



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 975 006**

⑮ Int. Cl.:
C07K 16/28
(2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2009 E 20162800 (5)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.01.2024 EP 3715372**

⑮ Título: **Anticuerpos humanos de alta afinidad contra el receptor humano de IL-4**

⑯ Prioridad:
29.10.2008 US 26030708

⑯ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.07.2024

⑮ Titular/es:
REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591-6706, US

⑯ Inventor/es:
PAPADOPOULOS, NICHOLAS J;
FAIRHURST, JEANETTE L;
HUANG, TAMMY T y
MARTIN, JOEL H

⑯ Agente/Representante:
PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 975 006 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

Anticuerpos humanos de alta afinidad contra el receptor humano de IL-4

5 **Antecedentes**

- La interleucina-4 (IL-4, conocida también como factor estimulante de células B o BSF-1) se caracterizó originalmente por su capacidad para estimular la proliferación de células B en respuesta a bajas concentraciones de anticuerpos dirigidos contra inmunoglobulinas de superficie. Se ha demostrado que la IL-4 posee un amplio espectro de 10 actividades biológicas, incluyendo estimulación del crecimiento de células T, mastocitos, granulocitos, megacariocitos y eritrocitos. La IL-4 induce la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II en células B en reposo, y potencia la secreción de los isótipos IgE e IgG1 por células B estimuladas.
- 15 Las actividades biológicas de la IL-4 están mediadas por receptores de la superficie celular específicos de IL-4. Por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos No. 5.599.905, 5.767.065 y 5.840.869, se describe el receptor alfa humano de IL-4 (hIL-4R) (SEQ ID NO: 274). En las patentes de Estados Unidos No 5.717.072 y 7.186.809 se describen anticuerpos dirigidos contra el hIL-4R.
- 20 Para producir anticuerpos útiles como agentes terapéuticos en seres humanos los procedimientos incluyen generar anticuerpos químicos y anticuerpos humanizados (véase, por ejemplo, el documento US 6.949.245). Véanse, por ejemplo, los documentos WO 94/02602 y US 6.596.541, que describen procedimientos de generación de ratones transgénicos no humanos capaces de producir anticuerpos humanos.
- 25 En las patentes de Estados Unidos No 5.714.146; 5.985.280; y 6.716.587 se describen procedimientos para el uso de anticuerpos dirigidos contra el hIL-4R.

También se mencionan los siguientes documentos:

- 30 • WO 2008/054606 A2 que se refiere a anticuerpos específicos para IL4R humano y usos médicos de los mismos;
- WO 01/92340 A2 que se refiere a antagonistas de IL-4 y composiciones de los mismos; y
- WO 2005/047331 A2 que se refiere a anticuerpos que se unen al IL-4R.

Breve sumario de la invención

- 35 La presente invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención proporciona un vector de expresión recombinante que comprende:

40 una primera molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada (HCVR) de un anticuerpo que se une al receptor humano de interleucina-4 (IL-4R), en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la HCVR tiene al menos un 95 % de homología con la SEQ ID NO: 161, en donde la HCVR codificado comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 162; y

45 una segunda molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena ligera (LCVR) de un anticuerpo que se une al IL-4R humano, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la LCVR tiene al menos un 95 % de homología con la SEQ ID NO: 163, en donde la LCVR codificado comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 164.

50 La presente invención proporciona además una célula hospedadora que comprende un vector de expresión recombinante de la presente invención.

La presente invención también proporciona una célula hospedadora que comprende:

- 55 - una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 162 unida operativamente a ADN que codifica una región constante de cadena pesada humana, en donde la HCVR codificada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 162; y
- una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 164 unida operativamente a ADN que codifica una región constante de cadena ligera humana, en donde la LCVR codificada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 164,

en donde la célula expresa un anticuerpo completamente humano que se une al receptor humano de interleucina-4 (IL-4R).

65 La presente invención también proporciona un método para producir un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno

del mismo que se une específicamente a IL-4R humano, comprendiendo el método cultivar una célula hospedadora de la presente invención en condiciones en las que se expresa el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y recuperar el anticuerpo completamente humano.

5 En un aspecto, los anticuerpos codificados por un vector o una célula hospedadora de la invención son anticuerpos humanos, preferentemente anticuerpos humanos recombinantes, que se unen específicamente al receptor humano de interleucina-4 (hIL-4R). Los anticuerpos humanos se caracterizan por unirse al hIL-4R con una alta afinidad y por la capacidad para neutralizar la actividad de la hIL-4. En realizaciones específicas, los anticuerpos humanos pueden bloquear el complejo hIL-13/hIL-13R1 uniéndose al hIL-4R, y por tanto inhiben la señalización por la hIL-13. Los 10 anticuerpos pueden ser de longitud completa (por ejemplo, un anticuerpo IgG1 o IgG4) o pueden comprender solo una parte de unión a antígeno (por ejemplo, un fragmento Fab, F(ab')₂ o scFv), y pueden modificarse para efectuar funcionalidades, por ejemplo, eliminar funciones efectoras residuales (Reddy et al. (2000) J. Immunol. 164:1925-1933).

15 En una realización general, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, codificado por un vector o una célula hospedadora de la presente invención se une específicamente al hIL-4R (SEQ ID NO: 274) con una K_D de aproximadamente 300 pM o menor, medida por resonancia de plasmón superficial en un ensayo monomérico o dimérico. En una realización más específica, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo presenta una K_D de aproximadamente 200 pM o menor, aproximadamente 150 o menor, aproximadamente 100 pM o menor, o 20 aproximadamente 50 pM. En diversas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno bloquea la actividad de la hIL-4 con una C_{50} de aproximadamente 100 pM o menor, medida por bioensayo con luciferasa. En realizaciones más específicas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno presenta una C_{50} de aproximadamente 50 pM o menor, aproximadamente 30 pM o menor, o aproximadamente 25 pM o menor, medida por bioensayo con STAT6 luciferasa. En diversas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno 25 bloquea la actividad de la hIL-13 con una C_{50} de aproximadamente 100 pM o menor, aproximadamente 90 pM o menor, aproximadamente 50 pM o menor, o aproximadamente 20 pM o menor, medida por bioensayo con STAT6 luciferasa.

30 También se desvela, pero no forma parte de la invención, un anticuerpo que comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada (HCVR) seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 18, 22, 26, 42, 46, 50, 66, 70, 74, 90, 94, 98, 114, 118, 122, 138, 142, 146, 166, 170, 186, 190, 194, 210, 214, 218, 234, 238, 242, 258 y 262, o en una secuencia sustancialmente similar de las mismas.

35 También se desvela, pero no forma parte de la invención, un anticuerpo que comprende una secuencia de la región variable de la cadena ligera (LCVR) seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, 20, 24, 34, 44, 48, 58, 68, 72, 82, 92, 96, 106, 116, 120, 130, 140, 144, 154, 168, 178, 188, 192, 202, 212, 216, 226, 236, 240, 250, 260 y 264, o en una secuencia sustancialmente similar de las mismas.

40 También se desvela, pero no forma parte de la invención, un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo que comprende los pares de secuencias HCVR y LCVR (HCVR/LCVR) seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2/10, 18/20, 22/24, 26/34, 42/44, 46/48, 50/58, 66/68, 70/72, 74/82, 90/92, 94/96, 98/106, 114/116, 118/120, 122/130, 138/140, 142/144, 146/154, 166/168, 170/178, 186/188, 190/192, 194/202, 210/212, 214/216, 218/226, 234/236, 238/240, 242/250, 258/260 y 262/264. En un caso preferido, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, comprende los pares de secuencias HCVR/LCVR SEQ ID NO: 162/164, 210/212 o 18/20; los anticuerpos ejemplares que tienen estos pares de pares de secuencias HCVR/LCVR incluyen los anticuerpos denominados H4H083P (SEQ ID NOs: 45 210/212) y H4H095P (SEQ ID NOs: 18/20).

Un anticuerpo codificado por un vector según la invención es H4H098P (SEQ ID NO: 162/164).

50 También se desvelan, pero no forman parte de la invención, moléculas de ácido nucleico que codifican una HCVR, en el que la molécula de ácido nucleico es una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 17, 21, 25, 41, 45, 49, 65, 69, 73, 89, 93, 97, 113, 117, 121, 137, 141, 145, 165, 169, 185, 189, 193, 209, 213, 217, 233, 237, 241, 257 y 261, o una secuencia sustancialmente idéntica que tiene al menos un 95 % de homología con las mismas.

55 También se desvelan, pero no forman parte de la invención, moléculas de ácido nucleico que codifican una LCVR, en el que la molécula de ácido nucleico es una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9, 19, 23, 33, 43, 47, 57, 67, 71, 81, 91, 95, 105, 115, 119, 129, 139, 143, 153, 167, 177, 187, 191, 201, 211, 215, 225, 235, 239, 249, 259 y 263, o una secuencia sustancialmente idéntica que tiene al menos un 95 % de homología con las mismas.

60 También se desvela, pero no forma parte de la invención, un anticuerpo de la divulgación que comprende una HCVR y una LCVR codificadas por un par de secuencias de nucleótidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1/9, 17/19, 21/22, 25/33, 41 / 43, 45/47, 49/57, 65/67, 69/71, 73/81, 89/91, 93/95, 97/105, 113/115, 117/119, 121/129, 137/139, 141/143, 145/153, 165/167, 169/177, 185/187, 189/191, 193/201, 209/211, 213/215, 217/225, 233/235, 237/239, 241/249, 257/259 y 261/263. En un caso preferido, el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo,

comprende secuencias de HCVR/LCVR codificadas por secuencias de ácido nucleico seleccionadas de SEQ ID NO: 209/211 y 17/19. En una realización aún más preferida, el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, codificado por un vector o células hospedadoras de la presente invención comprende secuencias de HCVR/LCVR codificadas por las secuencias de ácido nucleico SEQ ID NO: 161/163.

5 También se desvela, pero no forma parte de la invención, un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, que comprende una HCDR3 y una LCDR3, en el que el dominio de HCDR3 se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, 32, 56, 80, 104, 128, 152, 176, 200, 224 y 248; y el dominio de LCDR3 se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16, 40, 64, 88, 112, 136, 160, 184, 208, 232 y 256. En un caso preferido, las secuencias HCDR3/LCDR3 son SEQ ID NO: 152/160, 8/16 o 200/208. En un caso aún más preferido, las secuencias HCDR3 y LCDR3 son SEQ ID NO: 152 y 160.

10 En un caso adicional, el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, comprende además una secuencia HCDR1 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 28, 52, 76, 100, 124, 148, 172, 196, 220 y 244, o una secuencia sustancialmente similar de las mismas; una secuencia HCDR2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6, 30, 54, 78, 102, 126, 150, 174, 198, 222 y 246, o una secuencia sustancialmente similar de las mismas; una secuencia HCDR3 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, 32, 56, 80, 104, 128, 152, 176, 200, 224 y 248, o una secuencia sustancialmente similar de las mismas; una secuencia LCDR1 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, 36, 60, 84, 108, 132, 156, 180, 204, 228 y 252, o una secuencia sustancialmente similar de las mismas; una secuencia LCDR2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, 38, 62, 86, 110, 134, 158, 182, 206, 230 y 252, o una secuencia sustancialmente similar de las mismas; y una secuencia LCDR3 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16, 40, 64, 88, 112, 136, 160, 184, 208, 232 y 256 o una secuencia sustancialmente similar de las mismas. En un caso preferido, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, comprende las secuencias HCDR SEQ ID NO: 148, 150 y 152 y las secuencias LCDR SEQ ID NO: 156, 158 y 160; las secuencias HCDR SEQ ID NO: 4, 6 y 8 y las secuencias LCDR SEQ ID NO: 12, 14 y 16; y las secuencias HCDR SEQ ID NO: 196, 198 y 200 y las secuencias LCDR SEQ ID NO: 204, 206 y 208.

15 También se desvelan, pero no forman parte de la invención, anticuerpos anti-hIL-4R, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que tienen las secuencias HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 148/150/152/156/158/160; 4/6/8/12/14/16 y 196/198/200/204/206/208. Los anticuerpos ejemplares que tienen estas secuencias HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 incluyen los anticuerpos denominados H4H098P (SEQ ID NOs: 148/150/152/156/158/160), H4H083 (SEQ ID NOs: 196/198/200/204/206/208) y H4H095P (SEQ ID NOs: 4/6/8/12/14/16). En una realización, un vector o células hospedadoras de la presente invención codifican el anticuerpo designado H4H098P (SEQ ID NO: 148/150/152/156/158/160).

20 También se desvela, pero no forma parte de la invención, un anticuerpo humano, o fragmento de anticuerpo, que comprende una HCDR3 y una LCDR3, en la que la HCDR3 está codificada por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, 31, 55, 79, 103, 127, 151, 175, 199, 223 y 247, o una secuencia sustancialmente idéntica que tiene al menos un 95 % de homología de las mismas; y la LCDR3 está codificada por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15, 39, 63, 87, 111, 135, 159, 183, 207, 231 y 255, o una secuencia sustancialmente idéntica que tiene al menos 95 % de homología de las mismas.

25 También se desvela, pero no forma parte de la invención, un anticuerpo humano, o fragmento de anticuerpo, que comprende un dominio HCDR1 codificado por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, 27, 51, 75, 99, 123, 147, 171, 195, 219 y 243, o una secuencia sustancialmente idéntica que tiene al menos un 95% de homología de las mismas; un dominio HCDR2 codificado por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, 29, 53, 77, 101, 125, 149, 173, 197, 221 y 245, o una secuencia sustancialmente idéntica que tiene al menos 95% homología de las mismas; un dominio HCDR3 codificado por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, 31, 55, 79, 103, 127, 151, 175, 199, 223 y 247, o una secuencia sustancialmente similar que tiene al menos 95% homología de las mismas; un dominio LCDR1 codificado por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, 35, 59, 83, 107, 131, 155, 179, 203, 227 y 251, o una secuencia sustancialmente similar que tiene al menos 95% homología de las mismas; un dominio LCDR2 codificado por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 13, 37, 61, 85, 109, 133, 157, 181, 205, 229 y 253, o una secuencia sustancialmente similar que tiene al menos 95% homología de las mismas; y dominio LCDR3 codificado por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15, 39, 63, 87, 111, 135, 159, 183, 207, 231 y 255, o una secuencia sustancialmente similar que tiene al menos 95% homología de las mismas. En un caso preferido, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, comprende secuencias HCDR y LCDR codificadas por las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 147, 149, 151, 155, 157 y 159; 195, 197, 199, 203, 205 y 207; y 3, 5, 7, 11, 13 y 15.

30 En un caso específico, el anticuerpo anti-hIL-4R o fragmento de unión a antígeno del mismo codificado por un vector o una célula hospedadora de la presente invención comprende la HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 162 y la LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en

la SEQ ID NO: 164, y se caracteriza por una K_D de aproximadamente 100 pM o menor (sustrato monomérico) o 70 pM o menor (sustrato dimérico); una K_D de aproximadamente 160 pM o menor (sustrato monomérico) o 40 pM o menor (sustrato dimérico) a 25 °C y 37 °C, respectivamente; y una Cl_{50} de aproximadamente 10 pM o menor (sustrato dimérico 25 pM) o de aproximadamente 100 pM o menor (sustrato monomérico 200 pM), que puede 5 bloquear la actividad tanto de la hIL-4 como de la hIL-13 con una Cl_{50} de aproximadamente 30 pM o menor (medida por bioensayo) y reacciona en cruzado con IL-4R de mono.

También se desvela, pero no forma parte de la invención, el anticuerpo anti-hIL-4R o fragmento de unión a antígeno 10 del mismo que comprende la HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 18 y la LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 20, y que se caracteriza por una K_D de aproximadamente 450 pM o menor (sustrato monomérico o dimérico); y una Cl_{50} de aproximadamente 40 pM o menor (sustrato dímero 25 pM) o de aproximadamente 100 pM o menor (sustrato monomérico 200 pM), que puede 15 bloquear la actividad tanto de la hIL-4 como de la hIL-13 con una Cl_{50} de aproximadamente 100 pM o menor (medida por bioensayo).

También se desvela el anticuerpo anti-hIL-4R o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende la HCVR 15 que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 210 y la LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 212, y que se caracteriza por una K_D de aproximadamente 50 pM o menor (sustrato monomérico) o 30 pM o menor (sustrato dimérico); una K_D de aproximadamente 200 pM o menor (sustrato monomérico) o 40 pM o menor (sustrato dimérico) a 25 °C y 37 °C, respectivamente; y una Cl_{50} de 20 aproximadamente 10 pM o menor (sustrato dimérico 25 pM) o de aproximadamente 90 pM o menor (sustrato monomérico 200 pM), que puede bloquear la actividad tanto de la hIL-4 como de la hIL-13 con una Cl_{50} de aproximadamente 25 pM o menor (medida por bioensayo) y no reacciona en cruzado con IL-4R de mono.

También se desvela, pero no forma parte de la invención, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un 25 anticuerpo que se une específicamente a hIL-4R, que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada y tres de cadena ligera (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3), en el que la HCDR1 comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8$ (SEQ ID NO: 265), en la que $X^1 =$ Gly; $X^2 =$ Phe; $X^3 =$ Thr; $X^4 =$ Phe; $X^5 =$ Asp o Arg; $X^6 =$ Asp o Ser; $X^7 =$ Tyr; y $X^8 =$ 30 Ala o Gly; la HCDR2 comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8$ (SEQ ID NO: 266), en la que $X^1 =$ Ile o Leu, $X^2 =$ Ser, $X^3 =$ Gly, Tyr o Arg, $X^4 =$ Ser, Asp o Thr, $X^5 =$ Gly o Ser, $X^6 =$ Gly, Ser o Val, $X^7 =$ Ser o Asn y $X^8 =$ Thr, Lys o Ile; la HCDR3 comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8 - X^9 - X^{10} - X^{11} - X^{12} - X^{13} - X^{14} - X^{15} - X^{16} - X^{17} - X^{18}$ (SEQ ID NO: 267) en la que $X^1 =$ Ala, $X^2 =$ Lys, $X^3 =$ Asp, Glu o Trp, $X^4 =$ Gly o Arg, $X^5 =$ Leu, Thr o Arg, $X^6 =$ Gly, Arg o Ser, $X^7 =$ Ile o Gly, $X^8 =$ 35 Thr, Phe o Tyr, $X^9 =$ Ile, Asp o Phe, $X^{10} =$ Arg, Tyr o Asp, $X^{11} =$ Pro, Tyr o está ausente, $X^{12} =$ Arg o está ausente, $X^{13} =$ Tyr o está ausente, $X^{14} =$ Tyr o está ausente, $X^{15} =$ Gly o está ausente, $X^{16} =$ Leu o está ausente, $X^{17} =$ Asp o está ausente y $X^{18} =$ Val o está ausente; la LCDR1 comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8$ (SEQ ID NO: 268) en la que $X^1 =$ Gln, $X^2 =$ Asp, Ser o Val, $X^3 =$ Ile o Leu, $X^4 =$ Ser, Leu o Asn, $X^5 =$ Asn, Tyr o Ile, $X^6 =$ Trp, Ser o Tyr, $X^7 =$ Ile o está ausente; $X^8 =$ Gly o está ausente; $X^9 =$ 40 Tyr o está ausente; $X^{10} =$ Asn o está ausente y $X^{11} =$ Tyr o está ausente; la LCDR2 comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula $X^1 - X^2 - X^3$ (SEQ ID NO: 269) en la que $X^1 =$ Leu, Ala o Val, $X^2 =$ Ala o Gly y $X^3 =$ Ser; y la LCDR3 comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8 - X^9$ (SEQ ID NO: 270) en la que $X^1 =$ Gln o Met, $X^2 =$ Gln, $X^3 =$ Ala o Tyr, $X^4 =$ Leu o Asn, $X^5 =$ Gln o Ser, $X^6 =$ Thr, Phe o His, $X^7 =$ Pro, $X^8 =$ Tyr, Ile o Trp y $X^9 =$ Thr.

En un caso más específico, la HCDR1 comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8$ (SEQ ID NO: 265), en la que $X^1 =$ Gly; $X^2 =$ Phe; $X^3 =$ Thr; $X^4 =$ Phe; $X^5 =$ Arg; $X^6 =$ Asp o Ser; $X^7 =$ Tyr y $X^8 =$ Ala o Gly; la HCDR2 comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8$ (SEQ ID NO: 266), en la que $X^1 =$ Ile, $X^2 =$ Ser, $X^3 =$ Gly o Tyr, $X^4 =$ Ser o Thr, $X^5 =$ Gly, $X^6 =$ Gly o Ser, $X^7 =$ 45 Asn y $X^8 =$ Thr o Lys; la HCDR3 comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8 - X^9 - X^{10} - X^{11} - X^{12} - X^{13} - X^{14} - X^{15} - X^{16} - X^{17} - X^{18}$ (SEQ ID NO: 267) en la que $X^1 =$ Ala, $X^2 =$ Lys, $X^3 =$ Asp o Glu, $X^4 =$ Gly o Arg, $X^5 =$ Leu o Arg, $X^6 =$ Gly o Ser, $X^7 =$ Ile o Gly, $X^8 =$ Thr o Phe, $X^9 =$ Ile o Asp, $X^{10} =$ Arg o Tyr, $X^{11} =$ Pro o está ausente, $X^{12} =$ Arg o está ausente, $X^{13} =$ Tyr o está ausente, $X^{14} =$ Tyr o está ausente, $X^{15} =$ Gly o está ausente, $X^{16} =$ Leu o está ausente, $X^{17} =$ Asp o está ausente y $X^{18} =$ Val o está ausente; la LCDR1 comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8 - X^9 - X^{10} - X^{11}$ (SEQ ID NO: 268) en la que $X^1 =$ Gln, $X^2 =$ Ser o Val, $X^3 =$ Ile o Leu, $X^4 =$ Leu o Asn, $X^5 =$ Asn o Tyr, $X^6 =$ Ser o Tyr, $X^7 =$ Ile o está ausente; $X^8 =$ Gly o está ausente; $X^9 =$ Tyr o está ausente; $X^{10} =$ Asn o está ausente y $X^{11} =$ Tyr o está ausente; la LCDR2 comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula $X^1 - X^2 - X^3$ (SEQ ID NO: 269) en la que $X^1 =$ Leu o Ala, $X^2 =$ Ala o Gly y $X^3 =$ Ser; y la LCDR3 comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8 - X^9$ (SEQ ID NO: 270) en la que $X^1 =$ Gln o Met, $X^2 =$ Gln, $X^3 =$ Ala o Tyr, $X^4 =$ Leu o Asn, $X^5 =$ Gln o Ser, $X^6 =$ Thr o His, $X^7 =$ Pro, $X^8 =$ Tyr o Trp y $X^9 =$ Thr.

En otro caso más específico, la HCDR1 comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8$ (SEQ ID NO: 265), en la que $X^1 =$ Gly; $X^2 =$ Phe; $X^3 =$ Thr; $X^4 =$ Phe; $X^5 =$ Asp o Arg; $X^6 =$ Asp; $X^7 =$ Tyr y $X^8 =$ Ala; la HCDR2 comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8$ (SEQ ID NO: 266), en la que $X^1 =$ Ile o Leu, $X^2 =$ Ser, $X^3 =$ Gly o Arg, $X^4 =$ Ser o Thr, $X^5 =$ Gly o Ser, $X^6 =$ Gly o Val, $X^7 =$ Ser

o Asn y X⁸ = Thr o Ile; la HCDR3 comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula X¹ – X² – X³ – X⁴ – X⁵ – X⁶ – X⁷ – X⁸ – X⁹ – X¹⁰ – X¹¹ – X¹² – X¹³ – X¹⁴ – X¹⁵ – X¹⁶ – X¹⁷ – X¹⁸ (SEQ ID NO: 267) en la que X¹ = Ala, X² = Lys, X³ = Asp o Trp, X⁴ = Gly o Arg, X⁵ = Leu o Thr, X⁶ = Arg o Ser, X⁷ = Ile o Gly, X⁸ = Thr o Tyr, X⁹ = Ile o Phe, X¹⁰ = Arg o Asp, X¹¹ = Pro, Tyr o está ausente, X¹² = Arg o está ausente, X¹³ = Tyr o está ausente, X¹⁴ = Tyr o está ausente, X¹⁵ = Gly o está ausente, X¹⁶ = Leu o está ausente, X¹⁷ = Asp o está ausente y X¹⁸ = Val o está ausente; la LCDR1

5 comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula X¹ – X² – X³ – X⁴ – X⁵ – X⁶ – X⁷ – X⁸ – X⁹ – X¹⁰ – X¹¹ (SEQ ID NO: 268) en la que X¹ = Gln, X² = Asp o Ser, X³ = Ile o Leu, X⁴ = Ser o Leu, X⁵ = Tyr o Ile, X⁶ = Trp o Ser, X⁷ = Ile o está ausente; X⁸ = Gly o está ausente; X⁹ = Tyr o está ausente; X¹⁰ = Asn o está ausente y X¹¹ = Tyr o está ausente; la LCDR2 comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula X¹ – X² – X³ (SEQ ID NO: 269) en la que X¹ = Leu o Val, X² = Ala o Gly y X³ = Ser; y la LCDR3 comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula X¹ – X² – X³ – X⁴ – X⁵ – X⁶ – X⁷ – X⁸ – X⁹ (SEQ ID NO: 270) en la que X¹ = Gln o Met, X² = Gln, X³ = Ala, X⁴ = Leu o Asn, X⁵ = Gln o Ser, X⁶ = Thr o Phe, X⁷ = Pro, X⁸ = Tyr o Ile y X⁹ = Thr.

15 También se desvela, pero no forma parte de la invención, un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, que comprende secuencias de HCDR1 / HCDR2 / HCDR3 / LCDR1 / LCDR2 / LCDR3 de un par de HCVR y LCVR, en el que las secuencias de HCVR / LCVR se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO: 162/164, 210/212 y 18/20. Las secuencias de CDR de cadena pesada y ligera en el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo codificado por un vector o una célula hospedadora de la presente invención son las contenidas en la HCVR SEQ ID NO: 162 y en la LCVR SEQ ID NO: 164. En otro caso más específico, las secuencias de CDR de cadena pesada y ligera son las contenidas en la HCVR SEQ ID NO: 18 y en la LCVR SEQ ID NO: 20. En otra realización adicional específica, las secuencias de CDR de cadena pesada y ligera son las contenidas en la HCVR SEQ ID NO: 210 y en la LCVR SEQ ID NO: 212.

20 25 La invención incluye los anticuerpos anti-hIL-4R codificados que tienen un modelo de glucosilación modificado. En algunas aplicaciones, para eliminar sitios de glucosilación no deseables puede ser útil la modificación, o un anticuerpo que carezca de un resto de fucosa presente en la cadena del oligosacárido, por ejemplo, para aumentar la función de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) (véase, Shield et al. (2002) JBC 277:26733). En otras aplicaciones, para modificar la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) puede realizarse la modificación de una galactosilación.

30 35 La invención proporciona vectores de expresión recombinante como se reivindican, y también se proporcionan células hospedadoras en las que se han incluido dichos vectores, procedimientos para preparar los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno obtenidos cultivando las células hospedadoras de la invención. Una célula hospedadora de la presente invención puede ser una célula procariota o eucariota, preferentemente la célula hospedadora es una célula de *E. coli* o una célula de mamífero, tal como una célula CHO.

También se desvela una composición que comprende un anticuerpo humano recombinante que se une específicamente al hIL-4R y un vehículo aceptable.

40 45 También se desvelan, pero no forman parte de la invención, procedimientos para inhibir la actividad de la hIL-4 usando un anticuerpo, o una parte de unión a antígeno del mismo, de la divulgación. En casos específicos, los anticuerpos de la divulgación también bloquean el complejo hIL-13/hIL-13R1 uniéndose a hIL-4R. En un caso, el procedimiento comprende poner en contacto el hIL-4R con el anticuerpo de la divulgación, o parte de antígeno del mismo, de tal manera que la actividad de la hIL-4 o hIL-4/hIL-13 se inhibe. En otro caso, el procedimiento comprende administrar, a un ser humano que padece un trastorno que se mejora inhibiendo la actividad de la hIL-4 o hIL-4/hIL-13, un anticuerpo de la divulgación, o parte de unión a antígeno del mismo. El trastorno tratado es cualquier enfermedad o afección que se alivie, se mejore, se inhiba o se impida por eliminación, inhibición o reducción de la actividad de la hIL-4 o hIL-4/hIL-13.

50 55 Los trastornos relacionados con la IL-4 que tratan los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo de la divulgación, aunque no forman parte de la invención incluyen, por ejemplo, artritis (incluyendo artritis séptica), dermatitis herpetiformis, urticaria idiopática crónica, esclerodermia, cicatrización hipertrófica, enfermedad de Whipple, hiperplasia prostática benigna, trastornos pulmonares, tales como asma leve, moderada o grave, trastornos inflamatorios tales como enfermedad intestinal inflamatoria, reacciones alérgicas, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de células falciformes, síndrome de Churg-Strauss, enfermedad de Grave, pre-eclampsia, síndrome de Sjogren, síndrome linfoproliferativo autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, esófago de Barrett, uveítis autoinmune, tuberculosis y nefrosis.

Otros objetos y ventajas se pondrán de manifiesto a partir de una revisión de la siguiente descripción detallada.

60 Descripción detallada

65 Antes de describir los procedimientos de la presente invención, debe entenderse que la misma no está limitada a procedimientos particulares, y que las condiciones experimentales descritas, tales como los procedimientos y las condiciones, pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene la únicamente la finalidad de describir realizaciones particulares y no pretende ser limitante, dado que el alcance de

la presente invención solo estará limitado por las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado al normalmente entendido por un experto habitual en la técnica a la cual pertenece la presente invención. Aunque en la realización práctica o ensayo de la presente invención pueden usarse muchos procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, los procedimientos y materiales preferidos se describen a continuación.

Definiciones

La expresión "IL4R humano" (hIL-4R), como se usa en el presente documento, pretende referirse al IL-4R α (SEQ ID NO: 274), un receptor humano de citocina que se une específicamente a interleucina-4 (IL-4). La expresión "interleucina-13 humana" (hIL-13) se refiere a una citocina que se une específicamente al receptor de la IL-13, y "complejo hIL-13/hIL-13R1" se refiere al complejo formado por la unión de la hIL-13 al complejo hIL-13R1, cuyo complejo une el receptor de hIL-4 para iniciar la actividad biológica.

La expresión "anticuerpo", como se usa en el presente documento, pretende referirse a moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H, *heavy*) y dos cadenas ligeras (L, *light*) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de la cadena ligera comprende un dominio (CL1). Adicionalmente, las regiones VH y VL pueden subdividirse en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR, *framework regions*). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

La expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "parte de anticuerpo" o "fragmento de anticuerpo"), como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, hIL-4R). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarla fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Como ejemplos de fragmentos de unión incluidos dentro de la expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo se incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL1 y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos F(ab') unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento dAb (Ward et al. (1989) *Nature* 241:544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una CDR. Adicionalmente, aunque los dos dominios VL y VH, del fragmento Fv, están codificados por genes distintos, estos pueden unirse, usando procedimientos recombinantes, mediante un engarce sintético que los permite constituirse como una sola cadena contigua en la que el par de regiones VL y VH forman moléculas monovalentes (lo que se conoce como Fv monocatenario (*scFv, single chain Fv*); véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; y Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:5879-5883. Dichos anticuerpos monocatenarios también pretenden incluirse dentro de la expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo. También se incluyen otras formas de anticuerpos monocatenarios, tales como diacuerpos (véase, por ejemplo, Hollinger et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:6444-6448).

Como se usa en el presente documento, un anticuerpo "neutralizante" o "bloqueante" pretende referirse a un anticuerpo cuya unión al hIL-4R da como resultado la inhibición de la actividad biológica de hIL-4 y/o hIL-13. Esta inhibición de la actividad biológica de hIL-4 y/o hIL-13 puede evaluarse midiendo uno o más indicadores de la actividad biológica de hIL-4 y/o hIL-13 conocidos en la técnica, tales como activación celular inducida por hIL-4 y/o IL-13 y unión de la hIL-4 al hIL-4R (véanse los ejemplos más adelante).

Una "CDR", o región determinante de la complementariedad, es una región de hipervariabilidad intercalada dentro de regiones que están más conservadas, denominadas "regiones marco conservadas" (FR). En diferentes realizaciones del anticuerpo anti-hIL-4R o fragmento de la divulgación, las FR pueden ser idénticas a las secuencias de la línea germinal humana o pueden modificarse natural o artificialmente.

La expresión "resonancia de plasmón superficial", como se usa en el presente documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite analizar interacciones en tiempo real detectando alteraciones en las concentraciones de las proteínas con una matriz biodetectora, por ejemplo, usando el sistema BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB).

El término "epítopo" se refiere a un determinante antigénico que interacciona con un sitio de unión a antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocido como paratopo. Un solo antígeno puede tener más de un epítopo. Los epítulos pueden ser conformacionales o lineales. Un epítopo conformacional se produce yuxtaponiendo espacialmente aminoácidos de diferentes segmentos de la cadena polipeptídica lineal. Un

epítopo lineal es uno producido por residuos de aminoácidos adyacentes en una cadena polipeptídica. En algunas circunstancias, un epítopo puede incluir fracciones de sacáridos, grupos fosforilo, o grupos sulfonilo en el antígeno.

- 5 La expresión "identidad sustancial" o "sustancialmente idéntico", cuando se hace referencia a un ácido nucleico o a un fragmento del mismo, indica que, cuando se alinea óptimamente con inserciones o delecciones de nucleótidos apropiadas con otro ácido nucleico (o su cadena complementaria), existe una identidad de secuencia de nucleótidos de al menos aproximadamente un 95%, y más preferentemente al menos una identidad de secuencia de aproximadamente un 96%, 97%, 98% o 99% de las bases de nucleótidos, medida por cualquier algoritmo de identidad de secuencias bien conocido, tal como FASTA, BLAST o Gap, como se analiza más adelante.
- 10 Aplicada a polipéptidos, la expresión "similitud sustancial" o "sustancialmente similar" significa que, cuando dos secuencias peptídicas se alinean óptimamente, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando pesos de hueco por defecto, comparten al menos una identidad de secuencia del 95%, incluso más preferentemente al menos una identidad de secuencia de al menos un 98% o 99%. Preferentemente, posiciones de residuos no idénticas
- 15 15 difieren por sustituciones conservativas de aminoácidos. Una "sustitución conservativa de aminoácidos" es una en la que un residuo de aminoácido se sustituye por otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución conservativa de aminoácidos no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en los que dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí por sustituciones conservativas, el porcentaje de identidad de
- 20 20 secuencia, o grado de similitud, puede ajustarse al alza para corregir la naturaleza de la sustitución conservativa. Los expertos en la técnica conocen bien medios para realizar este ajuste. Véase, por ejemplo, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331. Como ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares se incluyen (1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; (2) cadenas laterales hidroxilo alifáticas: serina y treonina, (3) cadenas laterales que contienen amida:
- 25 25 asparagina y glutamina; (4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; (5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; (6) cadenas laterales ácidas: aspartato y glutamato y (7) cadenas laterales que contienen azufre son cisteína y metionina. Los grupos de aminoácidos de sustitución conservativa preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato, y asparagina-glutamina. Como alternativa, un reemplazo conservativo es cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz
- 30 30 PAM250 de probabilidades logarítmicas desvelada en Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-1445. Un reemplazo "moderadamente conservativo" es cualquier cambio que tenga un valor no negativo en la matriz PAM250 de probabilidades logarítmicas.

- 35 Para polipéptidos, similitud de secuencia, denominada también identidad de secuencia, se mide típicamente utilizando programas informáticos de análisis de secuencia. Los programas informáticos análisis de proteínas emparejan secuencias similares usando mediciones de similitud asignadas a diversas sustituciones, delecciones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones conservativas de aminoácidos. Por ejemplo, el programa informático GCG contiene programas tales como Gap y Bestfit que pueden usarse con parámetros por defecto para determinar la homología de secuencia o identidad de secuencia entre polipéptidos estrechamente relacionados, tales como
- 40 40 polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína de tipo silvestre y una mutéina de la misma. Véase, por ejemplo, la Versión 6,1 de GCG. Las secuencias polipeptídicas también pueden compararse usando FASTA que utiliza parámetros por defecto o recomendados, un programa en GCG Versión 6,1. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineaciones y porcentajes de identidad de secuencia de las regiones del mejor solapamiento entre la secuencia problema y la secuencia buscada (Pearson (2000), citado anteriormente). Otro algoritmo preferido cuando se compara una secuencia de la divulgación con una base de datos que contiene un gran número de secuencias de diferentes organismos en el programa informático BLAST, especialmente BLASTP o TBLASTN, que utiliza parámetros por defecto. Véase, por ejemplo, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 y Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402.

50 Preparación de anticuerpos humanos

Como procedimientos para generar anticuerpos humanos se incluyen, por ejemplo, los descritos en los documentos US 6.596.541, Green et al. (1994) *Nature Genetics* 7:13-21, US 5.545.807, US 6.787.637.

- 55 55 Los roedores pueden inmunizarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* 1988 Cold Spring Harbor Laboratory; Malik y Lillehoj (1994) *Antibody Techniques*, Academic Press, CA). Preferentemente, los anticuerpos de la divulgación se preparan utilizando la tecnología VELOCIMMUNE™ (documento US 6.596.541). Un ratón transgénico en el que las regiones variables de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina endógena se han reemplazado por las regiones variables humanas correspondientes se expone al antígeno de interés, y se recuperan células linfáticas (tales como células B) de los ratones que expresan los anticuerpos. Las células linfáticas pueden fusionarse con una línea celular de mieloma para preparar líneas celulares inmortales de hibridoma y dichas líneas celulares de hibridoma se exploran y se seleccionan para identificar líneas celulares de hibridoma que produzcan anticuerpos específicos dirigidos contra el antígeno de interés. El ADN que codifica las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera puede aislar y unirse a regiones constantes isotípicas deseables de la cadena pesada y cadena ligera. Dicha proteína de anticuerpo puede producirse en una célula CHO. Como alternativa, el ADN que codifica los

anticuerpos quiméricos específicos de antígeno o las regiones variables de las cadenas ligera y pesada puede aislarse directamente de linfocitos específicos de antígeno.

- 5 El ADN que codifica las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo se aísla y se une operativamente al ADN que codifica las regiones constantes de la cadena pesada y ligera humana. Después, el ADN se expresa en una célula que pueda expresar el anticuerpo totalmente humano. En una realización específica, la célula es una célula CHO.
- 10 Los anticuerpos pueden ser terapéuticamente útiles bloqueando una interacción ligando-receptor o inhibiendo la interacción receptor-componente, en lugar de destruyendo células a través de la fijación del complemento (citotoxicidad dependiente del complemento) (CDC) y la participación de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). La región constante de un anticuerpo es importante en cuanto a la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento y mediar la citotoxicidad dependiente de células. Por tanto, el isótipo de un anticuerpo puede seleccionarse en base a si es deseable para que el anticuerpo medie la citotoxicidad.
- 15 15 Las inmunoglobulinas humanas pueden existir en dos formas que están asociadas con la heterogeneidad de la región bisagra. En una forma, una molécula de inmunoglobulina comprende una construcción estable de cuatro cadenas de aproximadamente 150-160 kDa en la que los dímeros se sujetan entre sí mediante un enlace disulfuro de cadena pesada intercatenario. En una segunda forma, los dímeros no están unidos mediante enlaces disulfuro 20 intercatenarios y se forma una molécula de aproximadamente 75-80 kDa compuesta por una cadena ligera y pesada covalentemente acopladas (medio anticuerpo). Estas formas son extremadamente difíciles de separar, incluso después de purificación por afinidad. La frecuencia de aparición de la segunda forma en diversos isótipos de IgG intactos se debe, pero sin limitación, a diferencias estructurales asociadas con el isótipo de la región bisagra del anticuerpo. De hecho, una sola sustitución de aminoácidos en la región bisagra de la bisagra de la IgG4 humana 25 puede reducir significativamente la aparición de la segunda forma (Angal et al. (1993) Molecular Immunology 30:105) a niveles típicamente observados usando una bisagra de la IgG1 humana. La presente divulgación incluye anticuerpos que tienen una o más mutaciones en la región bisagra, CH2 o CH3, que pueden ser deseables, por ejemplo, en la producción, para mejorar el rendimiento de la forma del anticuerpo deseado.
- 30 30 Inicialmente, se aíslan anticuerpos quiméricos de alta afinidad que tienen una región variable humana y una región constante de ratón. Como se describe más adelante, los anticuerpos se caracterizan y se seleccionan por sus características deseables, incluyendo la afinidad de unión al hIL-4R, capacidad para bloquear la unión de la hIL-4 al hIL-4R y/o selectividad por la proteína humana. Las regiones constantes de ratón se reemplazan por regiones constantes humanas deseadas para generar los anticuerpos completamente humanos descritos en la divulgación, por ejemplo, IgG4 o IgG1 de tipo silvestre o modificada (por ejemplo, SEQ ID NO: 271, 272, 273). Aunque la región constante seleccionada puede variar de acuerdo con el uso específico, las características de unión al antígeno de alta afinidad y especificidad hacia la diana residen en la región variable.
- 35

Mapeo epitópico y tecnologías relacionadas

- 40 40 Para explorar anticuerpos que se unen a un epitópico particular, puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado rutinario tal y como se describe en Harlow y Lane, citado anteriormente. Otros procedimientos incluyen análisis de mutantes mediante alanina, transferencias con péptidos (Reineke (2004) Methods Mol Biol. 248:443-63), o escisión peptídica. Además, pueden emplearse procedimientos tales como escisión epitópica, extracción epitópica y 45 modificación química de antígenos (Tomer (2000) Protein Science: 9:487-496).
- 50 50 El Perfilado Asistido con Modificación (MAP), también conocido como Perfilado de Anticuerpos basado en Estructuras de Antígenos (ASAP) es un procedimiento que categoriza grandes cantidades de anticuerpos monoclonales (mAb) dirigidos contra el mismo antígeno de acuerdo con las similitudes del perfil de unión de cada anticuerpo con superficies de antígeno químicamente o enzimáticamente modificadas (publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 2004/0101920). Cada categoría puede reflejar un solo epitópico claramente diferente de, o solapando parcialmente con, un epitópico representado por otra categoría. Esta tecnología permite una filtración rápida de anticuerpos genéticamente idénticos, de tal manera que la caracterización puede centrarse en anticuerpos genéticamente distintos. Cuando se aplica a la exploración de hibridomas, el MAP puede facilitar la identificación de 55 clones de hibridoma extraños con características deseadas. El MAP puede usarse para separar los anticuerpos hIL-4R de la divulgación en grupos de anticuerpos que se unen a diferentes epitópicos.
- 60 60 Las enzimas, tales como, por ejemplo, enzimas proteolíticas y agentes químicos, son agentes útiles para alterar la estructura del antígeno inmovilizado. La proteína antigénica puede inmovilizarse en superficies de microplacas biodetectoras o en perlas de poliestireno. Las últimas pueden procesarse, por ejemplo, con un ensayo, tal como un ensayo de detección múltiple LUMINEX™ (Luminex Corp., TX). Debido a la capacidad de LUMINEX™ para manejar análisis múltiples hasta con 100 tipos de perlas diferentes, LUMINEX™ proporciona superficies antigenicas casi ilimitadas con diversas modificaciones, dando como resultado una resolución mejorada en el perfilado epitópico de los anticuerpos sobre un ensayo biodetectador.
- 65

Biespecíficos

Los anticuerpos de la presente divulgación pueden ser monoespecíficos, biespecíficos, o multiespecíficos. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítopos de un polipéptido diana o pueden contener dominios de unión a antígeno específico para más de un polipéptido diana. Véase, por ejemplo, Tutt et al. (1991) *J. Immunol.* 147:60-69. Los anticuerpos anti-IL-4R humano pueden unirse a, o co-expresarse con, otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo puede unirse funcionalmente (por ejemplo, por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares distintas, tales como otro anticuerpo o fragmento de anticuerpo, para producir un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo multiespecífico con una segunda especificidad de unión.

10 Administración y formulaciones terapéuticas

También se desvelan, pero no forman parte de la invención, composiciones terapéuticas que comprenden los anticuerpos anti-IL-4R o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente divulgación. La administración de las composiciones terapéuticas de acuerdo con la divulgación se administrará con vehículos, excipientes, y otros agentes adecuados que se incorporan en las formulaciones para proporcionar una mejor transferencia, administración, tolerancia y similares. En el formulario conocido por todos los químicos farmacéuticos puede encontrarse una multitud de formulaciones apropiadas: Remington Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, pomadas, gelatinas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (catiónicos o no catiónicos) (tales como, LIPOFECTINA), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidra, emulsiones de aceite en agua y de agua en aceite, emulsiones carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos, y mezclas semisólidas que contienen carbowax. Véase también Powell et al "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) *J Pharm Sci Technol* 52:238-311.

25 La dosis puede variar dependiendo de la edad y de la talla del sujeto al cual se le va a administrar, de la enfermedad diana, afecciones, vía de administración y similares. Cuando el anticuerpo de la presente divulgación se usa para el tratamiento de diversas afecciones y enfermedades asociadas con el IL-4R, en un paciente adulto, es ventajoso administrar por vía intravenosa el anticuerpo de la presente divulgación normalmente a una sola dosis de 30 aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal, más preferentemente de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 7, de aproximadamente 0,03 a aproximadamente 5, o de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal. Dependiendo de la gravedad de la afección, pueden ajustarse la frecuencia y la duración del tratamiento.

35 Se conocen diversos sistemas de administración y pueden usarse para administrar la composición farmacéutica de la divulgación, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes que pueden expresar los virus mutantes, endocitosis mediada por receptores (véase, por ejemplo, Wu et al. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432). Los procedimientos de introducción incluyen, pero sin limitación, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. La composición puede administrarse mediante cualquier vía conveniente, por ejemplo por infusión o inyección en embolada, por absorción a través de los revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y puede administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

45 Las composiciones farmacéuticas también pueden administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer (1990) *Science* 249:1527-1533; Treat et al. (1989) in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, páginas 353-365; Lopez-Berestein, citado anteriormente, páginas, 317-327; véase anteriormente en líneas generales).

50 En determinadas situaciones, la composición farmacéutica puede administrarse en un sistema de liberación controlado. En un caso, puede usarse una bomba (véase Langer, citado anteriormente; Sefton (1987) *CRC Crit. Ref. Biomed. Ing.* 14:201). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos (véase *Medical Applications of Controlled Release*, Langer y Wise (eds.), Pres CRC., Boca Ratón, Florida (1974). En otro caso más, puede colocarse un sistema de liberación controlado cerca de la diana de la composición, necesitando de esta manera solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, citado anteriormente, vol. 2, páginas 115-138, 1984). Otros sistemas de liberación controlada se analizan en la revisión de Langer (1990) *Science* 249:1527-1533.

60 Las preparaciones inyectables pueden incluir formas de dosificación para inyecciones intravenosas, subcutáneas, intracutáneas e intramusculares, infusiones por goteo, etc. Estas preparaciones inyectables pueden prepararse mediante procedimientos públicamente conocidos. Por ejemplo, las preparaciones inyectables pueden prepararse, por ejemplo, disolviendo, suspendiendo o emulsionando el anticuerpo o su sal, descrito anteriormente, en un medio acuoso estéril o en un medio oleaginoso convencionalmente usado para inyecciones. Como un medio acuoso para inyección, se encuentra, por ejemplo, la solución salina fisiológica, una solución isotónica que contiene glucosa y otros agentes auxiliares, etc., que puede usarse en combinación con un agente solubilizante apropiado tal como un alcohol (por ejemplo, etanol), un polialcohol (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol), un tensioactivo no iónico [por ejemplo, polisorbato 80, HCO-50 (aducto de polioxietileno (50 mol) de aceite de ricino hidrogenado)], etc. Como

medio oleaginoso, se emplea, por ejemplo, aceite de sésamo, aceite de semilla de soja, etc., que puede usarse en combinación con un agente solubilizante tal como benzoato de bencilo, alcohol bencílico, etc. La inyección preparada de esta manera se carga preferentemente en una ampolla apropiada.

- 5 Ventajosamente, las composiciones farmacéuticas para uso oral o parenteral descritas anteriormente se preparan en formas de dosificación en una dosis unitaria adecuada para ajustar una dosis de los ingredientes activos. Dichas formas de dosificación en una dosis unitaria incluyen, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas, inyecciones (ampollas), supositorios, etc. La cantidad del anticuerpo anteriormente mencionado, contenida en una dosis unitaria, es generalmente de aproximadamente 5 a 500 mg por forma de dosificación; especialmente en forma de inyección, 10 se prefiere que la cantidad contenida del anticuerpo anteriormente mencionado sea de aproximadamente 5 a 100 mg y de aproximadamente 10 a 250 mg para las otras formas de dosificación.

Terapias sencillas y de combinación. Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la divulgación son útiles para el tratamiento de enfermedades y trastornos que se alivian, inhiben o mejoran reduciendo la actividad de la IL-4. Estos trastornos incluyen los caracterizados por una expresión anómala o excesiva de IL-4, o por una respuesta anómala del hospedador a la producción de IL-4. Los trastornos relacionados con la IL-4 que tratan los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención incluyen, por ejemplo, artritis (incluyendo artritis séptica), dermatitis herpetiformis, urticaria crónica idiopática, esclerodermia, cicatrización hipertrófica, enfermedad de Whipple, hiperplasia prostática benigna, trastornos pulmonares tales como asma (leve, moderado o grave), trastornos inflamatorios tales como enfermedad intestinal inflamatoria, reacciones alérgicas, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de las células falciformes, síndrome de Churg-Strauss, enfermedad de Grave, pre-eclampsia, síndrome de Sjogren, síndrome linfoproliferativo autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, esófago de Barrett, uveítis autoinmune, tuberculosis, dermatitis atópica, colitis ulcerosa, fibrosis, y nefrosis (véase el documento US 7.186.809).

- 25 La divulgación incluye terapias de combinación en las que el anticuerpo anti-IL-4R o fragmentos del mismo se administran en combinación con un segundo agente terapéutico. La coadministración y la terapia de combinación no se limitan a la administración simultánea, sino que incluyen regímenes de tratamiento en los que un anticuerpo anti-IL-4R o fragmentos de anticuerpo se administran al menos una vez durante un tramo del tratamiento que implica administrar al paciente al menos un agente terapéutico distinto. Un segundo agente terapéutico puede ser otro antagonista de IL-4, tal como otro anticuerpo/fragmento de anticuerpo, o un receptor de citocina soluble, un antagonista de IgE, una medicación contra el asma (corticosteroides, agentes no esteroideos, beta agonistas, antagonistas de leucotrieno, xantinas, fluticasona, salmeterol, albuterol) que puede administrarse por inhalación u otros medios apropiados. En un caso específico, el anticuerpo anti-IL-4R o fragmento del mismo de la divulgación puede administrarse con un antagonista de IL-1, tal como rilonacept, o un antagonista de IL-13. El segundo agente puede incluir uno o más antagonistas de receptores de leucotrieno para tratar trastornos tales como enfermedades inflamatorias alérgicas, por ejemplo, asma y alergias. Como ejemplos de antagonistas de receptores de leucotrieno se incluyen, pero sin limitación, montelukast, pranlukast y zafirlukast. El segundo agente puede incluir un inhibidor de citocina, tal como uno o más de un TNF (etanercept, ENBREL™), un antagonista de IL-9, IL-5 o IL-17.

- 35 40 La presente divulgación, aunque no forma parte de la invención, también incluye el uso de cualquier anticuerpo anti-IL-4R o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno, en el que la enfermedad o trastorno se alivia, se mejora o se inhibe retirando, inhibiendo, reduciendo la actividad de la interleucina-4 humana (hIL-4). Como ejemplos de dichas enfermedades o trastornos se incluyen, por ejemplo, artritis, dermatitis herpetiformis, urticaria idiopática crónica, esclerodermia, cicatrización hipertrófica, enfermedad de Whipple, hiperplasia prostática benigna, trastornos pulmonares, tales como asma, trastornos inflamatorios, reacciones alérgicas, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de células falciformes, síndrome de Churg-Strauss, enfermedad de Grave, pre-eclampsia, síndrome de Sjogren, síndrome linfoproliferativo autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, esófago de Barrett, uveítis autoinmune, tuberculosis, nefrosis, dermatitis atópica y asma.

50 Ejemplos

55 Se plantean los siguientes ejemplos para ofrecer a los expertos en la técnica una presentación y una descripción completa de cómo realizar y usar los procedimientos y las composiciones de la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique de otra manera, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular medio, la temperatura es en grados centígrados y la presión es, o es casi, la atmosférica.

60 Ejemplo 1. Generación de anticuerpos humanos contra el receptor humano de la IL-4.

65 Se inmunizaron ratones VELOCIMMUNE™ (Regeneron Pharmaceuticals, Inc; US 6.596.541) con el receptor humano de la IL-4 (hIL-4R, SEQ ID NO: 274) o con una combinación de hIL-4R y proteína o ADN de IL-4R de mono (*Macaca fascicularis*) (mfIL-4R, SEQ ID NO: 275). Para obtener una respuesta inmunitaria óptima, a los animales se les administró posteriormente un refuerzo cada 3-4 semanas y se extrajo sangre 10 días después de cada refuerzo

para evaluar la progresión de la respuesta anti-antígeno.

Cuando los ratones alcanzaron una respuesta inmunitaria máxima, se recogieron células B que expresaban el anticuerpo y se fusionan con células de mieloma de ratón para formar hibridomas. Como alternativa, se aislaron anticuerpos específicos de antígeno directamente de las células B sin fusionar con células de mieloma, como se describe en la publicación de patente de Estados Unidos 2007/0280945A1. A partir de los recombinantes apropiados aislados, se establecieron líneas de células CHO que expresaban el anticuerpo recombinante estable. Se seleccionaron anticuerpos monoclonales funcionalmente deseables mediante exploración de los medios acondicionados de los hibridomas o células transfectadas con respecto a la especificidad, afinidad de unión a antígeno y fuerza en el bloqueo de la unión de hIL-4 al hIL-4R (descrito más adelante).

Mediante los procedimientos anteriores, se obtuvieron diversos anticuerpos anti-hIL-4R que incluían los anticuerpos ejemplares denominados H4H083P, H4H094P y H4H095P, H4H098P y H4H099P. En los siguientes ejemplos, estos anticuerpos anti-hIL-4R ejemplares y sus propiedades biológicas, se describen con mayor detalle.

Ejemplo 2. Determinación de la afinidad de unión al antígeno.

La afinidad de unión (K_D) de los anticuerpos seleccionados con respecto al hIL-4R a 25°C o 37°C se determinó usando un ensayo de resonancia de plasmón superficial biodetector en tiempo real (BIACORE™ 2000). En resumen, el anticuerpo se capturó sobre una superficie de anticuerpo polyclonal anti-hFc de cabra creada mediante acoplamiento directo con una microplaca BIACORE™ para formar una superficie de anticuerpo capturado. Se inyectaron diversas concentraciones (que variaban de 50 nM a 12,5 nM) de hIL-4R monomérico (R&D Systems) o hIL-4R-mFc dimérico sobre la superficie del anticuerpo capturado a 10 μ l/min durante 2,5 min a 25°C o a 37°C. La unión del antígeno al anticuerpo y la disociación del complejo unido, se controlaron en tiempo real. Las constantes de disociación de equilibrio (K_D) y las constantes de velocidad de disociación se averiguaron realizando análisis cinético usando el programa informático de evaluación BIA. El programa informático de evaluación BIA también se usó para calcular la semivida ($T_{1/2}$) de la disociación del complejo antígeno/anticuerpo. En la Tabla 1 se muestran los resultados. NB (No Binding): En condiciones experimentales, no se observó unión de antígeno-anticuerpo. Control: anticuerpo anti-IL-4R completamente humano (patente de Estados Unidos N° 7.186, 809; SEQ ID NOs: 10 y 12).

Tabla 1

Anticuerpo	25°C				37°C			
	Monomérico		Dimérico		Monomérico		Dimérico	
	K_D (pM)	$T_{1/2}$ (min)						
Control	1100	18	94	186	3970	4	114	158
H4H083P	48	361	28	245	183	87	38,1	163
H4H094P	NB	-	NB	-	NB	-	NB	-
H4H095P	274	131	302	156	437	49	314	116
H4H098P	94,1	243	67,6	237	157	129	38,8	158
H4H099P	NB	-	NB	-	NB	-	NB	-

También se determinó la afinidad de unión (K_D) de los anticuerpos seleccionados con respecto al IL-4R de mono (*Macaca fascicularis*) (mfIL-4R) a 25°C o a 37°C usando un ensayo de resonancia de plasmón superficial biodetector en tiempo real descrito anteriormente con diversas concentraciones (que variaban de 100 nM a 25 nM) de mfIL-4R-myc-myc-his monomérico (mfIL-4R-mmh) o mfIL-4R-mFc dimérico. Solo el anticuerpo H4H098P pudo unirse al mfIL-4R tanto monomérico como dimérico a 25°C con una K_D de 552 nM y 9,08 nM, respectivamente. Además, el anticuerpo H4H098P también se unió al mfIL-4R dimérico a 37°C con una K_D de 24,3 nM. La unión de H4H083P al mfIL-4R dimérico fue muy débil.

También se evaluó la afinidad de unión antígeno-anticuerpo usando un ensayo de competencia en solución basado en ELISA. En resumen, en primer lugar se revistió una placa MAXISORP™ de 96 pocillos con 5 μ g/ml de avidina durante una noche seguido de BSA bloqueante durante 1 hora. Despues, durante 2 horas, la placa revestida con avidina se incubó con 250 ng/ml de hIL4-biotina. La placa se usó para medir el hIL-4R-mFc (hIL-4R dimérico) libre o el hIL-4R-myc-myc-his (hIL4R-mmh, hIL4R monomérico) libre en las soluciones de muestra de titulación del anticuerpo. Para preparar la muestra de titulación de anticuerpo, previamente se mezcló una cantidad constante de 25 pM de hIL-4R-mFc o 200 pM de hIL-4R-mmh con diversas cantidades de anticuerpo, que variaban de 0 a aproximadamente 10 nM en diluciones en serie, seguido por una incubación de 1 h a temperatura ambiente para permitir que la unión antígeno-anticuerpo alcanzase el equilibrio. Las soluciones de muestra equilibrada se transfirieron después a las placas revestidas con hIL-4 para medir tanto el hIL-4R-mFc libre como el hIL-4R-mmh libre. Despues de 1 hora de unión, la placa se lavó y el hIL-4R-mFc unido se detectó usando un anticuerpo polyclonal

anti-mFc de ratón conjugado con HRP o un anticuerpo anti-myc policlonal de cabra conjugado con HRP. Los valores CI_{50} se determinaron (Tabla 2).

Tabla 2

Anticuerpo	CI_{50} (pM)	
	hIL-4R-mFc 25 pM	hIL-4R-mmh 200 pM
Control	8,2	87
H4H083P	9,6	80
H4H094P	> 10,000	> 10,000
H4H095P	40	90
H4H098P	8,8	74
H4H099P	> 10,000	> 10,000

5

El ensayo de competencia en solución basado en ELISA también se usó para determinar la reactividad cruzada de los anticuerpos contra el IL-4R de mono. El anticuerpo H4H098P presentó una CI_{50} para mfIL-4R-mFc de 300 pM y una CI_{50} para mfIL-4R-mmh de 20 nM.

10 Ejemplo 3. Neutralización del efecto biológico de hIL-4 y hIL-13 *in vitro*

Para determinar la capacidad de los anticuerpos anti-hIL-4R purificados de neutralizar la función celular mediada por hIL-4R *in vitro*, se desarrolló un bioensayo usando una línea celular HK293 modificada por ingeniería genética que contenía STAT6 humano y un indicador STAT6 luciferasa. La inhibición de la actividad luciferasa inducible por hIL-4R se determinó de la siguiente manera: las células se sembraron en placas de 96 pocillos en medios a una densidad de 1×10^4 células/pocillo y se incubaron durante una noche a 37°C, con CO₂ al 5%. Las proteínas de anticuerpo que variaban de 0 a 20 nM se añadieron en diluciones en serie a las células junto con hIL-4 10 pM o hIL-13 40 pM. Después las células se incubaron a 37°C, con CO₂ al 5% durante 6 horas. El grado de respuesta celular se midió en un ensayo con luciferasa (Promega Biotech). Los resultados se muestran en la Tabla 3. NB: En las condiciones experimentales descritas anteriormente, la actividad luciferasa no se bloqueó. Además, H4H098P pudo bloquear la función celular mediada por mfIL-4R- en presencia de 360 fM de mfIL con una CI_{50} de 150 nM.

Tabla 3

Anticuerpo	CI_{50} (pM)	
	hIL-4 10 pM	hIL-13 40 pM
Control	47	38
H4H083P	25	19
H4H094P	NB	NB
H4H095P	98	86
H4H098P	27	25
H4H099P	NB	11,000

REIVINDICACIONES

1. Un vector de expresión recombinante que comprende:

- 5 una primera molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada (HCVR) de un anticuerpo que se une al receptor humano de interleucina-4 (IL-4R), en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la HCVR tiene al menos un 95 % de homología con la SEQ ID NO: 161, en donde la HCVR codificada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 162; y
10 una segunda molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena ligera (LCVR) de un anticuerpo que se une al IL-4R humano, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la LCVR tiene al menos un 95 % de homología con la SEQ ID NO: 163, en donde la LCVR codificada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 164.

15 2. El vector de expresión recombinante de la reivindicación 1, en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica la HCVR comprende la SEQ ID NO: 161.

3. El vector de expresión recombinante de la reivindicación 1, en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica la LCVR comprende la SEQ ID NO: 163.

20 4. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

5. Una célula hospedadora que comprende:

- 25 - una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 162 unida operativamente a ADN que codifica una región constante de cadena pesada humana, en donde la HCVR codificada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 162; y
- una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 164 unida operativamente a ADN que codifica una región constante de cadena ligera humana, en donde la LCVR codificada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 164,
- 30

35 en donde la célula expresa un anticuerpo completamente humano que se une al receptor humano de interleucina-4 (IL-4R).

6. La célula hospedadora de la reivindicación 4 o 5, en donde la célula hospedadora es una célula de mamífero.

40 7. La célula hospedadora de la reivindicación 6, en donde la célula hospedadora es una célula de ovario de hámster chino (CHO).

45 8. Un método para producir un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-4R humano, comprendiendo el método cultivar la célula hospedadora de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 en condiciones en las que se expresa el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y recuperar el anticuerpo completamente humano.