibición en ambos ensayos a una concentración de 100 nM (o 15 ug/ml). Para la misma concentración, BAK502G9 y MJ2-7 exhibieron solo un 40 % y un 70 % de inhibición, respectivamente, en el ensayo de unión a receptores basado en superficie celular, y ambos exhibieron solo un 60 % de inhibición en el ensayo de unión a receptores basado en ELISA.

Para un mAb terapéutico con una semivida en suero entre 10 y 20 días en el hombre, la concentración en suero está normalmente entre 5-15 ug/ml, con un régimen de dosificación de 3 mpk IV o SC semanal o quincenal. Basándose en este cálculo, 13C5.5 es en la actualidad el único mAb anti-IL-13 que es probable que bloquee completamente (100 %) la unión de IL-13 humana a IL-13R α 2 *in vivo* como mAb terapéutico, a una concentración en suero de 100 nM (o 15 ug/ml), en un régimen de dosificación convencional de un anticuerpo monoclonal.

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

Se formaron mapas de los epítipos en IL-13 humana a los que se unen los mAb anti-IL-13 13C5, 13C5.5, 9C11 y 5G1 usando una técnica de escisión de epítipos, seguido de análisis peptídico con espectrometría de masas (MS). En la escisión de epítipos, la proteína se une en primer lugar a un mAb inmovilizado y a continuación se digiere con enzimas proteolíticas. Las regiones de los epítipos en la proteína se determinaron usando MS y MS/MS para identificar péptidos que contienen epítipos. Se suspendieron perlas de Sepharose activadas con CNBr (Amersham Biosciences, 10 mg/reacción) en 500 ul de HCl 0,1 M y se equilibraron durante 15 min. Las perlas se transfirieron a columnas de reacción compactas (USB Corporation) y se lavaron con HCl 0,1 M seguido de tampón de acoplamiento NaHCO₃ 0,1 M. Se añadió el mAb (100 ug) a la suspensión y se incubó durante 2 h con rotación lenta a temperatura ambiente. Se lavaron las perlas con el mAb unido covalentemente con tampón Tris-HCl 0,1 M a ~pH 8,0. El bloqueo de grupos sin reaccionar en las perlas de Sepharose de CNBr se consiguió por incubación durante 2 h con tampón Tris-HCl 0,1 M a ~pH 8,0. El mAb sin acoplar se retiró por lavado secuencial con dos tampones de diferente pH; 1) tampón de acetato de Na 0,1 M, NaCl 0,5 M a ~pH 4,0 y, 2) tampón de Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,5 M a ~pH 8,0. Las perlas se equilibraron en PBS -NaCl 0,14 M, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 4,3 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, a pH 7,2 y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente, con y sin IL-13. Después de lavar las perlas con PBS a ~pH 7,2, se retiró una alícuota de la suspensión para análisis por MALDI-TOF.

La proteína unida por afinidad se digirió con diferentes proteasas (proporción enzima:sustrato de 1:100-1:20) durante 12 h. Las proteasas usadas incluyeron: tripsina, GluC, quimiotripsina, carboxipeptidasa Y y aminopeptidasa M. Después de la proteólisis, las perlas se lavaron con 500 ul de tampón de digestión. Los últimos 100 ul de solución de lavado se conservaron como control. Se añadieron aproximadamente 100 ul de TFA al 2 % a las perlas y se recogieron. Las soluciones de lavado tanto de control como de ácido se concentraron en primer lugar hasta aproximadamente 20 ul al vacío. Los péptidos se desalaron a continuación con Ziptip C18. Las muestras se analizaron por MS MALDI-ToF, usando un sistema Voyager DE o Voyager DE-Pro. El análisis mediante nano-ESI-LC-MS/MS se llevó a cabo en un sistema Agilent 1100 Capillary HPLC con interfase a un sistema Sciex Q-Star Pulsar i MS.

En el estudio de los epítipos de 13C5, dos proteasas usadas en etapas secuenciales dieron los mejores resultados. Con quimiotripsina, se detectó un péptido principal consistente en los restos de aminoácido 100-130 de la SEQ ID NO: 1, lo que indica que puede contener el epítipo o epítipos. También se detectaron pequeñas cantidades de péptidos de los restos de aminoácido 103-130 y 104-130 de la SEQ ID NO: 1. Se usó aminopeptidasa M después de la digestión con quimiotripsina. El péptido principal detectado fue los restos de aminoácido 104-130 de la SEQ ID NO: 1, lo que sugiere que los 4 restos de aminoácido en N-terminal (80-83) no eran parte del epítipo. La digestión adicional con carboxipeptidasa Y dio como resultado la pérdida de afinidad. No se observó ningún péptido después de la digestión y el lavado. Todas las secuencias peptídicas se confirmaron usando nano-ESI-LC-MS/MS.

La formación de mapas de epítipos de 13C5 y 13C5.5 indicaron que su sitio o sitios de unión incluyeron la región de Hélice D C-terminal de IL-13 humana (restos VRDTK IEVAQ FVKDL LL HLKCLFRE GR, correspondientes a los aminoácidos 104-130 de la SEQ ID NO: 1). Se ha propuesto que la región de Hélice D C-terminal está implicada en las interacciones con el receptor de IL-13 (Zuegg *et al.* 2001 Immunol Cell Biol. 79:332-9).

Ejemplo 2.3: Cristalización de anti-IL-13 formando complejo con IL-13.

La parte Fab de 13C5.5 se hizo formar un complejo con IL-13 humana y se generaron cristales del complejo como sigue a continuación.

Ejemplo 2.3.1: Preparación y purificación del fragmento Fab de 13C5.5

Para preparar el fragmento Fab de 13C5.5, en primer lugar se concentró IgG de 13C5.5 en tampón PBS 0,15 M hasta 2 mg/ml usando un dispositivo de filtración centrífuga de corte de peso molecular (MWCO) de 10 kDa Ultrafree-15 Biomax (Millipore). Se lavó previamente una suspensión de gel de papaína (Pierce) y se cargó 2-3x con Tampón A (Na₂HPO₄ 20 mM, EDTA 10 mM, cisteína 20 mM) a una proporción en volumen de 1:1. A continuación, el anticuerpo concentrado se mezcló con suspensión de gel de papaína al 50 % y se incubó a 37 °C durante 24 horas con agitación vigorosa. La mezcla de anticuerpo/suspensión se centrifugó (Beckman 6KR) y el sobrenadante se cargó en Superdex 75 equilibrado previamente en PBS. Se eluyó un pico principal y se mezcló la proteína. Se preparó una columna de afinidad Sepharose 4 Fast Flow de Proteína A de 25 ml (Amersham Pharmacia) por lavado con 100 ml de PBS. Los fragmentos de anticuerpo mezclados se aplicaron a la columna afinidad (caudal de 2 ml/min). Las fracciones que contenían los fragmentos Fab de 13C5.5 (monitorizado por absorbancia UV a 280 nm) se recogieron en el flujo a través. Las fracciones que contenían una concentración de fragmento Fab de 13C5.5 mayor que 0,3 mg/ml (determinado por absorbancia UV a 280 nm) se mezclaron y congelaron a -80 °C. La pureza de la muestra se evaluó con SDS-PAGE.

Ejemplo 2.3.2: Preparación del complejo IL-13/Fab de 13C5.5

Se expresó IL-13 humana recombinante en un sistema de expresión de mamífero y se purificó posteriormente usando técnicas bien conocidas en la técnica. Se mezclaron IL-13 humana recombinante y proteína Fab de 13C5.5 a una proporción molar de 1:1 y se incubaron durante 1 hora a 4 °C. La muestra del complejo se cargó en una columna Superdex 200 equilibrada previamente (Tris 20 mM a pH 7,5, NaCl 150 mM) a 0,5 ml/min. El complejo se mezcló y se concentró hasta 24 mg/ml usando un dispositivo de filtración centrífuga de corte de peso molecular (MWCO) de 10 kDa Ultrafree-15 Biomax (Millipore) y se congeló a -80 °C. La pureza de la muestra se evaluó con SDS-PAGE.

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

Se descongeló solución de trabajo de complejo IL-13/13C5.5 congelada (-24 mg/ml) en hielo. El complejo (1,0 µl) se mezcló con 1,0 µl de solución de depósito (sulfato de amonio 1,75 M, MES 100 mM a pH 6,5, CaCl₂ 10 mM). La gota resultante se mezcló en un pocillo de gota sentada (placa de gota sentada CrysChem) sobre el depósito a aproximadamente 18 °C. Aparecieron cristales de tipo diamante en una semana.

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

Los cristales de complejo IL-13/Fab de 13C5.5 se recogieron usando un bucle de fibra en el licor madre + glicerol al 20 %. Los cristales se sometieron posteriormente a enfriado ultrarrápido por inmersión en nitrógeno líquido.

Ejemplo 2.3.5: Recogida de datos de difracción de rayos X del complejo IL-13/Fab de 13C5.5

Los datos de difracción de rayos X de los cristales de IL-13/Fab de 13C5.5 se recogieron en la línea de haz IMCA en Advanced Photon Source en Argonne, IL. Los cristales se mantuvieron a una temperatura de 100 K con un refrigerador Oxford Cryosystems Cryostream durante la recogida de datos. Se recogieron un total de 180 campos con un intervalo de oscilación de 1,0°. Los datos se procesaron con el conjunto de programas HKL2000 (Otwinowski y Minor, 1997). Después de determinar la orientación cristalina, los datos se integraron con DENZO y se escalaron y fusionaron con SCALEPACK, y se pusieron en una escala absoluta y redujeron las amplitudes del factor estructural con TRUNCATE (French y Wilson, 1978). Se asignaron un cinco por ciento de las reflexiones únicas, de forma aleatoria, en el conjunto "libre", para el cálculo del Factor R libre (R_{libre}) (Brunger, 1992); el 95 % restante de las reflexiones constituyó el conjunto de "trabajo", para el cálculo del factor R (R). Los datos de difracción de rayos X se resumen en la Tabla 16. Lo siguiente enumera la indexación para la forma cristalina: (1) IL-13/Fab de 13C5.5: grupo espacial P2(1)2(1)2(1), a = 163,578 Å, b = 163,318 Å, c = 228,627 Å, α = 90,0°, β = 90,0°, γ = 90,0°. La Tabla 17 enumera las estadísticas de difracción de rayos X para el conjunto de datos.

Tabla 16: Sumario de la información de la celdilla unitaria cristalográfica del complejo IL-13/Fab de 13C5.5

Crystal	Grupo espacial	a (Å)	b (Å)	c (Å)
1	P2(1)2(1)2(1)	163,578	163,318	228,627

Tabla 17: Sumario de estadísticas de datos de difracción de rayos X para el complejo IL-13/Fab de 13C5.5.

Cristal	Grupo espacial	Resolución (Å)	Reflexiones únicas	Rsim (%)*	Cobertura (%)*	Multiplicidad*
1	P2(1)2(1)2(1)	47,1-2,60	188,937	0,085 (0,562)	100,0 (100,0)	7,3 (7,3)
*La mayor resolución se muestra entre paréntesis.						

Ejemplo 2.3.6: Solución de reemplazo molecular y refinamiento de la estructura cristalina del complejo IL-13/Fab de 13C5.5

5 Se determinó una solución de reemplazo de máxima probabilidad molecular usando el programa PHASER (Read, 2001). Se solucionaron un total de seis monómeros de 13C5.5 a una resolución de 3,0 Å en el grupo espacial P2(1)2(1)2(1). El modelo buscado fue la estructura cristalina de Fab informada anteriormente (entrada del Banco de datos de proteínas 1BJ1; Muller *et al.* 1998). Se generaron coordenadas basándose en la solución de reemplazo

10 El refinamiento de la estructura cristalina del complejo IL-13/Fab de 13C5.5 comenzó con las coordenadas de la solución de reemplazo molecular, descritas anteriormente, en el grupo espacial P2(1)2(1)2(1). El refinamiento comenzó usando refinamiento de cuerpo rígido mediante el programa REFMAC disponible en el conjunto de programas CCP4 (Murshudov *et al.*, 1997, Collaborative Computational Project, 1994), que dio como resultado las siguientes estadísticas a 2,6 Å: R de un 40,00 % (Rlibre 39,00 %). Se observó de nuevo la densidad electrónica de IL-13. La construcción manual de seis monómeros de IL-13 se guió mediante la estructura de RMN de IL-13 pública 1IJZ (Moy *et al.*, 2001) usando el programa de gráficos molecular O (Jones *et al.*, 1991) y examen de los mapas de densidad electrónica 2Fo-Fc y Fo-Fc. Se usó el programa de refinamiento REFMAC (Murshudov *et al.*, 1997) para rondas iterativas de refinamiento restringido dando como resultado las siguientes estadísticas: R de un 25,8 % (Rlibre 30,5 %). Los resultados se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18: Sumario de las estadísticas de refinamiento cristalográfico del complejo IL-13/Fab de 13C5.5.

Cristal	Resolución (Å)	Rlibre (%)	R (%)
1	10,0-1,50	30,5	25,8

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

25 Se observan amplios contactos entre IL-13 humana y múltiples CDR de 13C5.5. El área superficial comprendida en la interfase anticuerpo-antígeno es de 1415,50 Å². Los contactos están comprendidos por enlace de hidrógeno crítico e interacciones hidrófobas que estabilizan la interfase. Los dos segmentos de secuencia mínima que comprenden la mayoría de los contactos de la interfase se encuentran en las hélices A y D de IL-13 (para la estructura de IL-13, véase el documento de publicación de Patente de Estados Unidos n.º 2003-0013851A1, incorporado en el presente documento por referencia). Estos contactos acoplan las CDR L1 y L3, y H2 y H3. Basándose en lo anterior, el intervalo de unión de 13C5.5 a epítipo comprende la región topográfica definida por Ser26-Asn38, Lys123-Arg130 de la SEQ ID NO: 1. Más preferentemente, el intervalo de unión de 13C5.5 a epítipo comprende la región topográfica definida por Arg30-Asn38, Lys123-Arg127 de la SEQ ID NO: 1.

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

La eficacia *in vivo* de los anticuerpos anti-hIL-13 se evaluó como sigue a continuación.

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

40 La eficacia de los anticuerpos anti-hIL-13 5G1, 13C5, y 13C5.5 se sometió a ensayo en un modelo de asma inducida por IL-13 humana en ratones. Los ratones se provocaron con IL-13 humana recombinante a una dosis de 1 µg en 50 µl de PBS estéril, suministrado a la traquea con un micropulverizador usando un laringoscopio de roedor para visualizar la abertura de la traquea. Se administraron un total de 2 dosis de IL-13 en los días 1 y 2 del estudio y se midió la hiperreactividad de las vías aéreas (AHR; Hoymann, H.G.; J Pharmacol Toxicol Methods. Enero-febrero de 2007; 55(1):16-26) así como mucosidad, quitinasa ácida de mamífero (AMCasa, Donnelly LE, Barnes PJ., 1: Trends Pharmacol Sci. Octubre de 2004; 25(10):509-11) y quimioquina de timo y activación regulada (TARC; Bisset LR, Schmid-Grendelmeier P., Curr Opin Pulm Med. Enero de 2005; 11(1):35-42) en el fluido de lavado broncoalveolar 50 24 h después de la provocación final. Se administraron dosis de anticuerpo de 100, 300 y 1000 µg mediante inyección intraperitoneal 1 día antes de la primera provocación con IL-13 y los resultados se resumen en la Tabla 19. El anticuerpo 5G1, que no bloquea la unión de IL-13 a IL-13Rα1 o IL-13Rα2, fue incapaz de neutralizar la bioactividad de IL-13 en este modelo *in vivo* con niveles comparables de AHR, AMCasa, y Muc5ac detectados en los animales tratados con 5G1 en comparación con los animales de control tratados con PBS. Por el contrario, el

anticuerpo 13C5 que bloquea la unión a ambos receptores $\alpha 1$ y $\alpha 2$, fue eficaz en la reducción de todos los parámetros. El tratamiento con IL-13 aumentó la resistencia de las vías respiratorias de 3,6 cm H₂O/ml/s a 5,7 cm H₂O/ml/s. El tratamiento con 13C5 (1000 μ g) redujo la resistencia de las vías respiratorias a 4,3 cm H₂O/ml/s. La hipersecreción de mucosidad, según se mide mediante los niveles de muc5ac, disminuyó de 356,5 unidades a un máximo de 211 U con el tratamiento con anticuerpo, lo que corresponde a un 40 % de reducción. Del mismo modo, los niveles de AMCasa se redujeron de 202 U a 68 U, lo que corresponde a un 66 % de reducción con una reducción comparable observada en los niveles de TARC (n = 10, p < 0,05, todas las dosis). El anticuerpo humanizado recombinante 13C5.5 demostró resultados similares en este modelo. IL-13 indujo un aumento en la resistencia de las vías respiratorias después de la provocación con 30 μ g/ml de metacolina de 3,9 a 5,5 cm H₂O/ml/s. El anticuerpo 13C5.5 inhibió la resistencia de las vías respiratorias a 4,1, 4,45, y 4,3 cm H₂O/ml/s a dosis de 100, 300 y 1000 μ g, respectivamente. La hipersecreción de mucosidad, según se mide mediante los niveles de muc5ac, se redujo de 247 U inducida por el tratamiento con IL-13 a 154, 30,2, y 11,1 U a dosis de 100, 300 y 1000 μ g de tratamiento con anticuerpo, respectivamente. Esto representa un 38, 88 y 96 % de inhibición de la producción de mucosidad con este anticuerpo. El tratamiento con IL-13 indujo una actividad de AMCasa de 130 U que se redujo a 113, 98, y 55 U por tratamiento con anticuerpo (dosis de 100, 300 y 1000 μ g, lo que representa un 14, 24 y 68 % de inhibición. Estos datos demuestran que 13C5 y el anticuerpo humanizado recombinante 13C5.5, que bloquean la unión de IL-13 tanto a IL-13R $\alpha 1$ como a $\alpha 2$, pueden neutralizar las respuestas inducidas por IL-13 de AHR, mucosidad, y producción de AMCasa en los pulmones mientras que los anticuerpos que no bloquean la unión de IL-13 a los receptores $\alpha 1$ y $\alpha 2$ no son eficaces en el bloqueo de todas estas respuestas biológicas.

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

Anticuerpo	Dosis	AHR		Mucosidad		AMCasa		TARC	
		Resistencia (SEM)	% de inhibición	Unidades de Muc5ac (SEM)	% de inhibición	Unidades arbitrarias (SEM)	% de inhibición	pg/ml (SEM)	% de inhibición
5G1	0	5,7 (0,38)	-0-	258 (37,2)	-0-	314,9 (26,1)	-0-	63,2 (14)	-0-
	100			315 (61)	-0-	225,2 (17,1)	9	111 (34,5)	-0-
	300			367,2 (63,2)	-0-	277 (21,3)	12	94,1 (24,2)	-0-
	1000	5,3 (0,35)	7	345,9 (61,6)	-0-	255,1 (18,6)	19	90,2 (17,1)	-0-
13C5	0	5,7 (0,38)		356,5 (15,8)	-0-	202,2 (18,8)	-0-	91,7 (41,7)	-0-
	100			246 (30,6)	31	146,6 (17,9)**	28	36 (10,3)	61
	300			243,2 (36,7)	32	97,2 (10,8)**	52	23,3 (4,1)	75
	1000	4,3 (0,77)*		2116 (28)***	41	68,3 (9,2)***	66	34,4 (12,1)	62
13C5.5	0	5,54 (0,53)	-0-	247,1 (96,4)	-0-	130,4 (20,6)	-0-	NT	
	100	4,16 (0,29)*	89	153,8 (67,6)	38	113,4 (18)	13	NT	
	300	4,45 (0,41)*	70	30,2 (15,2)**	88	98,9 (10,6)	24	NT	
	1000	4,3 (0,27)*	79	11,1 (5,8)***	96	55,5 (6,4)***	57	NT	

* p < 0,05, Ensayo T de Student

** p < 0,05, ANOVA, ensayo de Bonferroni

*** p < 0,01, ANOVA, ensayo de Bonferroni

En otro estudio, se compararon la eficacia de los anticuerpos anti-hIL-13 BAK502G9, MJ2-7 y 13C5.5 en el modelo de asma inducida por IL-13 humana en ratones. Se provocaron ratones con IL-13 humana recombinante a una dosis de 1 µg en 50 µl de PBS estéril, suministrada por vía intranasal con sedación ligera. Se administraron un total de 2 dosis de IL-13 en los días 1 y 2 del estudio y se midieron la hiperreactividad de las vías respiratorias, así como mucosidad, y AMCasa en el fluido de lavado broncoalveolar 24 h después de la provocación final. Se administraron dosis de anticuerpo de 1000 µg mediante inyección intraperitoneal 1 día antes de la primera provocación con IL-13. Los resultados del estudio se resumen en la Tabla 20. El anticuerpo 13C5.5, que bloquea la unión de IL-13 a los receptores tanto IL-13α1 como α2, fue eficaz en reducir significativamente todos los parámetros. El tratamiento con IL-13 aumentó la resistencia de las vías respiratorias después de la provocación con 30 mg/ml de metacolina de 4,2 cm H₂O/ml/s a 7,2 cm H₂O/ml/s. El tratamiento con 13C5.5 (1000 µg) redujo la resistencia de las vías respiratorias en un 86,8 % a 4,6 cm H₂O/ml/s. La hipersecreción de mucosidad que se midió mediante los niveles de muc5ac disminuyó de 768,2 unidades a 412,9 U con el tratamiento de anticuerpo, lo que corresponde a un 58,8 % de reducción. Del mismo modo, los niveles de AMCasa se redujeron de 316,5 U a 147 U, lo que corresponde a un 52 % de reducción (n = 10, p < 0,001). Tanto el anticuerpo BAK502G9 como el anticuerpo MJ2-7, que inhiben la unión de IL-13 a IL-13α1 pero no inhiben de forma eficaz la unión de IL-13 a IL-13α2 demostraron una capacidad comparable para neutralizar AHR inducida por IL-13 en este modelo. Los anticuerpos BAK502G9 y MJ2-7 solo inhibieron la resistencia de las vías respiratorias de 7,2 a 5,96 cm H₂O/ml/s y 5,93 cm H₂O/ml/s, respectivamente, lo que representa un 42 % y un 41,5 % de reducción en AHR. La hipersecreción de mucosidad que se midió mediante los niveles de muc5ac se redujo de 768,2 U inducida por el tratamiento con IL-13 a 627,8 y 380 U a dosis de 1000 µg de anticuerpo, lo que corresponde a un 23 % y un 64 % de inhibición por parte de los anticuerpos BAK502G9 o MJ2-7, respectivamente. El anticuerpo BAK502G9 fue menos eficaz en la inhibición de AMCasa en comparación con el anticuerpo 13C5.5 o MJ2-7. El tratamiento con IL-13 indujo una actividad de AMCasa de 316,5 U que se redujo a 279, y 169 U por tratamiento con el anticuerpo BAK502G9 o MJ2-7 (dosis de 1000 µg), lo que representa un 8 % y un 45 % de inhibición, respectivamente. Estos datos demuestran que el anticuerpo humanizado recombinante 13C5.5 que bloquea la unión de IL-13 tanto a IL-13α1 como a α2 es el más eficaz en neutralizar las respuestas inducidas por IL-13 de AHR, mucosidad, y producción de AMCasa en los pulmones mientras que los anticuerpos que bloquean la unión de IL-13 al receptor IL-13α2 con menor afinidad no son tan eficaces en el bloqueo de estas respuestas biológicas que contribuyen a la patogénesis del asma.

Tabla 20: Comparación de los anticuerpos 13C5.5, BAK502G9, y MJ2-7 en el modelo de asma inducida por IL-13.

Anticuerpo	Dosis (µg)	AHR		Mucosidad		AMCasa	
		Resistencia (SEM)	% de inhibición	Unidades de Muc5ac (SEM)	% de inhibición	Unidades arbitrarias (SEM)	% de inhibición
PBS	0	7,2 (0,77)	-0-	768,2 (108)	-0-	316,5 (43)	-0-
13C5.5	1000	4,6 (0,3)	86,8	412,9 (77,3)	46	147 (27)	54
BAK502G9	1000	5,9 (0,38)	41,7	627,8 (59,7)	18	279,4 (28,5)	12
MJ2-7	1000	5,9 (0,67)	42,5	380 (48,5)	50,5	169 (20)	47

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

Para determinar si las propiedades de bloqueo de receptores (en particular con respecto a IL-13Rα2) tienen impacto en la eficacia *in vivo* de los mAb en modelos de ratón de asma, se generó un panel de anticuerpos anti-IL-13 de ratón que exhibieron diferentes propiedades de bloqueo de receptores, según se determinó mediante ELISA de unión a receptores usando las proteínas mL-13Rα1/Fc y mL-13Rα2/Fc (R&D Systems) (véase la Tabla 21). Dado que el mAb anti-hIL-13 3H7 presenta reactividad cruzada con IL-13 de ratón, también se incluyen sus propiedades anti-mIL-13 en la Tabla 21. Las afinidades de unión de los anticuerpos por IL-13 de ratón se midieron usando el ensayo de BIACORE frente a IL-13 de ratón recombinante (R&D Systems), y se determinaron las potencias (CI₅₀) de los anticuerpos frente a IL-13 de ratón mediante el bioensayo de A-549 frente a IL-13 de ratón recombinante. Las secuencias de dominio variable de 51D9 y 48D3 se muestran en la Tabla 22.

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

Clon n.º	Isotipo	K _D (M)	CI ₅₀ (M)	Bloquea la unión de IL-13 de ratón a	
				mIL-13Rα1	mIL-13Rα2
3H7	IgG1 de ratón	1,12E-08	2,43E-9	Sí	Sí

51D9	IgG1k de rata	1,45E-10	3,43E-10	Sí	Sí
48D3	IgG1k de rata	1,05E-10	4,91 E-11	Sí	No
53F5	IgG1k de rata	2,82E-10	2,89E-10	No	No
74H2	IgG2ak de rata	3,92E-10	9,76E-10	No	No
25C7	IgG2aλ de rata	4,22E-10	6,09E-10	Sí	Sí
54D1	IgG1k de rata	3,40E-11	2,40E-11	Sí	Sí

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

SEQ ID NO:	Región de proteína	Secuencia
		123456789012345678901234567890
86	VH 51D9	QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKASGYTFT DYAMHWVKQAPGKGLKWMWINTYTGKPTY ADDFKGRFVFSLEASASTATLQISNLKNE TATYFCARAGRTEGTHYYAMDAWGQGISVT VSS
87	VL 51D9	DIVLTQSPVLAVSLGQRATISCRASQSVSI SSSDLMHWYQQRPGHQPKLLIYRTSNLVSG IPARFSGSGSGTDFTLTIIDPVQADDIAAYY CQQGRESPTWTFGGGKLELKR
88	VH 48D3	EVQLVESGGDLVQPGRSLKLSCAASGFTFS DYYMAWVRQAPTKGLEWVASISNDGISTYY RDSVKGRFTISREKAKSSLYLQMDSLRSED TATYYCTT WNWEGFFDY WGQGMVTVSA
89	VL 48D3	DIVLTQSPALAVSLGQRATISCRASQSVTI SRYNRMHWYQQRPGQPKLLIYRSSYLASG IPARFSGSGSGTDFTLTIYPVQADDIATYY CQQNRESPWTFGGGKLELNR

5 Para el estudio de eficacia *in vivo* en un modelo de asma murino, se adquirieron animales (ratones hembra Balb/c) en Taconic, se alojaron en Abbott Bioresearch Center, y se utilizaron a las 8-12 semanas de edad. Todos los protocolos se aprobaron por el IACUC. Los ratones se sensibilizaron con OVA (Sigma, se retiró la endotoxina de la ovoalbúmina usando DetoxiGel (Pierce) de acuerdo con el protocolo del fabricante y el material final contenía menos de 0,1 EU/mg de proteína) en los días 0 y 7 con una inyección intraperitoneal de 8 ug de OVA en 2 mg de alúmina (Pierce). En los días 14 y 16, los animales recibieron una provocación intranasal de 0,3 mg de OVA en 50 ml de PBS estéril. Se administraron los anticuerpos 51D9 y 48D3 (purificados a partir del sobrenadante de clones de hibridoma 10 51D9 y 48D3 de acuerdo con procedimientos convencionales, que contenían menos de 0,1 EU/mg de proteína y fueron negativos para patógenos de roedor mediante ensayo por PCR) en el día 13 en forma de inyección intraperitoneal individual en PBS estéril. Se administró dexametasona (Sigma) por vía oral una vez al día en los días 15 13-17 a una dosis de 3 mg/kg. Todos los puntos finales se analizaron en el día 17, 24 h después de la segunda provocación con OVA. Se evaluó la hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR) usando pletismografía de cuerpo entero. En resumen, se indujo un plano quirúrgico de anestesia con una inyección intraperitoneal de ketamina y xilacina. Se insertó quirúrgicamente una cánula traqueal entre el 3º y 4º anillos traqueales. La respiración espontánea se evitó mediante inyección intravenosa yugular de bromuro de pancuronio y los animales se colocaron en un pletismógrafo de cuerpo entero (Buxco) y se ventilaron mecánicamente con 0,2 ml de aire ambiente a 150 respiraciones por minuto con un ventilador de volumen controlado (Harvard Apparatus). La presión en el flujo 20 pulmonar y dentro del pletismógrafo se midió usando transductores y la resistencia pulmonar se calculó como presión/flujo usando el software Biosystem Xa. Se midieron la resistencia basal así como la resistencia después de provocación con metacolina (3, 10 y 30 mg/ml) que se administró con un nebulizador ultrasónico en línea. Tras la finalización del ensayo de función pulmonar, los pulmones se lavaron 4 veces con 0,5 ml de PBS estéril. Se analizó el líquido de lavado para TARC, AMCasa e infiltrado celular. Se recogió suero para la cuantificación de los niveles de 25 anticuerpos para la conclusión del estudio.

Los niveles de TARC murina se determinaron por ELISA (R&D) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La actividad de AMCasa se determinó en fluido de lavado broncoalveolar (BAL) (dilución 1 a 10 con BSA al 0,01 %, 75

citrato de sodio 30 mM, fosfato de sodio 60 mM, a pH 5,2, en presencia de 4-metilumbeliferil β -D-N,N'-diacetilquitobiósido 80 μ M. Las reacciones se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y se interrumpieron por adición de 100 μ l de glicina/NaOH 1 M a pH 10,6. La formación de productos se determinó por emisión de fluorescencia a 460 nm usando excitación a 385 nm en un fluorómetro Fluoroskan Ascent. Para evaluar hiperplasia de células caliciformes, los pulmones se inflaron con formalina tamponada neutra al 10 % a 22 cm de altura durante 15 minutos para conseguir un área consistente de superficie pulmonar. Se embebieron secciones en parafina, se cortaron y se tiñeron con ácido peryódico de Schiff (PAS). Se cuantificó el área de células PAS positivas a lo largo del bronquio principal del pulmón izquierdo usando el software ImagePro Plus. Los niveles de Muc5ac se determinaron por ELISA. Se reviste una placa de 96 pocillos con fluido BAL, se seca durante una noche, y a continuación se añade anticuerpo anti-Muc5ac biotinado y se detecta con estreptoavidina conjugada con HRP, seguido de escisión del sustrato colorimétrico TMB.

La contribución relativa de IL-13R α 1 y α 2 a la patogénesis del asma se sometió a ensayo en un modelo convencional de asma inducida por ovoalbúmina en ratones. Los anticuerpos que bloquearon la unión de IL-13 a los receptores tanto α 1 como α 2 (51D9, 54D1, y 3H7 con potencias de 340, 24, y 2430 pM, respectivamente) así como un anticuerpo que bloqueó la unión de IL-13 solo al receptor α 1 (48D3, potencia de 50 pM) se sometieron a ensayo por tratamiento de animales con los anticuerpos un día antes de las provocaciones locales con ovoalbúmina y los resultados se presentan en la Tabla 23. La provocación con OVA indujo aumentos en la resistencia pulmonar después de provocación con metacolina, hipersecreción de mucosidad según se midió por el aumento de niveles de Muc5ac en el fluido BAL así como aumento de tinción PAS positiva de células epiteliales mediante evaluación histológica, infiltración del pulmón con eosinófilos y linfocitos T, y producción de las proteínas AMCasa y TARC relacionadas con asma.

Los anticuerpos que bloquearon la unión de IL-13 tanto a IL-13R α 1 como a α 2 demostraron todos ellos eficacia y la potencia *in vivo* de los reactivos se cambió de acuerdo con su potencia *in vitro* medida. 51D9 se sometió a ensayo a dosis de 100, 300, y 1000 μ g/ratón. El tratamiento con OVA provocó un aumento en la resistencia de las vías respiratorias después de provocación con 30 mg/ml de metacolina a 6,2 cm H₂O/ml/s en comparación con 3,6 cm H₂O/ml/s en animales no asmáticos. El tratamiento de ratones con 51D9 previno completamente el aumento de la resistencia pulmonar con valores comparables a los observados en animales de control no asmáticos de 4,1, 4,0, y 3,5 cm H₂O/ml/s para dosis de 100, 300, y 1000 μ g, respectivamente (n = 8-10/grupo; p < 0,05). La cantidad de inhibición observada con 51D9 fue comparable a la conseguida con tratamiento de esteroides (3,3 cm H₂O/ml/s). El tratamiento con 51D9 también inhibió de forma dependiente a la dosis la hipersecreción de mucosidad de Muc5ac de 404 unidades a 55 U en animales tratados con 1000 μ g de 51D9. También se observó inhibición de hipersecreción de mucosidad mediante evaluación histológica de células epiteliales reactivas a PAS. El área porcentual de células positivas disminuyó de un 1,0 % a un 0,6 % y 0,5 % con una dosis de 300 y 1000 μ g de anticuerpo 51D9, respectivamente, lo que representa una disminución de un 47-65 % (n = 8, p < 0,01). El tratamiento con 51D9 también inhibió TARC y AMCasa. La provocación con OVA indujo 61 pg/ml de TARC que se redujo a 7,8 pg/ml con tratamiento de 1000 μ g de 51D9 (n = 10, p < 0,05). La provocación con OVA indujo 96 unidades arbitrarias de actividad de AMCasa que se redujo de forma dependiente de la dosis con 51D9 a 52, 45 y 21 U con 100, 300 y 1000 μ g de anticuerpo, respectivamente (n = 9-10, p < 0,01). 54D1, que tiene una potencia *in vitro* 10 veces mayor (24 pM) demostró inhibición de AHR a la dosis de 30 μ g con reducción de resistencia de las vías respiratorias de 6,58 cm H₂O/ml/s a 4,4 cm H₂O/ml/s e inhibición máxima observada con tratamiento con 300 μ g de anticuerpo para reducir la resistencia de las vías respiratorias a un valor de 3,65 cm H₂O/ml/s. Se observó una potencia similar en la inhibición de mucosidad, AMCasa, y producción de TARC. Un tercer anticuerpo 3H7, que tiene una potencia de 2,5 nM, aún demostró inhibición de AHR, mucosidad, y niveles de AMCasa, pero solo a una dosis de 1000 μ g de tratamiento de anticuerpo consistente con un desplazamiento de 10 veces en la potencia descrito en los bioensayos *in vitro*.

La eficacia de los anticuerpos que bloquean la unión de IL-13 solo a IL-13R α 1 se sometió a ensayo con el anticuerpo 48D3. Se trataron animales con 30, 100, 300, y 1000 μ g/ratón. La provocación con OVA indujo un aumento en la resistencia de las vías respiratorias a 5,69 cm H₂O/ml/s en comparación con 4,1 cm H₂O/ml/s en animales no asmáticos tratados con PBS. El tratamiento con 30 μ g de 48D3 no tuvo ningún efecto en la resistencia pulmonar inducida por OVA mientras que el tratamiento con 100, 300 y 1000 μ g de 48D3 inhibió los cambios inducidos por OVA en la resistencia pulmonar hasta un máximo de 4,4 cm H₂O/ml/s o a un - 80 % de los niveles del control de OVA (n = 10, p < 0,05). A diferencia de los efectos observados con 51D9, 48D3 no inhibió la hipersecreción de mucosidad inducida por OVA según se mide mediante ELISA de Muc5ac o células epiteliales reactivas a PAS. Se observó una reducción ligera pero estadísticamente significativa en la mucosidad (30 %) con el tratamiento con 48D3 a la dosis de 30 μ g, mientras que todas las demás dosis fueron equivalentes a los animales provocados con OVA. La cuantificación histológica de tinción PAS positiva demostró un 0,6 % en animales provocados con OVA frente a un 0,8 % en animales provocados con OVA y tratados con 1000 μ g de 48D3. En estos estudios, 48D3 inhibió la expresión de AMCasa inducida por OVA de 196 U detectada en animales tratados con OVA a 63, 90, 87, y 96 U a dosis de 30, 100, 300 y 1000 μ g, respectivamente. El análisis de niveles de anticuerpo indicó que fueron detectables niveles comparables de 48D3 y 51D9 tanto en suero como en fluido BAL del ratón tratado con anticuerpo. A pesar de la potencia 7 veces mayor del anticuerpo 48D3 en comparación con el anticuerpo 51D9, y la exposición equivalente de los dos anticuerpos, el anticuerpo 48D3 no fue capaz de inhibir AHR o AMCasa en la misma medida que el anticuerpo que bloqueó la unión de IL-13 a IL-13R α 1 y α 2 y fue incapaz de atenuar la producción de

mucosidad. Estos datos sugieren conjuntamente que IL-13R α 2 desempeña un papel principal en la mediación de hipersecreción de mucosidad inducida por OVA y que IL-13R α 2 contribuye a la regulación del fenotipo asmático *in vivo*.

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

Anticuerpo	Dosis	AHR		Mucosidad		AMCasa			TARC	
		Resistencia	% de inhibición	Unidades de Muc5ac	% de inhibición	Unidades arbitrarias	% de inhibición	pg/ml	% de inhibición	
54D1	0	6,585 (0,89)	-0-	573 (96,2)	-0-	112,1 (19,3)	-0-	141 (43,2)	-0-	
	30	4,486 (0,3)*	34	203 (22)*	65	30,8 (4,8)*	72,5	38,3 (10,6)*	63	
	100	4,2 (0,32)*	37	153 (44)*	74	14,4 (2,7)*	87,3	23,8 (7,3)*	83	
	300	3,65 (0,22)*	45	77,3 (6,9)*	87	11,0 (1,5)*	90,2	17,2(4,5)*	88	
	1000	3,58 (0,34)*	46	79 (8,5)*	87	10,4 (1,2)*	90,1	20(12,3)*	86	
51D9	0	6,24 (1,4)	-0-	409,2 (36,4)	-0-	97,6 (11)	-0-	61,8 (12,1)*	-0-	
	100	4,13 (0,91)*	33,8	188,8 (24,8)*	54	52,9 (10,9)*	46	25,2 (12,8)*	60	
	300	4,06 (0,32)*	34,8	180,8 (32,4)*	56	45,8 (13,7)*	53	23,1 (12,9)*	62	
	1000	3,57 (0,78)*	43	55,1 (23,4)*	87	21,2 (7,8)*	79	7,8 (4,2)*	87	
3H7	0	7,9(1,2)	-0-	965 (59,9)	-0-	129,7 (17,2)	-0-	173,9 (32,0)	-0-	
	1000	6,02(0,31)*	24	587 (48,4)*	40	78,18 (12,3)*	40	77,3 (18,5)*	56	
48D3	0	5,69 (0,42)	-0-	666,7 (74,7)	-0-	196,6 (35,5)	-0-	NT		
	30	5,288 (0,43)	8,1	445,4 (33,8)*	34	63,1 (18,2)*	68	NT		
	100	4,5 (0,42)*	19,5	567,5 (62,6)	15	90,4 (15,4)*	54	NT		
	300	5,25 (0,42)	14,1	606,3 (71,2)	9	87,4 (19,6)*	55	NT		
	1000	4,4 (0,33)*	20,7	534,9 (31)	20	96,5 (10,4)*	51	NT		

* indica p < 0,05, ANOVA

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Abbott Laboratories, inc. wu, chengbin
- 5 <120> Proteínas de unión a interleuquina-13
- <130> 8370 US P1
- <160> 94
- 10 <170> PatentIn versión 3.4
- <210> 1
- <211> 132
- 15 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1

```

Met Ala Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly
 1           5           10
Phe Ala Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu
          20           25
Ile Glu Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys
          35           40           45
Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys
          50           55           60
Ala Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu
 65           70           75           80
Lys Thr Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala
          85           90           95
Gly Gln Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala
          100          105          110
Gln Phe Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu
          115          120          125
Gly Arg Phe Asn
          130

```

- 20
- <210> 2
- <211> 330
- <212> PRT
- 25 <213> *Homo sapiens*
- <400> 2

ES 2 817 756 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 817 756 T3

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

- <210> 3
- <211> 330
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 3

ES 2 817 756 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 817 756 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 4
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 4

5

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 817 756 T3

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

5
 <210> 5
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 5

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 1 5 10 15
 Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 35 40 45
 Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 50 55 60
 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 65 70 75 80
 His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 85 90 95
 Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105

10
 <210> 6
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 6

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30

20
 <210> 7
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 7

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

ES 2 817 756 T3

5 <210> 8
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 8

Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15

Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

10 <210> 9
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 9

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

20 <210> 10
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 10

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

30 <210> 11
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 11

Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

40 <210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 12

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

45

ES 2 817 756 T3

5 <210> 13
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 13

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser
 20 25 30

10 <210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 14

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His
 1 5 10 15

20 <210> 15
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 15

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Val Leu Thr
 1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

30 <210> 16
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 16

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Leu Tyr Gly Phe Ser Leu Ser
 20 25 30

40 <210> 17
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 17

ES 2 817 756 T3

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
 1 5 10

5 <210> 18
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 18

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
 1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

15 <210> 19
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 19

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

20 <210> 20
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 20

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

30 <210> 21
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 21

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

40 <210> 22
 <211> 32

ES 2 817 756 T3

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 22

5

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 23

15

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 24
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20

<400> 24

25

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 25
<211> 32
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

30

<400> 25

Gly Val Pro Ser Arg Ile Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

35

<210> 26
<211> 23
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

40

<400> 26

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
 20

5 <210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 27

Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

10 <210> 28
 <211> 32
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 28

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

20 <210> 29
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 29

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys
 20

30 <210> 30
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 30

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

40 <210> 31
 <211> 11

ES 2 817 756 T3

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 31

5

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 32
<211> 116
<212> PRT

10

<213> *Mus musculus*

<400> 32

15

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Trp Ile His Trp Val Asn Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 33
<211> 113
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

20

<400> 33

25

ES 2 817 756 T3

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Lys Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ala Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln His
85 90 95

Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Asn Leu Glu Leu Lys
100 105 110

Arg

- <210> 34
- <211> 116
- <212> PRT
- <213> *Mus musculus*
- <400> 34

ES 2 817 756 T3

Gln Val Arg Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

Trp Ile His Trp Val Asn Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
 115

- <210> 35
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> *Mus musculus*
- <400> 35

5

ES 2 817 756 T3

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Thr Gln Thr Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Asn
85 90 95

Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

Arg

5

- <210> 36
- <211> 120
- <212> PRT
- <213> *Mus musculus*
- <400> 36

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Asp Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Asn Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly His Ile Ala Pro Gly Ser Gly Glu Thr Tyr Asp Asn Glu Met Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Lys Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Ile His Leu Ser Ser Leu Ser Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Ser Phe Thr Phe Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 37
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 37

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Page 13

10

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

5 <210> 38
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 38

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

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

Trp Ile Asn Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly His Ile Ala Pro Gly Ser Gly Glu Thr Tyr Asp Asn Glu Met Phe
 50 55 60

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

Ile His Leu Ser Ser Leu Ser Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 39
 <211> 123
 <212> PRT
 15 <213> *Mus musculus*
 <400> 39

ES 2 817 756 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Tyr Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ser Arg Trp Arg Thr Ser Tyr Phe Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

5
 <210> 40
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 40

ES 2 817 756 T3

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 His Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 41
 <211> 123
 5 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 41

ES 2 817 756 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Val Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Asn Tyr Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ser Arg Trp Arg Thr Ser Tyr Phe Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

5
 <210> 42
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 42

ES 2 817 756 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Gly Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Glu Thr Met
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Gly Ser Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

100

105

110

5

<210> 43
<211> 113
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

10

<400> 43

ES 2 817 756 T3

Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30
Asp Gly Glu Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95
Thr His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

5 <210> 44
<211> 117
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
<400> 44

ES 2 817 756 T3

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Asn Ile Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu His Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Gly Tyr Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 45
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 45

ES 2 817 756 T3

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Asn Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

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

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

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

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys Arg

- <210> 46
- <211> 123
- <212> PRT
- <213> *Mus musculus*
- <400> 46

5

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

10

ES 2 817 756 T3

Asp Met Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Ser Gln Val
 65 70 75 80
 Phe Leu Met Leu Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Thr Val Ser Ser Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 47
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 47

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Ala Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Phe Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Arg Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

10 <210> 48
 <211> 123
 <212> PRT
 15 <213> *Mus musculus*
 <400> 48

ES 2 817 756 T3

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Asp Met Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Asp Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Ser Gln Val
 65 70 75 80
 Phe Leu Met Leu Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Ile Val Ser Ser Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 49
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 49

ES 2 817 756 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Ala Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

- 00

5

<210> 50
<211> 123
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 50

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Asp Leu Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Ser Gln Val
 65 70 75 80
 Phe Leu Met Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Ile Gly Ser Ser Gly Tyr Ile Tyr Tyr Glu Met Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 51
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 51

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Asp Gln
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Leu

10

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

5 <210> 52
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 52

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Phe Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

Tyr Met Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asn Thr Ile Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Gly Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

10
 15 <210> 53
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 53

ES 2 817 756 T3

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Ile Gly Thr Val Thr Thr Asn
 20 25 30
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
 35 40 45
 Leu Ile Gly Ser Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80
 Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95
 His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 54
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 54

5

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Met Ile Trp Gly Asp Glu Arg Ile Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Gly Arg Tyr Phe Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

10

ES 2 817 756 T3

5 <210> 55
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 55

Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Thr Val Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Lys Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Ile Ile Asp
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
 85 90 95
 Glu Gly Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

10 <210> 56
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 15 <400> 56

ES 2 817 756 T3

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Ser
 20 25 30
 Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Asn Ser Val Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 57
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 57

Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Phe Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Phe Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
 85 90 95
 Glu Asn Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

10

ES 2 817 756 T3

5 <210> 58
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 58

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Glu Phe Ser Leu Thr Gly Ser
 20 25 30
 Ser Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

10 <210> 59
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 15 <400> 59

ES 2 817 756 T3

Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Ala Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
 85 90 95
 Glu Asn Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 60
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 60

5

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Asn Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Leu Ile Trp Gly Asp Gly Asn Thr Ala Phe Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Ile Lys Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

10

ES 2 817 756 T3

100

105

-

110

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

5

<210> 61
<211> 112
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
<400> 61

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

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

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

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

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

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

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

10

15

<210> 62
<211> 118
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
<400> 62

ES 2 817 756 T3

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly His
 20 25 30
 Asn Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Asn Thr Asp Phe Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Ile Lys Phe Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

5
 <210> 63
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 63

ES 2 817 756 T3

His Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Thr Val Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Ser Ser Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Lys Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
 85 90 95
 Glu Gly Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Ser Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

5 <210> 64
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

 10 <220>
 <223> CDR de IL-13 de consenso

 15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> X = T, D, G, S

 20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> X = M, S, Y, L, H

 25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> X = G, W, Y, A, S, N

 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> X = V, I, M

 35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> X = D, H, S, Y, N, G

 <400> 64

Xaa Ser Asp Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

5 <210> 65
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> CDR de IL-13 de consenso

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> X = M, E, H, R, S, G, L

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> X = I o ausente

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> X = H, Y, A, D, S, W

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> X = P, S, W, G

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> X = S, G, E, D

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> X = D, G, S, E, N

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> X = S, Y, G

50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> X = E, N, Y, V, R

55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> X = T, I, K

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> X = R, Y, I, D, A

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)

<223> X = L, Y, D, F
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 5 <222> (12)..(12)
 <223> X = N, P, S, D
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <222> (13)..(13)
 <223> X = Q, E, D, P, S
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 15 <222> (14)..(14)
 <223> X = K, M, S, T, A, V
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 20 <222> (15)..(15)
 <223> X = F, L, V, M
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 25 <222> (16)..(16)
 <223> X = K, R, Q
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 30 <222> (17)..(17)
 <223> X = D, G, S
 <400> 65

Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

35 **Xaa**
 <210> 66
 <211> 14
 <212> PRT
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> CDR de IL-13 de consenso
 45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> X = W, T, G, Y, D, I
 50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> X = R, A, S, G, V
 55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> X = T, F, Y, S
 60 <220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> X = S, T, Y
 5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> X = Y, F, G
 10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> X = F, Y
 15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> X = S, Y, I, F
 20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> X = D, L, Y, P
 25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> X = Y, A, P, E
 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> X = F, M, S, L, I
 35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> X = D, V, N, K
 40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> X = Y, F
 45 <400> 66

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Gly Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

<210> 67
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> CDR de IL-13 de consenso
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 60 <223> X = K, R

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> X = S, A

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> X = S, T

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> X = Q, K, I

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> X = N, S, T, G, E

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> X = L, T, S

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> X = L, Q, V

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> X = Y, N, H, D, T

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> X = S, I, T

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> X = S, D, N, H, Y

50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> X = N, G

55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> X = K, F, N, E, S

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> X = N, T, S

65 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> X = Y, F

5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> X = L, A, M

10
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> X = A, D, E, H, N

<400> 67

Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa

15
 <210> 68
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

20
 <220>
 <223> CDR de IL-13 de consenso

25
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> X = L, S, K, T, W, Y

30
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> X = V, T, A

35
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> X = S, N

40
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> X = N, K, T, R, M

45
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> X = R, L, K

50
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> X = F, D, E, H, A, P

55
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> X = S, P, R

<400> 68

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

- 5 <210> 69
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> CDR de IL-13 de consenso

- 15 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (1)..(1)
- <223> X = F, W, Q, A

- 20 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (2)..(2)
- <223> X = Q, L

- 25 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (3)..(3)
- <223> X = H, G, Y, W, N

- 30 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (4)..(4)
- <223> X = N, S, T, Y, L

- 35 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (5)..(5)
- <223> X = Y, T, S, E, H

- 40 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (6)..(6)
- <223> X = L, V, F, Y, N, G, D, P

- 45 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (7)..(7)
- <223> X = P, H

- 50 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (8)..(8)
- <223> X = L, F, Y, W, R

- 55 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (9)..(9)
- <223> X = T, V

- <400> 69

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

- 60 <210> 70

ES 2 817 756 T3

<211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> región variable de 5G1.1 de cadena pesada humanizada
 <400> 70

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Asn Tyr Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Arg Gly Lys Ala Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Trp Arg Thr Ser Tyr Phe Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 71
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> región variable de 5G1.1 de cadena ligera humanizada

20 <400> 71

ES 2 817 756 T3

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 His Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

- <210> 72
- <211> 123
- 5 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 10 <223> región variable de 5G1.2 de cadena pesada humanizada
- <400> 72

ES 2 817 756 T3

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Asn Tyr Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ser Arg Trp Arg Thr Ser Tyr Phe Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 73
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> región variable de 5G1.2 de cadena ligera humanizada
 <400> 73

ES 2 817 756 T3

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 His Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg

- <210> 74
- <211> 123
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> región variable de 5G1.3 de cadena pesada humanizada
- <400> 74

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Asn Tyr Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

ES 2 817 756 T3

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

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

Ser Arg Trp Arg Thr Ser Tyr Phe Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

5 <210> 75
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> región variable de 5G1.3 de cadena ligera humanizada
<400> 75

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

15 <210> 76
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> región variable de 13C5.1 de cadena pesada humanizada
<400> 76

ES 2 817 756 T3

Glu Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Asp Met Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Thr Val Ser Ser Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 77
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> región variable de 13C5.1 de cadena ligera humanizada

10

<400> 77

ES 2 817 756 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Val Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

Page 30

- 5 <210> 78
- <211> 123
- <212> PRT
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> región variable de 13C5.2 de cadena pesada humanizada

- <400> 78

ES 2 817 756 T3

Glu Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Asp Met Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Thr Val Ser Ser Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 79
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> región variable de 13C5.2 de cadena ligera humanizada

10

<400> 79

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Val Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Phe Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 60 60

ES 2 817 756 T3

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

5
<210> 80
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

10
<220>
<223> región variable de 13C5.5 de cadena pesada humanizada
<400> 80

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Leu Tyr Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Asp Met Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Lys Leu Thr Ser Val Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Thr Val Ser Ser Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

15
<210> 81
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

20
<220>
<223> región variable de 13C5.5 de cadena ligera humanizada

25
<400> 81

ES 2 817 756 T3

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Thr Ala Thr Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

- <210> 83
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> región variable de 9C11.1 de cadena ligera humanizada
- <400> 83

ES 2 817 756 T3

Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Thr Gln Thr Leu Leu Asn Ser
 20 25
 Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Asn
 85 90 95
 Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 84
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> región variable de 9C11.2 de cadena pesada humanizada

10

<400> 84

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Asn Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe

ES 2 817 756 T3

<400> 86

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Ala Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Lys Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Glu Ala Ser Ala Ser Thr Ala Thr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ala Gly Arg Thr Glu Gly Thr His Tyr Tyr Ala Met Asp Ala
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 87
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> *Rattus* sp.

10 <400> 87

ES 2 817 756 T3

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Val Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ile Ser Ser
 20 25 30
 Ser Asp Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly His Gln Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Ala Arg
 50 55 60
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro
 65 70 75 80
 Val Gln Ala Asp Asp Ile Ala Ala Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Arg Glu
 85 90 95
 Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105 110

<210> 88
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> *Rattus* sp.
 <400> 88

5

ES 2 817 756 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Thr Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Ser Asn Asp Gly Ile Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Lys Ala Lys Ser Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Thr Trp Asn Trp Glu Phe Gly Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Val Met Val Thr Val Ser Ala
 115

5
 <210> 89
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> *Rattus* sp.
 <400> 89

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ile Ser Arg
 20 25 30
 Tyr Asn Arg Met His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Gln Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Tyr Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
 50 55 60
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Tyr Pro
 65 70 75 80

10

ES 2 817 756 T3

Val Gln Ala Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Arg Glu
 85 90 95

Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Asn Arg
 100 105 110

5 <210> 90
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> región variable de 5G1.5 de cadena pesada humanizada
 <400> 90

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

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

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

Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Asn Tyr Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ser Arg Trp Arg Thr Ser Tyr Phe Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

15 <210> 91
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> 5G1.5 de cadena ligera humanizada
 <400> 91

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Page 47

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

5 <210> 92
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> región variable de 13C5.5L2E de cadena ligera humanizada

<400> 92

ES 2 817 756 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Phe Tyr Thr Ser Met Lys Pro Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 93
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> 13C5.5L3F de cadena ligera humanizada

10

<400> 93

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Phe Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Leu Thr Pro Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

ES 2 817 756 T3

<210> 94
 <211> 107
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> región variable de 13C5.5L2EL3F de cadena ligera humanizada
 10 <400> 94

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

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

 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

 Phe Tyr Thr Ser Met Lys Pro Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Leu Thr Pro Pro Leu
 85 90 95

 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-IL-13 recombinante, o fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde dicho anticuerpo anti-IL-13 recombinante, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende:
- 5 (a) dos dominios variables, en donde un dominio variable comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y el otro dominio variable comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 81;
- (b) una región constante de cadena pesada de IgG1 humana que comprende una región bisagra que comprende un cambio de leucina a alanina en la posición 234 (numeración EU) y un cambio de leucina a alanina en la
- 10 posición 235 (numeración EU); y
- (c) una región constante de cadena ligera kappa humana.
2. El anticuerpo anti-IL-13 recombinante, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo anti-IL-13 recombinante, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende cuatro
- 15 dominios variables, en donde cada uno de dos de los dominios variables comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y cada uno de los otros dos de los dominios variables comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 81.
3. El anticuerpo anti-IL-13 recombinante, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1 o 2, en donde dicho anticuerpo anti-IL-13 recombinante, o fragmento de unión a antígeno del mismo, es capaz de unirse a
- 20 IL-13 humana.
4. El anticuerpo anti-IL-13 recombinante, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicho anticuerpo anti-IL-13 recombinante, o fragmento de unión a antígeno del
- 25 mismo, es capaz de bloquear la unión de IL-13 a IL-13R α 1 y a IL-13R α 2.
5. El anticuerpo anti-IL-13 recombinante, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicho anticuerpo anti-IL-13 recombinante, o fragmento de unión a antígeno del
- 30 mismo, es capaz de unirse a una variante de IL-13 humana en la que un resto de arginina en la posición 130 de SEQ ID NO: 1 está reemplazado con un resto de glutamina.
6. El anticuerpo anti-IL-13 recombinante, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho anticuerpo anti-IL-13 recombinante, o fragmento de unión a antígeno del
- 35 mismo, tiene una constante de velocidad de asociación (K_{on}) para dicha IL-13 seleccionada entre el grupo que consiste en: al menos aproximadamente $10^2 M^{-1}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^3 M^{-1}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^4 M^{-1}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^5 M^{-1}s^{-1}$; y al menos aproximadamente $10^6 M^{-1}s^{-1}$; según se mide mediante resonancia plasmónica superficial;
- o
- dicho anticuerpo anti-IL-13 recombinante, o fragmento de unión a antígeno del mismo, tiene una constante de
- 40 velocidad de disociación (K_{off}) para dicha diana seleccionada entre el grupo que consiste en: como máximo aproximadamente $10^{-3} s^{-1}$; como máximo aproximadamente $10^{-4} s^{-1}$; como máximo aproximadamente $10^{-5} s^{-1}$; y como máximo aproximadamente $10^{-6} s^{-1}$, según se mide mediante resonancia plasmónica superficial;
- o
- dicho anticuerpo anti-IL-13 recombinante, o fragmento de unión a antígeno del mismo, tiene una constante de
- 45 disociación (K_D) para dicha diana seleccionada entre el grupo que consiste en: como máximo aproximadamente $10^{-7} M$; como máximo aproximadamente $10^{-8} M$; como máximo aproximadamente $10^{-9} M$; como máximo aproximadamente $10^{-10} M$; como máximo aproximadamente $10^{-11} M$; como máximo aproximadamente $10^{-12} M$; y como máximo $10^{-13} M$.
7. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-IL-13 recombinante, o fragmento de unión a
- 50 antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en donde dicho vehículo farmacéuticamente aceptable funciona como adyuvante útil para aumentar la absorción o dispersión de dicha proteína de unión.
- 55 9. La composición farmacéutica de la reivindicación 7 u 8, que comprende además al menos un agente adicional, en donde dicho agente se selecciona entre el grupo que consiste en un agente terapéutico, un agente de formación de imágenes, un agente citotóxico, un inhibidor de la angiogénesis, un inhibidor de quinasa, un bloqueador de moléculas de coestimulación, un bloqueador de moléculas de adhesión, un anticuerpo anti-citoquina o fragmento
- 60 funcional del mismo, metotrexato, una ciclosporina, una rapamicina, un FK506, una marca o indicador detectable, un antagonista de TNF, un antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano, un antipsoriásico, un corticosteroide, un esteroide anabólico, una eritropoyetina, una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona de crecimiento, un fármaco de reemplazo hormonal, un
- 65 compuesto radiofarmacéutico, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, una medicación para el asma, un beta agonista, un esteroide inhalado, un esteroide oral, una epinefrina o análogo, una citoquina, y un antagonista de

citoquina.

- 5 10. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en donde dicha composición farmacéutica se administra mediante al menos un modo seleccionado entre el grupo que consiste en parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intracelular, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocárdico, intraóseo, intrapélvico, intrapericardiaco, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretiniano, intraespinal, intrasnovial, intratorácico, intrauterino, intravesical, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, y transdérmico.
- 10 11. Un anticuerpo anti-IL-13 recombinante, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o una composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 7-10 para su uso en reducir la actividad de IL-13 humana en un sujeto humano que padece un trastorno en el que es perjudicial la actividad de IL-13, en donde dicho trastorno se selecciona entre el grupo que consiste en trastornos respiratorios; asma; asma alérgica y no alérgica; asma debida a infección; asma debida a infección con virus respiratorio sincitial (RSV); enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD); otras afecciones que implican inflamación de las vías respiratorias; eosinofilia; fibrosis y exceso de producción de mucosidad; fibrosis quística; fibrosis pulmonar; trastornos atópicos; dermatitis atópica; urticaria; eccema; rinitis alérgica; enterogastritis alérgica; afecciones inflamatorias y/o autoinmunes de la piel; afecciones inflamatorias y/o autoinmunes de órganos gastrointestinales; enfermedades intestinales inflamatorias (IBD); colitis ulcerosa; enfermedad de Crohn; afecciones inflamatorias y/o autoinmunes del hígado; cirrosis hepática; fibrosis hepática; fibrosis hepática causada por virus de la hepatitis B y/o C; esclerodermia; tumores o cánceres; carcinoma hepatocelular; glioblastoma; linfoma; linfoma de Hodgkin; infecciones virales; infección por HTLV-1; supresión de expresión de respuestas inmunitarias protectoras de tipo 1; y supresión de expresión de respuestas inmunitarias protectoras de tipo 1 durante vacunación.
- 15 12. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo anti-IL-13 recombinante, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 20 13. Un vector que comprende un ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 12.
- 25 14. El vector de la reivindicación 13, en donde dicho vector es un vector seleccionado entre el grupo que consiste en ADNpc, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV, y pBJ.
- 30 15. Una célula hospedadora que comprende un vector de la reivindicación 13 o 14.
- 35 16. La célula hospedadora de la reivindicación 15, en donde dicha célula hospedadora es una célula procariota o una célula eucariota.
- 40 17. La célula hospedadora de la reivindicación 16, en donde dicha célula eucariota se selecciona entre el grupo que consiste en una célula protista, una célula animal, una célula vegetal, y una célula fúngica.
- 45 18. La célula hospedadora de la reivindicación 17, en donde dicha célula eucariota es una célula animal seleccionada entre el grupo que consiste en una célula de mamífero, una célula aviar, y una célula de insecto.
- 50 19. La célula hospedadora de la reivindicación 16, en donde dicha célula hospedadora es una célula eucariota seleccionada entre el grupo que consiste en: una célula CHO, una célula COS, y una célula de levadura.
20. Un método para producir una proteína capaz de unirse a IL-13 que comprende cultivar una célula hospedadora de una cualquiera de las reivindicaciones 15-19 en medio de cultivo en condiciones suficientes para producir una proteína de unión capaz de unirse a IL-13.
21. Una proteína de unión capaz de unirse a IL-13 producida de acuerdo con el método de la reivindicación 20.