

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2005.06.30	(73) Titular(es): GLAXO GROUP LIMITED GLAXO WELLCOME HOUSE, BERKELEY AVENUE GREENFORD, MIDDLESEX UB6 0NN GB
(30) Prioridade(s): 2004.07.01 GB 0414799 2004.10.25 GB 0423675	
(43) Data de publicação do pedido: 2007.07.04	
(45) Data e BPI da concessão: 2011.11.30 046/2012	(72) Inventor(es): JONATHAN HENRY ELLIS GB CLAIRE ASHMAN GB MARTIN JOHN CASSIDY GB TREVOR ANTHONY KENNETH WATTAM GB
	(74) Mandatário: PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS MONOCLONAIS QUIMÉRICOS E HUMANIZADOS CONTRA INTERLEUCINA**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A IMUNOGLOBULINAS, PARTICULARMENTE ANTICORPOS QUE SE LIGAM ESPECIFICAMENTE A INTERLEUCINA 13 HUMANA (IL-13). OS ANTICORPOS DA INVENÇÃO PODEM SER UTILIZADOS NO TRATAMENTO DE UMA VARIEDADE DE DOENÇAS OU DISTÚRBIOS RESPONSIVOS À MODULAÇÃO DA INTERACÇÃO ENTRE IL-13 E O RECEPTOR DE IL-13 HUMANA. TAIS DOENÇAS INCLUEM ASMA GRAVE, DERMATITE ATÓPICA, COPD E VÁRIAS DOENÇAS FIBRÓTICAS. AS COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO OS REFERIDOS ANTICORPOS E MÉTODOS DE PREPARAÇÃO TAMBÉM SÃO DIVULGADOS.

RESUMO

"ANTICORPOS MONOCLONAIS QUIMÉRICOS E HUMANIZADOS CONTRA INTERLEUCINA-13"

A presente invenção refere-se a imunoglobulinas, particularmente anticorpos que se ligam especificamente a interleucina 13 humana (hIL-13). Os anticorpos da invenção podem ser utilizados no tratamento de uma variedade de doenças ou distúrbios responsivos à modulação da interação entre hIL-13 e o receptor de IL-13 humana. Tais doenças incluem asma grave, dermatite atópica, COPD e várias doenças fibróticas. As composições farmacêuticas compreendendo os referidos anticorpos e métodos de preparação também são divulgados.

DESCRIÇÃO

"ANTICORPOS MONOCLONAIS QUIMÉRICOS E HUMANIZADOS CONTRA INTERLEUCINA-13"

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a imunoglobulinas que se ligam especificamente a interleucina 13 (IL-13) e, em particular, a IL-13 humana (hIL-13). Uma forma de realização da invenção refere-se a anticorpos que se ligam especificamente a hIL-13. A presente invenção refere-se também a métodos para tratar doenças ou distúrbios com as referidas imunoglobulinas, composições farmacêuticas compreendendo as referidas imunoglobulinas e métodos para preparação. Outros aspectos da presente invenção serão óbvios a partir da descrição abaixo.

Antecedentes da Invenção

Interleucina-13 (IL-13)

A IL-13 é uma citocina secretada de 12 kDa descrita originalmente como uma citocina derivada de célula T que inibe a produção de citocinas inflamatórias. Os estudos estruturais indicam que possui uma configuração de feixe com quatro hélices mantido por duas ligações dissulfureto. Embora IL-13 tenha quatro potenciais sítios de glicosilação, a análise de IL-13 nativa de pulmão de rato indicou que é produzida como uma molécula não glicosilada. A expressão da IL-13 humana a partir

de células NSO e COS-7 confirma esta observação (Eisenmesser *et al.*, *J. Mol. Biol.* 2001 310(1): 231-241; Moy *et al.*, *J. Mol. Biol.* 2001 310(1): 219-230; Cannon-Carlson *et al.*, *Protein Expression and Purification* 1998 12(2): 239-248). A IL-13 é uma citocina pleiotrópica produzida por uma variedade de tipos celulares incluindo células Th2 ativadas, mastócitos, basófilos, células dendríticas, queratinócitos e células NKT. Também pode ser produzida por células Th0, Th1, T CD8 e CD45RA⁺ naïve. A IL-13 tem actividades imunorregulatórias que se sobrepõem parcialmente com aquelas de IL-4, esta redundância pode ser explicada por componentes compartilhados nos receptores para IL-4 e IL-13. A IL-13 sinaliza através do receptor de IL-4 do tipo II que é um heterodímero composto das cadeias de IL-4R α e IL-13R α 1. IL-13R α 1 liga-se a IL-13 com baixa afinidade (K_d = 2-10 nM), mas quando emparelhada com IL-4R α liga-se com uma alta afinidade (K_d = 400 pM) e forma um receptor funcional para IL-13 (o receptor humano é referido aqui como "hIL-13R") que sinaliza, resultando na activação das vias JAK/STAT e IRS-1/IRS-2. Uma cadeia de receptor de IL-13 adicional que se liga a IL-13 com alta afinidade (K_d = 250 pM) também foi caracterizada (IL-13R α 2), mas não sinaliza, crê-se que, em vez disso, actue como um receptor chamariz. Os receptores funcionais para IL-13 são expressos numa ampla gama de células incluindo o epitélio das vias respiratórias, músculo liso, mastócitos, eosinófilos, basófilos, células B, fibroblastos, monócitos e macrófagos. As células T não têm receptores funcionais para IL-13 (Hilton *et al.*, *PNAS* 1996 93(1): 497-501; Caput *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1996 271(28): 16921-16926; Hershey GK, *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003 111(4): 677-690).

Tanto IL-13, como IL-4 actuam para modificar as respostas imunitárias e inflamatórias pela promoção de inflamação

associada à alergia e repressão de inflamação devido a bactérias, vírus e patógenos intracelulares. Os principais efeitos biológicos de IL-13 incluem; indução de proliferação de célula B e regulação de mudança de isotipo para IgE; indução de expressão de MHC II e CD23 em células B e monócitos; regulação positiva de VCAM-1 em células endoteliais; regulação de produção de quimiocina; activação de função de mastócitos, eosinófilos e neutrófilos, assim como a inibição de expressão génica pró-inflamatória em populações de monócitos e macrófagos. A IL-13 não tem quaisquer efeitos proliferativos em células T. Assim, diferente de IL-4, a IL-13 não parece ser importante na diferenciação inicial de células T CD4 em células tipo Th2, mas em vez disso, parece ser importante na fase efectora de inflamação alérgica (McKenzie *et al.*, *PNAS* 1993 90(8): 3735-3739; Wynn T.A., *Annu. Rev. Immunol.* 2003 21: 425-456).

IL-13 e Asma

A asma é uma doença pulmonar crónica, causada pela inflamação das vias respiratórias inferiores e é caracterizada por problemas respiratórios recorrentes. As vias respiratórias dos doentes estão sensíveis e inchadas ou inflamadas até certo ponto durante todo o tempo, mesmo quando não há sintomas. A inflamação resulta em estreitamento das vias respiratórias e reduz o fluxo de ar para dentro e para fora dos pulmões, tornando a respiração difícil e levando a pieira, aperto no peito e tosse. A asma é desencadeada por supersensibilidade a alérgenos (e. g., ácaros do pó, pólenes, mofo), substâncias irritantes (e. g., fumo, gases, odores fortes), infecções respiratórias e tempo seco. Os deflagradores irritam as vias respiratórias e o revestimento das vias respiratórias aumenta

para tornar-se ainda mais inflamado, o muco obstrui então as vias respiratórias e os músculos em torno das vias respiratórias apertam-se até a respiração se tornar difícil e stressante, e os sintomas da asma aparecerem.

Há forte evidência em modelos animais e em doentes que a inflamação asmática e outras patologias são conduzidas por respostas Th2 desreguladas a aeroalergêneos e outros estímulos (Busse *et al.*, *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 1995 152(1): 388-393). Em particular, pensa-se que a IL-13 seja uma citocina efectora principal dirigindo uma variedade de respostas celulares no pulmão, incluindo hiperreactividade das vias respiratórias, eosinofilia, metaplasia de célula caliciforme e hipersecreção de muco.

Evidência Clínica para a função de IL-13 na asma

O gene que codifica IL-13 está localizado no cromossoma 5q31. Esta região também contém genes que codificam IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 e GM-CSF e foi relacionada com a asma. Variantes genéticas de IL-13 que estão associadas com asma e atopia foram encontradas nas regiões promotora ea codificante (Vercelli D., *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2002 2(5): 389-393). Dados de estudos funcionais estão disponíveis para a variante codificante IL-13 Q130 (aqui referida como "IL-13 Q130"). O polimorfismo de nucleótido único de G (SNP) para A +2044 encontrado no quarto exão, resulta numa substituição de uma arginina por uma glutamina na posição 130 (IL-13 Q130). Note-se também que na SEQ ID N°: 9, esta é equivalente à posição 110, em que o primeiro resíduo de aminoácido "G" no início da sequência de aminoácidos de IL-13 humana madura está na posição 1. Verificou-

se que esta variante está associada à asma, níveis de IgE aumentados e dermatite atópica em populações Japonesas e Europeias. Crê-se que IL-13 Q130 tenha estabilidade aumentada em comparação com a IL-13 selvagem. Esta também tem afinidade ligeiramente menor para o receptor chamariz IL-13R α 2 e, consistente com estas observações, são encontrados níveis médios séricos de IL-13 superiores em doentes homozigóticos para a variante IL-13 Q130 em comparação com doentes não homozigóticos. Esses resultados indicam que IL-13 Q130 poderia influenciar as concentrações locais e sistêmicas de IL-13 (Kazuhiko et al., *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002 109(6): 980-987).

Níveis elevados de IL-13 foram medidos em asmáticos atópicos e não atópicos. Num estudo, foram medidos níveis médios de IL-13 sérica de 50 pg/mL em doentes asmáticos em comparação com 8 pg/mL em doentes normais de controlo (Lee et al., *J. Asthma* 2001 38(8): 665-671). Os níveis aumentados de IL-13 foram também medidos em plasma, fluido de lavagem bronco-alveolar, amostras de biópsia pulmonar e expectoração (Berry et al., *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004 114(5): 1106-1109; Kroegel et al., *Eur. Respir. J.* 1996 9(5): 899-904; Huang et al., *J. Immunol.* 1995 155(5): 2688-2694; Humbert et al., *J. Allergy Clin. Immunol.* 1997 99(5): 657-665).

Evidência in vivo do envolvimento de IL-13 na asma

Vários estudos definiram uma função efectora crítica para IL-13 na condução da patologia em modelos de surgimento de asma alérgica aguda e crónica. O receptor de IL-13 de alta afinidade (IL-13R α 2) ou anticorpos policlonais anti-IL-13 têm sido utilizados para neutralizar a bioactividade de IL-13 de surgimento

nestes modelos. O bloqueio de IL-13 no momento em que a exposição ao alergéneo inibiu completamente a hiperresponsividade de via respiratória induzida por OVA, eosinofilia e metaplasia de células caliciformes. Em comparação, a administração de anticorpo contra IL-4 após a sensibilização e durante a fase de exposição a alergéneo, apenas reduziu parcialmente o fenótipo de asma. Assim, embora as IL-4 e IL-13 exógenas sejam ambas capazes de induzir um fenótipo semelhante à asma, a actividade efectora de IL-13 parece ser superior à de IL-4. Estes dados sugerem uma função primária para IL-4 na indução imunitária (particularmente para desenvolvimento de células Th2 e recrutamento para vias respiratórias e produção de IgE), embora se creia que a IL-13 esteja envolvida principalmente em vários resultados efectores, incluindo hiperresponsividade de via respiratória, superprodução de muco e inflamação celular (Wills-Karp *et al.*, *Science* 1998 282: 2258-2261; Grunig *et al.*, *Science* 1998 282: 2261-2263; Taube *et al.*, *J. Immunol.* 2002 169: 6482-6489; Blease *et al.*, *J. Immunol.* 2001 166(8): 5219-5224).

Em experiências complementares, os níveis de IL-13 pulmonar foram elevados através de sobreexpressão num murgancho transgénico ou por instilação da proteína IL-13 na traquéia de murganchos selvagens. Nas duas situações foram induzidas características semelhantes às da asma: hiperresponsividade de via respiratória não específica à estimulação colinérgica, eosinofilia pulmonar, hiperplasia de célula epitelial, metaplasia de célula mucosa, fibrose subepitelial, obstrução de vias respiratórias e cristais semelhantes aos de Charcot-Leyden. Além disso, a IL-13 demonstrou ser um estimulador potente de metaloproteinases de matriz e proteases de catepsina no pulmão, resultando em alterações enfisematosas e metaplasia de mucosa.

Deste modo, a IL-13 pode ser uma molécula efectora importante tanto em fenótipos de asma como nos de doença COPD (Zhu *et al.*, *J. Clin. Invest.* 1999 103(6): 779-788; Zheng *et al.*, *J. Clin. Invest.* 2000 106(9): 1081-1093).

Estes dados indicam que a actividade de IL-13 é necessária e suficiente para produzir muitas das principais características clínicas e patológicas de asma alérgica em modelos animais bem validados.

Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica (COPD)

A COPD é um termo genérico que abrange muitas síndromes clínicas incluindo enfisema e bronquite crónica. Os sintomas são semelhantes aos da asma e a COPD pode ser tratada com os mesmos fármacos. A COPD é caracterizada por obstrução de via respiratória em grande parte irreversível, progressiva e crónica. A contribuição do indivíduo para o curso da doença é desconhecida, mas considera-se que fumar cigarros cause 90% dos casos. Os sintomas incluem tosse, bronquite crónica, fôlego e infecções respiratórias. Por fim, a doença levará a deficiência grave e morte. A bronquite crónica é diagnosticada em doentes com uma história de tosse ou produção de expectoração na maioria dos dias durante, pelo menos, 3 meses até 2 anos sem qualquer outra explicação. O enfisema pulmonar é caracterizado por um alargamento anómalo permanente dos espaços aéreos e pela destruição das paredes alveolares.

A IL-13 pode ter uma função no desenvolvimento da COPD. Os fumadores humanos que desenvolvem COPD têm muitos tipos de células inflamatórias (neutrófilos, macrófagos, eosinófilos) no

parênquima pulmonar. A IL-13 é uma citocina Th2 pró-inflamatória, deste modo, para moderar a progressão de enfisema; Zheng *et al.*, direcionaram a superexpressão de IL-13 para o epitélio de vias respiratórias em murganhos transgênicos para IL-13. Esses animais desenvolveram inflamação e enfisema de via respiratória e parênquima pulmonar. Estes também desenvolveram metaplasia de mucosa reminiscente de bronquite crônica (*J. Clin. Invest.* 2000 106(9): 1081-1093).

O polimorfismo do promotor de IL-13 (-1055 C para T) que está associado à asma alérgica também foi relatado como tendo uma frequência aumentada em doentes de COPD em comparação com controles saudáveis. Isto implica um papel funcional para o polimorfismo do promotor de IL-13 no risco aumentado para desenvolver COPD (Kraan *et al.*, *Genes and Immunity* 2002 3: 436-439). Além disso, um número aumentado de células positivas para IL-13 e IL-4 foi observado em fumadores com bronquite crônica em comparação com fumadores assintomáticos (Miotto *et al.*, *Eur. Resp. J.* 2003 22: 602-608). No entanto, um estudo recente para avaliar o nível de expressão de IL-13 em pulmões de doentes com enfisema grave não encontrou associação entre os níveis de IL-13 e a doença (Boutten *et al.*, *Thorax* 2004 59: 850-854).

Doenças alérgicas incluindo dermatite atópica e rinite alérgica

A IL-13 também foi implicada em distúrbios atópicos, tais como rinite atópica e dermatite atópica. A rinite alérgica é a doença atópica mais comum nos Estados Unidos e estima-se que afecte até 25% de adultos e mais de 40% de crianças. Há uma relação íntima entre rinite alérgica e asma. Ambos os estados

partilham imunopatologias e patofisiologias comuns; estes possuem processos imunológicos semelhantes em que eosinófilos e linfócitos Th2 em tecido nasal e brônquico desempenham uma função. Crê-se que a produção excessiva de citocinas Th2, particularmente a IL-4 e IL-5, seja fundamental na patogénese da doença alérgica. A IL-13 partilha muitas características e funções efectoras com IL-4 e isto, combinado com a sobreposição funcional na utilização do receptor de IL-4 e IL-13, componentes de sinalização intracelular e organização genética, proporciona evidência convincente (embora indirecta) de uma função de IL-13 na promoção ou manutenção de hipersensibilidade imediata humana *in vivo*. Isto foi corroborado por Li *et al.*, (Li *et al.*, *J. Immunol.* 1998 161: 7007) que demonstraram que indivíduos atópicos com rinite alérgica sazonal apresentaram respostas de IL-13 significativamente mais fortes em resposta à activação dependente de Ag, mas não policlonal.

A dermatite atópica é uma doença de pele inflamatória recidivante, crónica, comum, altamente pruriginosa. A pele da lesão de doentes com dermatite atópica é caracterizada histologicamente por um infiltrado de células T inflamatórias que, durante as fases agudas, está associado com uma predominância da expressão de IL-4, IL-5 e IL-13 (Simon *et al.*, *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004 114: 887; Hamid *et al.*, *J. Allergy Clin. Immunol.* 1996 98: 225). Além disso, Tazawa *et al.*, demonstraram que o mRNA de IL-13 (mas não de IL-4) está significativamente suprarregulado em lesões de pele sub-agudas e crónicas de doentes com dermatite atópica (Tazawa *et al.*, *Arch. Derm. Res.* 2004 296: 459). A frequência de células T CD4+ e CD8+ circulantes que expressam IL-13 está também significativamente aumentada nesses doentes (Aleksza *et al.*, *British J. Dermatol.* 2002 147: 1135). Crê-se que esta actividade de IL-13 aumentada

resulte em níveis aumentados de IgE sérica, contribuindo desse modo para a patogénese de dermatite atópica. Além disso, a produção aumentada de IL-13 por células T CD4+ neonatais é um marcador útil para identificar recém-nascidos sob risco de desenvolvimento subsequente de doenças alérgicas, esp. dermatite atópica (Oshima *et al.*, *Pediatr. Res.* 2002 51: 195). A evidência adicional para a importância de IL-13 na etiologia de dermatite atópica foi proporcionada por Simon *et al.*, *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004 114: 887); tratamento tópico com pomada de tacrolimus (uma fármaco imunossupressor que inibe as vias de sinalização intracelular para a produção de citocina) resultou na melhora significativa clínica e histológica de lesões de pele atópicas acompanhadas por significativas reduções na expressão local de citocinas Th2, incluindo IL-13. Além disso, foi demonstrado que IL-13 R α 1 (uma proteína de superfície celular que, juntamente com IL-4R α , forma um receptor funcional para IL-13) é sobreexpresso em queratinócitos suprabasais na pele de doentes com dermatite atópica e a IL-13 foi capaz de sobrerregular o mRNA de IL-13 R α 1 *in vitro* (Wongpiyabovorn *et al.*, *J. Dermatol. Science* 2003 33: 31). Estes dados indicam colectivamente que intervenções direcionadas para IL-13, incluindo um anticorpo monoclonal contra IL-13, podem proporcionar uma abordagem eficaz para o tratamento de doença alérgica humana.

Eosinofilia esofágica

A acumulação de eosinófilos no esófago é um problema médico comum em doentes com diversas doenças, incluindo doença de refluxo gastro-esofágico, esofagite eosinofílica, gastroenterite eosinofílica e infecções parasíticas. A eosinofilia esofágica

está associada com respostas alérgicas e a exposição repetida de murganhos a aeroalergéneos estabeleceu uma ligação entre a inflamação de via respiratória alérgica e a eosinofilia esofágica. Crê-se que as células Th2 induzem inflamação associada a eosinófilos através da secreção de um conjunto de citocinas incluindo IL-4 e IL-13 que activam vias inflamatórias e efectoras tanto directamente como indirectamente. A IL-13 parece ser particularmente importante porque ela é produzida em quantidades elevadas por células Th2 e regula características múltiplas de doenças alérgicas (e. g., a produção de IgE, superprodução de muco, recrutamento e sobrevivência de eosinófilos e hiperreactividade da via respiratória). Os eosinófilos podem gerar IL-13 activa funcionalmente após exposição a GM-CSF e/ou IL-5 sob condições *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* em respostas inflamatórias eosinofílicas. (Schmid-Grendelmeier *J. Immunology* 2002 169: 1021-1027). A IL-13 distribuída para o pulmão de murganhos do tipo selvagem deficientes em IL-5 ou eotaxina, STAT-6, por administração intratraqueal, estabeleceu que a inflamação pulmonar, desencadeada por IL-13, está associada com o desenvolvimento de eosinofilia esofágica (Mishra *et al.*, *Gastroenterol.* 2003 125: 1419). Em conjunto, esses dados proporcionam evidência de uma função de IL-13 na eosinofilia esofágica.

Indicações oncológicas

Uma outra área importante de interesse está em utilizar IL-13 ou receptores de IL-13 para inibir o crescimento de certos tipos de tumores. Crê-se que as defesas do hospedeiro mediadas por células T do tipo 1 medeiam a rejeição óptima a tumor *in vivo* e o desvio para uma resposta do tipo Th2 pode contribuir

para bloquear a rejeição a tumor e/ou a promoção de recorrência de tumor (Kobayashi M *et al.*, *J. Immunol.* 1998 160: 5869). Muitos estudos em animais utilizando linhas de células de tumor transplantáveis apoiam esta noção demonstrando que Stat6, IL-4 e IL-13 (produzidas em parte por células NKT) foram capazes de inibir a rejeição de tumor (Terabe *et al.*, *Nat. Immunol.* 2000 1: 515; Kacha *et al.*, *J. Immunol.* 2000 165: 6024-28; Ostrand-Rosenberg *et al.*, *J. Immunol.* 2000 165: 6015). Crê-se que a potente actividade antitumor na ausência de Stat-6 é devida ao aumento da produção de IFN γ específico para tumor e à actividade de CTL. Além disso, foi demonstrado que uma perda de células NKT reduz a produção de IL-13 com um aumento concomitante na recorrência de tumor, indicando que a IL-13 produzida, em parte, por células NKT, é importante para a imunovigilância (Terabe *et al.*, *Nat. Immunol.* 2000 1: 515). Deste modo, estas observações sugerem que inibidores de IL-13 ou novos antagonistas de IL-13 incluindo o mAb para IL-13, podem ser eficazes como imunoterapêuticos de cancro interferindo com a actividade regulatória negativa de IL-13 na sobrerregulação de respostas imunitárias a células tumorais.

Além do reforço das defesas antitumorais associadas a Th do tipo 1, inibidores de IL-13 podem também ser capazes de bloquear o crescimento celular tumoral mais directamente. Por exemplo, na leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL) e doença de Hodgkin, a IL-13 ou bloqueia a apoptose ou promove a proliferação celular tumoral (Chaouchi *et al.*, *Blood* 1996 87: 1022; Kapp *et al.*, *J. Exp. Med.* 1999, 189: 1939). A B-CLL é uma doença clinicamente heterogênea, que tem origem em linfócitos B, que envolvem deficiência apoptótica em células leucémicas. Não se crê que a IL-13 actue como um factor de crescimento directo, mas que protege células tumorais de apoptose espontânea *in vitro*

(Chaouchi *et al.*, *Blood* 1996 87: 1022; Lai *et al.*, *J. Immunol.* 1999: 162: 78) e que pode contribuir para a B-CLL evitando a morte celular neoplásica.

A doença de Hodgkin é um tipo de linfoma que afeta primariamente adultos jovens e representa cerca de 7500 casos por ano nos Estados Unidos. O cancro é caracterizado pela presença de células de Hodgkin/Reed-Sternberg (H-RS) multinucleadas grandes. Na grande maioria dos casos, a população de células malignas surge a partir de células B. Muitas linhagens celulares derivadas de doença de Hodgkin, assim como tecido de gânglio linfático obtido de doentes com linfoma de Hodgkin, sobre-expressam IL-13 e/ou receptores de IL-13. (Kapp *et al.*, *J. Exp. Med.* 1999, 189: 1939; Billard *et al.* *Eur. Cytokine Netw.* 1997; 8: 19; Skinnider *et al.*, *Blood* 2001; 97: 250; Oshima *et al.*, *Cell Immunol.* 2001; 211: 37). Demonstrou-se que mAb anti-IL-13 neutralizadores ou antagonistas de IL-13 inibem a proliferação de células H/RS de um modo dependente da dose (Kapp *et al.*, *J. Exp. Med.* 1999, 189: 1939; Oshima *et al.*, *Cell Immunol.* 2001; 211: 37). De modo semelhante, a distribuição do receptor chamariz IL-13Ra2 solúvel para murganhos NOD/SCID com uma linha de células implantadas derivadas da doença de Hodgkin retardou o início e crescimento de tumor e melhorou a sobrevivência, demonstrando que a neutralização de IL-13 pode suprimir o crescimento de linfoma de Hodgkin *in vitro* e *in vivo* (Trieu *et al.*, *Cancer Research* 2004, 64: 3271). Colectivamente, estes estudos indicam que a IL-13 estimula a proliferação de células H/RS de um modo autócrino (Kapp *et al.*, *J. Exp. Med.* 1999, 189: 1939; Oshima *et al.*, *Histopathology* 2001; 38: 368).

A neutralização de IL-13 pode, portanto, representar um tratamento eficaz e atractivo para a doença de Hodgkin e outros

cancros associados às células B pela inibição de crescimento celular tumoral enquanto, ao mesmo tempo, melhora as defesas antitumorais.

Doenças Intestinais Inflamatórias

Há uma possível função para IL-13 na patogénese de doença intestinal inflamatória (IBD). A doença intestinal inflamatória compreende várias doenças classificadas clinicamente como colite ulcerativa, doença de Crohn e colite indeterminada. A sua principal manifestação é inflamação intestinal crónica devido a uma resposta imunitária exagerada com um desequilíbrio na activação de linfócitos Th1 e Th2 na mucosa intestinal. Isto foi demonstrado em modelos animais da doença de Crohn (Bamias et al., *Gastroenterol* 2005; 128: 657) e de colite ulcerativa (Heller et al., *Immunity* 2002; 17: 629). A neutralização de IL-13 por administração de IL-13R α 2-Fc evitou a colite num modelo de Th2 de murino da colite ulcerativa humana (Heller et al., *Immunity* 2002; 17: 629). Além disso, a produção de IL-13 substitui rapidamente a de IL-4 neste modelo e a produção de IL-13 pode ser induzida por estimulação de células NKT, sugerindo que a lesão tecidual pode resultar de actividade tóxica de IL-13 nas células epiteliais. Há alguns dados humanos para apoiar estas observações: a frequência de amostras de biópsia rectal positiva para IL-13 de doentes com colite ulcerativa foi significativamente maior do que a de indivíduos controlo, inflamatórios e não inflamatórios, e uma alta taxa de expressão de IL-4 e IL-13 foi observada na colite ulcerativa aguda e não aguda (Inoue et al., *Am. J. Gastroenterol* 1999; 94: 2441). Além disso, Akido et al., caracterizaram a actividade imunitária na musculatura externa de segmentos intestinais de doentes com

doença de Crohn e verificaram que IL-4 e IL-13 mediavam a hipercontratibilidade das células de músculo intestinais através de uma via STAT-6. A requerente concluiu que esta via pode contribuir para a hipercontratibilidade de músculos intestinais na doença de Crohn (Akiho *et al.*, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2005; 288: 619).

Assim, um mAb IL-13, possivelmente em combinação com moléculas direcionadas a outras citocinas, pode proporcionar uma abordagem para interromper ou diminuir a progressão de IBD.

Psoríase e Artrite Psoriática

A psoríase é uma doença de pele crónica caracterizada por hiper-proliferação de queratinócitos e por um infiltrado celular imunológico, incluindo células T activadas, produzindo várias citocinas que podem influenciar o fenótipo de queratinócitos epidérmicos. A CDw60 é uma molécula portadora de hidrato de carbonos que é sobrerregulada na superfície de queratinócitos basais e suprabasais psoriáticos de pele psoriática. Demonstrou-se que a IL-4 e a IL-13 secretadas por células T derivadas de lesões psoriáticas sobrerregulam fortemente a expressão de CDw60 em queratinócitos, (Skov *et al.*, *Am. J. Pathol.* 1997; 15: 675), enquanto o interferão-gama bloqueou a indução mediada por IL-4/IL-13 de CDw60 em queratinócitos em cultura (Huang *et al.*, *J. Invest. Dermatol.* 2001; 116: 305). Assim, crê-se que a expressão de CDw60 em queratinócitos epidérmicos psoriáticos seja induzida, pelo menos, em parte, por IL-13 secretada por células T activadas na lesão. Além disso, IL-13 R α 1 e IL-4R α , as proteínas de superfície celular que em conjunto formam um complexo receptor para IL-13 são expostas diferentemente em

biópsias de pele de doentes com e sem psoríase (Cancino-Diaz *et al.*, *J. Invest. Dermatol.* 2002; 119: 1114; Wongpiyabovorn *et al.*, *Dermatol. Science* 2003; 33: 31) e experiências *in vitro* demonstraram que IL-13 (mas não IL-4) poderia sobrerregular a expressão de IL-13R α 1 (Wongpiyabovorn *et al.*, *Dermatol. Science* 2003; 33: 31). Já que IL-13 tem um efeito numa variedade de tipos celulares, estes estudos sugerem que o receptor de IL-13 pode ter uma parte no processo inflamatório inicial da psoríase.

A artrite psoriática é caracterizada por sinovite que é mediada tanto por citocinas pró-inflamatórias como por anti-inflamatórias. A função de IL-13 em várias formas de artrite tem recebido maior interesse. Spadaro *et al.*, observaram níveis significativamente maiores de IL-13 no líquido sinovial de doentes com artrite psoriática e artrite reumatóide do que em doentes com osteoartrite. Além disso, os níveis no líquido sinovial de IL-13 estavam significativamente maiores que os do soro de doentes com artrite psoriática e a proporção de líquido sinovial/soro de IL-13 foi notavelmente maior no grupo com artrite psoriática que no grupo com artrite reumatóide, sugerindo um possível papel para a IL-13 produzida localmente em tecidos sinoviais de doentes com artrite psoriática (Spadaro *et al.*, *Ann. Rheum. Dis.* 2002; 61: 174).

Potencial função de IL-13 noutros estados

A doença aguda enxerto-versus-hospedeiro é uma causa séria de morbidez e mortalidade após transplante de células estaminais e está directamente relacionada com o grau de incompatibilidade com o antigénio de leucócito humano (HLA) entre dador e receptor. Jordan *et al.*, identificaram primeiro o IL-13 como uma

citocina TH2 típica que é produzida abundantemente durante MLR (reação de linfócitos mistos; um ensaio *in vitro* para ajuste fino de selecção de dador após tipagem de HLA inicial) não relacionadas, não coincidentes (Jordan *et al.*, *J. Immunol. Methods*; 2002; 260: 1). O mesmo grupo mostrou subsequentemente que a produção de IL-13 por células-T do dador prevê a doença aguda de enxerto-versus-hospedeiro (aGVHD) após transplante de células estaminais de dador não relacionado (Jordan *et al.*, *Blood* 2004; 103: 717). Todos os doentes com aGVHD grave de grau III, após transplante de células estaminais, tiveram dadores que produziram respostas de IL-13 pré-transplante muito elevadas, demonstrando uma ligação significativa entre os níveis de IL-13 e aGVHD e aumentando a possibilidade de que IL-13 possa ser directamente responsável por parte da patologia associada a aGVHD. Consequentemente, uma terapia baseada no bloqueio específico de IL-13 pode ser útil para o tratamento de aGVHD pós-transplante de células estaminais.

A nefropatia diabética é uma das principais causas de doença renal de estágio terminal no mundo ocidental. Embora, a incidência de nefropatia devido a diabetes tipo 1 esteja a diminuir, a diabetes mellitus tipo 2 é agora a causa singular mais comum de insuficiência renal nos EUA, Japão e Europa. Além disso, esse grupo de doentes tem um prognóstico muito fraco em diálise de manutenção devido à mortalidade extremamente alta causada por eventos cardiovasculares. Está cada vez mais claro que mudanças hemodinâmicas, metabólicas e estruturais estão interligadas e foram identificadas várias enzimas, factores de transcrição e factores de crescimento que têm um papel na patogénese desta doença. Particularmente, a TGF- β é importante no desenvolvimento de hipertrofia renal e acumulação de componentes de matriz extracelular e é considerada a citocina

pivô na mediação da formação de colágeno no rim (Cooper. *Diabetologia* 2001; 44: 1957; Wolf. *Eur. J. Clin. Invest.* 2004; 34 (12): 785). Na nefropatia diabética humana e experimental, a bioactividade de TGF-1 está aumentada e a administração de anticorpos de TGF- β 1 a murganho diabético levou a melhoria na função renal e acumulação reduzida de matriz extracelular. Foi recentemente demonstrado que a IL-13, num modelo de murganho transgénico de fibrose pulmonar, mediava os seus efeitos, pelo menos, em parte, pela regulação da produção e activação de TGF- β i e deposição de colágeno (Lee *et al.*, *J. Exp. Med.* 2001; 194: 809; Zhu *et al.*, *J. Clin. Invest.* 1999; 103: 779), estabelecendo, desse modo, uma ligação funcional directa entre IL-13 e TGF- β . Consequentemente, pode ser prevista uma função semelhante para IL-13 na regulação da actividade de TGF- β 1 no rim diabético e as intervenções direccionadas por IL-13 poderiam potencialmente ter uma função na gestão da nefropatia diabética.

Estudos Fibróticos

A fibrose pulmonar é uma estado de cicatrização dos pulmões inadequada e prejudicial, levando à deficiência e frequentemente à morte. O termo abrange uma variedade de doenças diferentes com etiologias, patologias e respostas ao tratamento distintas. Em alguns casos, a causa da fibrose é identificada. As causas incluem: (1) material pró-fibrótico inalado tal como amianto ou silício, ou pó metálico duro (2) material orgânico inalado ao qual o doente tem uma resposta imunológica idiossincrática levando à fibrose (e. g., pulmão de agricultor) (3) fármacos, tal como nitrofurantoína, amiodarona e metotrexato (4) em associação com uma doença inflamatória sistémica, tal como Esclerose Sistémica ou Artrite Reumatóide.

No entanto, em muitos casos, nenhuma causa ou estado latente é identificada. Muitos destes doentes são diagnosticados com fibrose pulmonar idiopática (IPF). Esta é uma doença relativamente rara (prevalência de 20/100000). O diagnóstico é baseado na ausência de uma causa identificada combinada com certas características radiológicas e patológicas, particularmente dividindo em forma de favo no CT ou biópsia de pulmão. A doença é geralmente vista em doentes mais velhos (>50) e frequentemente segue um curso implacável de comprometimento pulmonar progressivo levando à morte, com a sobrevivência média prevista de 2-5 anos. Além disso, os doentes têm a experiência mais desagradável de falta de ar que progride por meses ou anos. Isto inicialmente restringe a actividade física, mas na fase terminal - que pode durar muitos meses - o doente está sem fôlego mesmo em repouso e, além disso, é dependente de oxigénio.

Actualmente não existe tratamento satisfatório para esta doença. O tratamento actual geralmente tem a forma de corticosteróides e imunossupressores tal como azatioprina. No entanto, os corticosteróides podem ser ineficazes em muitos dos doentes e os seus efeitos colaterais podem tornar a situação pior. Há muitos tratamentos potenciais sob investigação incluindo interferão gama, que mostrou uma tendência a melhorar a sobrevivência num grande estudo recente, e a perfenidona.

Existe evidência que IL-13 e citocinas associadas com o fenótipo Th2 estejam envolvidas no processo de fibrose na reparação de tecidos (Wynn T.A., *Nat. Rev. Immunol.* 2004 4: 583-594; Jakubzick *et al.*, *Am. J. Pathol.* 2004 164(6): 1989-2001; Jakubzick *et al.*, *Immunol. Res.* 2004 30 (3): 339-349; Jakubzick *et al.*, *J. Clin. Pathol.* 2004 57: 477-486). A IL-13 e a IL-4

foram implicadas numa variedade de estados fibróticos. A fibrose hepática induzida por *Schistosoma* parece ser dependente de IL-13 e há evidência limitada de que IL-13 esteja envolvida na patogénese de escleroderma (Hasegawa *et al.*, *J. Rheumatol.* 1997 24: 328-332; Riccieri *et al.*, *Clin. Rheumatol.* 2003 22: 102-106).

Em termos de fibrose pulmonar, os estudos *in vitro* mostraram que IL-13 promove um fenótipo fibrogénico. Estudos animais mostraram níveis elevados de expressão de IL-13 em modelos de fibrose induzidos artificialmente e que a fibrose pode ser reduzida pela eliminação de IL-13.

A IL-13 promove um fenótipo fibrótico. A nível celular, existem muitos mecanismos pelos quais a IL-13 pode promover a fibrose. As vias de sinalização e a importância desses vários mecanismos não estão bem definidos.

Existe evidência de que a IL-13 actua no fibroblasto tanto para promover a produção de colagénio como para inibir a sua decomposição, favorecendo assim um fenótipo fibrótico. Os fibroblastos de pele possuem receptores de IL-13 e a exposição de fibroblastos de pele em cultura a IL-13 leva à sobreexpressão de produção de colagénio (Oriente *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000 292: 988-994). A IL-4 também tem um efeito semelhante, mas mais transitório. Uma linhagem celular de fibroblasto pulmonar humano (ICIG7) expressa o receptor de IL-4 do tipo II (Jinnin *et al.*, *J. Biol. Chem.* 2004 279: 41783-41791). A exposição destas células a IL-13 promove a secreção de uma variedade de mediadores inflamatórios e pró-fibróticos: GM-CSF, G-CSF, integrina VCAM beta 1 (Doucet *et al.*, *Int. Immunol.* 1998 10(10): 1421-1483).

A IL-13 inibe a produção de proteína de metaloproteinases 1 e 3 de matriz induzida por IL-1 α por fibroblastos de pele que tenderiam a reduzir a decomposição da matriz EC (Oriente et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000 292: 988-994). A IL-13 actua sinergisticamente com a TGF- β em fibroblastos humanos obtidos por biópsia de vias respiratórias asmáticas para promover a expressão do inibidor tecidual de metaloproteinase 1 (TIMP-1). A decomposição da matriz extracelular é promovida por metaloproteinases de matriz, que são inibidas por TIMP-1. Esta acção de IL-13 poderia assim, tender a reduzir a degradação da matriz (Zhou et al., *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2005 288: C435-C442).

A sobre-expressão de IL-13 em murganhos transgénicos leva à fibrose subepitelial, hipertrofia celular epitelial, hiperplasia de célula caliciforme, deposição de cristal (quitinase ácida de mamífero), hiperresponsividade de vias respiratórias, fibrose intersticial, hipertrofia celular tipo 2 e acumulação de agentes tensioativos (Zhu et al., *J. Clin. Invest.* 1999 103(6): 779-788).

Diferentes estirpes de murganhos têm diferentes susceptibilidades à fibrose pulmonar induzida por bleomicina. Os murganhos C57B1/6J, que são susceptíveis, apresentam sobrerregulação rápida de IL-13, IL-13R α e IL-4 (assim como, TGF β , TNFR α e IL1R) em resposta a bleomicina. Os murganhos BALB/c, que não são susceptíveis, não mostram a sobrerregulação de IL-13.

Belperio et al., (*Am. J. Respir. Cell Mol.* 2002 27: 419-427) estudaram a expressão e função de IL-13, IL-4 e da quimiocina

CC C10 num modelo de fibrose por bleomicina em murganho. Os níveis teciduais pulmonares tanto de IL-13 como de IL-4 aumentaram em resposta à bleomicina. A neutralização anterior de IL-13 utilizando anticorpos policlonais anti-IL-13 reduziu significativamente a fibrose pulmonar em resposta à bleomicina como avaliado por níveis de hidroxiprolina pulmonar. Apesar da expressão aumentada de IL-4 no mesmo modelo, a neutralização de IL-4 não teve efeito na fibrose pulmonar.

Num outro modelo de fibrose pulmonar aguda induzida por FITC no murganho BALB/c, a ausência de IL-13 (em murganhos silenciados), mas não de IL-4, protegeu contra a fibrose pulmonar. Não há protecção adicional de silenciamento de IL-4 em silenciados de IL-13 (Kolodsick *et al.*, *J. Immunol.* 2004 172: 4068-4076). O efeito protector da ausência de IL-13 não é devido a uma diferença no recrutamento celular para o pulmão: em todos os silenciados e BALB/c os números de células totais recrutadas são semelhantes e, então, o componente inflamatório inicial parece não ser afectado. O recrutamento de eosinófilos é menor em silenciados de IL-4 e IL-13 em comparação com BALB/c, mas já que os IL-4 -/- não foram protegidos contra a fibrose, isto não pode explicar a diferença na fibrose. Talvez surpreendentemente, não houve diferença nos níveis de citocinas entre IL-13 +/+ e -/-, incluindo para IL-10, MCP-1, interferão gama, TGF- β . Além disso, o mesmo número de fibroblastos foi isolado de pulmões dos diferentes animais pós-FITC, mas nos murganhos IL-13 -/- a produção de colagénio I foi reduzida. Isto indica que a perda de IL-13 não está simplesmente a prevenir a resposta inflamatória, mas, em vez disso, tem uma função anti-fibrótica mais específica. Foi sugerido que IL-13 poderia exercer seu efeito fibrótico através de TGF- β (Lee *et al.*, *J. Exp. Med.* 2001; 194: 809-821). No entanto, neste modelo de FITC a expressão de TGF- β

não foi reduzida em murganhos silenciados para IL-13.

Pode-se esperar que a interleucina 4 exerça um efeito semelhante como IL-13 já que ambas actuam através do mesmo receptor. A IL-4 é significativamente sobrerregulada nos pulmões de murganhos com fibrose pulmonar induzida por bleomicina (Gharaee-Kermani *et al.*, Cytokine 2001 15: 138-147). No entanto, comparando a fibrose pulmonar induzida por bleomicina em murganhos C57BL6/J que sobre-expressam IL-4, os silenciados IL-4 e selvagens, Izbicki *et al.*, (*Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2002 283(5): L1110-L1116) não encontraram evidência de que IL-4 estivesse envolvida na fibrose pulmonar. A fibrose não foi reduzida em silenciados de IL-4 e os murganhos sobre-expressando IL-4 aumentaram os níveis de fibrose.

Os níveis de citocina BAL de IL-13 estão significativamente elevados em doentes com uma variedade de formas de fibrose pulmonar, embora com variabilidade considerável. A expressão de IL-13 é sobrerregulada significativamente em macrófagos alveolares obtidos de doentes com fibrose pulmonar.

A evidência clínica mais forte vem da pesquisa na Universidade de Michigan. Jakubzick e colegas estudaram a expressão génica de IL-13 e de IL-4 e dos seus receptores em biópsias pulmonares cirúrgicas de doentes com fibrose pulmonar. A expressão génica de IL-13 é notavelmente maior em amostras de pulmão afectado por IPF que em pulmão de normais ou de outros estados fibróticos pulmonares. Os fibroblastos cultivados de doentes com IPF/UIP mostram a expressão aumentada do receptor de IL-13 e de IL-4, em comparação com biópsias obtidas de tecido e fibroblastos de doentes com pulmões normais ou outras formas de fibrose pulmonar. Em particular, os focos fibroblásticos, que

presumivelmente são o epicentro de actividade da doença, coram particularmente forte para esses receptores (Jakubzick *et al.*, *J. Immunol.* 2003 171: 2684-2693; Jakubzick *et al.*, *Am. J. Pathol.* 2003 162: 1475-1486; Jakubzick *et al.*, *Am. J. Pathol.* 2004 164(6): 1989-2001; Jakubzick *et al.*, *Immunol. Res.* 2004 30(3): 339-349; Jakubzick *et al.*, *J. Clin. Pathol.* 2004 57: 477-486).

Existe boa evidência *in vitro* de que as citocinas Th2, em geral e IL-13, em particular, promovem um fenótipo pró-fibrótico. Em, pelo menos, 2 modelos animais foi demonstrado que a fibrose induzida quimicamente pode ser reduzida pela eliminação de IL-13 (em silenciado génico ou por anticorpos anti-IL-13). Algumas evidências indicam que IL-13 é mais importante na promoção de fibrose pulmonar que IL-4. A evidência clínica para a função de IL-13 na fibrose pulmonar sugere que IL-13 e os seus receptores não são regulados nos pulmões de doentes com IPF.

Um número crescente de dados sugere uma função importante para terapias baseadas em IL-13 para o tratamento de uma variedade de estados fibróticos, incluindo fibrose hepática induzida por esquistossomose e várias formas de fibrose pulmonar (e. g., IPF [discutido noutro lugar], escleroderma).

As experiências em que IL-4 e IL-13 foram inibidas identificaram separadamente IL-13 como a citocina efectora dominante de fibrose em muitos modelos (Chiaramonte *et al.*, *J. Clin. Invest.* 1999 104: 777-785; Blease *et al.*, 32: 1104). Na esquistossomose, embora a resposta inflamatória induzida por ovo não seja afectada pelo bloqueio de IL-13, a deposição de

colagénio diminuiu mais de 85% em animais infectados cronicamente (Chiaramonte *et al.*, *J. Clin. Invest.* 1999 104: 777-785; Chiaramonte *et al.*, *Hepatology* 2001 34: 273) apesar da produção continuada e não diminuída de IL-4.

A sequência de aminoácidos para hIL-13 é apresentada como SEQ ID N°: 9. (Esta é a sequência proteica madura, isto é, nenhuma sequência sinal está presente).

Um cDNA codificando hIL-13 é apresentado na SEQ ID N°: 10. (Esta é a sequência de DNA para a sequência proteica madura, isto é, nenhuma sequência sinal está presente).

Recentemente, foram descritas vacinas que aumentam respostas imunitárias contra IL-13 para o tratamento de asma (documento WO 02/070711). Uma função para IL-13 na sensibilização da pele para alérgenos ambientais também foi descrita recentemente (Herrick *et al.*, *The Journal of Immunology*, 2003, 170: 2488-2495).

A presente invenção proporciona, *inter alia*, um anticorpo referido como 6A1. Como demonstrado a seguir, a ligação de 6A1 com hIL-13 parece dependente da presença de arginina na posição 107 da SEQ ID N°: 9. A arginina na posição 107 da SEQ ID N°: 9 é relatada como sendo um resíduo importante envolvido na interação hIL-13/hIL-13R. Thompson J. P e Debinski W (1999) *J. Biol. Chem.*, 274(42): 29944-29950 disseram "Foi verificado que os ácidos glutâmicos nas posições 13 e 16 na α -hélice A hIL13, arginina e serina nas posições 66 e 69 na hélice C, e arginina na posição 109 na hélice D eram importantes na indução de sinalização biológica uma vez que a sua mutação específica resultou na perda e/ou ganho do fenómeno da função." (Ver resumo

e divulgação completa). A arginina na posição 109 deste artigo é equivalente à 107 na SEQ ID N°: 9 da presente descrição devido a uma abordagem de numeração diferente utilizada pela presente requerente em relação àquela utilizada pelos autores deste artigo. Assim a ligação de 6A1 com hIL-13 envolve um dos resíduos em hIL-13 previamente identificados como sendo importantes na interacção hIL-13/hIL-13R e, portanto, a sinalização biológica da via de IL-13.

Resumo da Invenção

A presente invenção proporciona, portanto, um anticorpo terapêutico ou um seu fragmento de ligação a antigénio que se liga especificamente a hIL-13 e inibe a interacção entre hIL-13 e hIL-13R e compreende a seguinte CDRH3: SEQ ID N°:3. Esta inibição inclui, mas não está limitada a, inibição competitiva. Em certas formas de realização, os anticorpos da invenção inibem, pelo menos, a interacção entre hIL-13 e hIL-13R mas podem também bloquear a interacção entre hIL-13 e hIL-13R, desacoplando, deste modo, a via de sinalizaçãoi hIL-13/hIL-13R.

O termo “liga-se especificamente”, como utilizado por ao longo da presente descrição em relação a anticorpos e seus fragmentos de ligação a antigénio da invenção, significa que o anticorpo liga-se a hIL-13 com nenhuma ou insignificante ligação a outras proteínas humanas e, em particular, IL-4 humana. O termo contudo não exclui o facto de que os anticorpos da invenção também podem reagir de forma cruzada com IL-13 de cinomólogo.

Noutro aspecto do pedido é proporcionado um anticorpo terapêutico ou seu fragmento de ligação a antigénio que se liga especificamente a hIL-13 e compreende uma CDRH3 que é uma variante da sequência apresentada na SEQ ID N°: 3, em que um ou dois resíduos na referida CDRH3 da referida variante difere do resíduo na posição correspondente na SEQ ID N°: 3.

Noutro aspecto da presente invenção é proporcionado um anticorpo terapêutico ou seu fragmento de ligação a antigénio que se liga especificamente a hIL-13 e compreende as seguintes CDR:

CDRH1: SEQ ID N°: 1

CDRH2: SEQ ID N°: 2

CDRH3: SEQ ID N°: 3

CDRL1: SEQ ID N°: 4

CDRL2: SEQ ID N°: 5

CDRL3: SEQ ID N°: 6

Ao longo desta descrição, os resíduos de aminoácidos em sequências de anticorpos são numerados de acordo com o esquema de Kabat. De modo semelhante, os termos "CDR", "CDRL1", "CDRL2", "CDRL3", "CDRH1", "CDRH2", "CDRH3" seguem o sistema de numeração de Kabat como apresentado em Kabat *et al.*, Sequences of proteins of Immunological Interest NIH, 1987. "CDRH1" é tomada por ser o trecho de sequência que inclui tanto a definição de Kabat de CDRH1 (resíduos 31-35B) como também a definição de CDRH1 de Chothia (Chothia *et al.*, (1989); Conformations of immunoglobulins hypervariable regions; *Nature* 342: 877-883) que compreende Kabat 26-32. Deste modo, o que se segue define as CDR de acordo com a invenção:

CDR:	Resíduos
CDRH1:	26-35B
CDRH2:	50-65
CDRH3:	95-102
CDRL1:	24-34
CDRL2:	50-56
CDRL3:	89-97

Noutro aspecto da invenção é proporcionado um anticorpo terapêutico ou seu fragmento de ligação a antigénio compreendendo um domínio VH possuindo a sequência mostrada na SEQ ID N°: 7 e um domínio VL possuindo a sequência mostrada na SEQ ID N°: 8.

Noutro aspecto da invenção é proporcionado um domínio VH isolado de um anticorpo compreendendo (ou consistindo essencialmente em, ou consistindo em) SEQ ID N°: 7 ou 11, 12, 13, 14.

Noutro aspecto da invenção é proporcionado um anticorpo terapêutico ou seu fragmento de ligação a antigénio compreendendo um domínio VH selecionado do grupo consistindo em SEQ ID N°: 7 ou 11, 12, 13, 14.

Noutro aspecto do presente pedido é proporcionado um anticorpo terapêutico ou seu fragmento de ligação a antigénio que inibe competitivamente a ligação do anticorpo terapêutico compreendendo a CDRH3 de SEQ ID N°: 3 a hIL-13.

Noutro aspecto do pedido é proporcionado um anticorpo terapêutico ou seu fragmento de ligação a antigénio que inibe

competitivamente a ligação do anticorpo terapêutico compreendendo CDR de SEQ ID N°: 1, 2, 3, 4, 5 e 6 a hIL-13.

Noutro aspecto do pedido é proporcionado um anticorpo terapêutico ou seu fragmento de ligação a antigénio que inibe competitivamente a ligação do anticorpo terapêutico compreendendo uma cadeia pesada de SEQ ID N°: 18 e uma cadeia leve de SEQ ID N°: 22 para hIL-13.

De acordo com a presente invenção é proporcionado um anticorpo terapêutico humanizado, cujo anticorpo compreende um domínio VH selecionado do grupo consistindo em: SEQ ID N°: 11, 12, 13, 14 e um domínio VL selecionado do grupo consistindo em: SEQ ID N°: 15, 16.

É também proporcionada a utilização de um anticorpo da invenção na preparação de um medicamento para o tratamento de uma doença ou distúrbio responsivo à modulação da interacção entre hIL-13 e hIL-13R.

Noutro aspecto da presente invenção é proporcionado um anticorpo terapêutico que se liga especificamente à IL-13 humana, anticorpo este que se liga especificamente à IL-13 humana entre os resíduos 97 a 108 da SEQ ID N°: 9. Como é óbvio para os especialistas na técnica com base nos resultados divulgados a seguir, "entre os resíduos 97 a 108 da SEQ ID N°: 9" é inclusivo das posições 97 e 108.

Noutro aspecto do presente pedido é proporcionado um anticorpo terapêutico que inibe competitivamente a ligação do anticorpo terapêutico possuindo CDRH3 de SEQ ID N°: 3 a IL-13 humana (tal como um anticorpo terapêutico compreendendo uma cadeia pesada de SEQ ID N°: 18 e uma cadeia leve de SEQ ID N°:

22), anticorpo competidor este que se liga especificamente a IL-13 humana entre os resíduos 97 a 108 da SEQ ID N°: 9.

Noutro aspecto do presente pedido é proporcionado um anticorpo terapêutico que se liga especificamente à IL-13 humana entre os resíduos 103 a 107 inclusivamente, da SEQ ID N°: 9 e modula (e. g., inibe ou bloqueia) a interacção entre hIL-13 e hIL-13R.

Numa forma de realização do pedido é proporcionada uma composição farmacêutica compreendendo uma pluralidade de anticorpos monoclonais terapêuticos (que são tipicamente humanos ou humanizados) que se ligam especificamente à hIL-13 entre os resíduos 103 a 107, da SEQ ID N°: 9 e modulam (e. g., inibem ou bloqueiam) a interacção entre hIL-13 e hIL-13R e um veículo farmacêutico aceitável.

É também proporcionado um método de produção de um anticorpo terapêutico que se liga especificamente a hIL-13 entre os resíduos 103 a 107 de SEQ. ID. N°:9 e modula (e. g., inibe ou bloqueia) a interacção entre hIL-13 e hIL-13R, método este que compreende o passo de cultivar num meio de cultura isento de soro, uma célula hospedeira recombinante compreendendo um primeiro e segundo vector, em que o referido primeiro vector compreende um polinucleótido que codifica a cadeia pesada do referido anticorpo e o referido segundo vector compreende um polinucleótido que codifica a cadeia leve do referido anticorpo. Como será óbvio para o especialista na técnica com base nos resultados a seguir “entre 103 a 107 de SEQ. ID. N°:9” inclui as posições 103 e 107.

Noutra forma de realização do pedido é proporcionado um método para produzir um anticorpo terapêutico que se liga especificamente a hIL-13 entre os resíduos 103 até 107, da SEQ ID N°: 9 e modula (e. g., inibe ou bloqueia) a interação entre hIL-13 e hIL-13R, método este que compreende o passo de cultivar em meios de cultura isento de soro, uma célula hospedeira recombinante compreendendo um primeiro e um segundo vector, em que o referido primeiro vector compreende um polinucleótido que codifica a cadeia pesada do referido anticorpo e o referido segundo vector compreende um polinucleótido que codifica a cadeia leve do referido anticorpo.

Noutra forma de realização do pedido é proporcionado um anticorpo terapêutico intacto que se liga a hIL-13 e modula (e. g., inibe ou bloqueia) a interação entre hIL-13 e hIL-13R, anticorpo este que interage com o resíduo 107 da SEQ ID N°: 9.

Noutra forma de realização o pedido é proporcionado um anticorpo terapêutico intacto que se liga a hIL-13 e modula (e. g., inibe ou bloqueia) a interação entre hIL-13 e hIL-13R, em que a ligação entre o referido anticorpo terapêutico e hIL-13 depende de (ou se correlaciona positivamente com) a presença de um resíduo de arginina na posição 107 da SEQ ID N°: 9.

Noutra forma de realização é proporcionado um anticorpo terapêutico que se liga especificamente a hIL-13 e modula (e. g., inibe ou bloqueia) a interação entre hIL-13 e hIL-13R e tem uma constante de dissociação k_{off} no intervalo de $1,4 \times 10^{-4}$ a $8,22 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (e. g., como medido por Biacore™). Este anticorpo compreende uma CDRH3 de SEQ ID N°: 3 e pode ainda compreender, além da SEQ ID N°: 3, as SEQ ID N°: 1, 2, 4, 5 e 6.

Noutra forma de realização é proporcionado um anticorpo que se liga especificamente a hIL-13 e inibe a interacção entre hIL-13 e hIL-13R, anticorpo esse que compreende CDRH3 de SEQ ID N°: 3 e opcionalmente compreende ainda cada CDRH1 de SEQ ID N°: 1, CDRH2 de SEQ ID N°: 2, CDRL1 de SEQ ID N°: 4, CDRL2 de SEQ ID N°: 5 e CDRL3 de SEQ ID N°: 6, em que o referido anticorpo também reage de forma cruzada com IL-13 de cinomólogo (cIL-13).

Breve Descrição dos Desenhos

Figura 1 ELISA em sanduíche ilustrando a ligação do anticorpo monoclonal 6A1 a IL-13 humana expressa por *E. coli* recombinante em concentrações crescentes.

Figura 2A ELISA ilustrando a capacidade do anticorpo monoclonal 6A1 em concentrações crescentes para inibir a ligação de IL-13 humana expressa por *E. coli* recombinante à cadeia α 1 do receptor de IL-13 humana.

Figura 2B ELISA ilustrando a habilidade do anticorpo monoclonal 6A1 em concentrações crescentes para inibir a ligação de IL-13 humana expressa por *E. coli* recombinante à cadeia α 2 do receptor de IL-13 humana.

Figura 3 Ensaio de neutralização ilustrando a capacidade de 6A1 em concentrações crescentes para inibir a bioactividade de IL-3 humana expressa por *E. coli* recombinante e de cinomólogo num ensaio de proliferação celular TF-1.

Figura 4 Ensaio de neutralização ilustrando a capacidade de

6A1 em concentrações crescentes para inibir a bioatividade de IL-13 humana expressa por mamífero (célula CHO) num ensaio de proliferação celular TF-1.

Figura 5 Ensaio de neutralização ilustrando a capacidade de 6A1 em concentrações crescentes para inibir a bioatividade de IL-13 humana Q130 expressa por *E. coli* recombinante num ensaio de proliferação celular TF-1.

Figura 6 ELISA em sanduíche demonstrando que 6A1 não liga-se à IL-4 humana expressa por *E. coli* recombinante.

Figura 7 Um ensaio de neutralização de IL-5, demonstrando que 6A1 não inibe a bioatividade de IL-5 humana expressa por *E. coli* recombinante num ensaio de proliferação celular TF-1.

Figura 8 ELISA em sanduíche ilustrando a ligação de mAb 6A1 quimérico a IL-13 humana expressa por *E. coli* recombinante e de cinomólogo em concentrações crescentes.

Figura 9 ELISA em sanduíche ilustrando a ligação de 8 mAb anti-IL-13 humana humanizados a IL-13 humana expressa por *E. coli* recombinante em concentrações crescentes.

Figura 10a ELISA em sanduíche ilustrando a ligação de L2+A1, L1+A1 e 6A1 quimérica à IL-13 humana expressa por *E. coli* recombinante em concentrações crescentes.

Figura 10b ELISA em sanduíche ilustrando a ligação de L2+A1, L1+A1 e 6A1 quimérica à IL-13 de cinomólogo expressa por *E. coli* recombinante em concentrações crescentes.

Figura 11 ELISA em sanduíche ilustrando a ligação de L2+A1, L1+A1 e 6A1 quimérica à IL-13 humana nativa em concentrações crescentes.

Figura 12a ELISA ilustrando a capacidade de anticorpo monoclonal 6A1, 6A1 quimérica, L1+A1 e L2+A1 em concentrações crescentes para inibir a ligação de IL-13 humana expressa por *E. coli* recombinante à cadeia α 1 do receptor de IL-13 humana.

Figura 12b ELISA ilustrando a capacidade de anticorpo monoclonal 6A1, 6A1 quimérica, L1+A1 e L2+A1 em concentrações crescentes para inibir a ligação de IL-13 humana expressa por *E. coli* recombinante à cadeia α 2 de receptor de IL-13 humana.

Figura 13a Ensaio de neutralização ilustrando a capacidade de 6A1, 6A1 quimérica, L1+A1 e L2+A1 em concentrações crescentes para inibir a bioactividade de IL-13 humana expressa por *E. coli* recombinante num ensaio de proliferação celular TF-1.

Figura 13b Ensaio de neutralização ilustrando a capacidade de 6A1, 6A1 quimérica, L1+A1 e L2+A1 em concentrações crescentes para inibir a bioactividade de IL-13 de cinomólogo expressa por *E. coli* recombinante num ensaio de proliferação celular TF-1.

Figura 13c Ensaio de neutralização ilustrando a capacidade de 6A1, 6A1 quimérica, L1+A1 e L2+A1 em concentrações crescentes para inibir a bioactividade de IL-13 humana Q130

expressa por *E. coli* recombinante num ensaio de proliferação celular TF-1.

Figura 13d Ensaio de neutralização ilustrando a capacidade de 6A1, 6A1 quimérica, L1+A1 e L2+A1 em concentrações crescentes para inibir a bioactividade de IL-13 humana expressa por mamífero (célula CHO) num ensaio de proliferação celular TF-1.

Figura 14a ELISA em sanduíche demonstrando que 6A1, 6A1 quimérico, L1+A1 e L2+A1 não liga-sem à IL-4 humana expressa por *E. coli* recombinante.

Figura 14b ELISA em sanduíche demonstrando que 6A1, 6A1 quimérico, L1+A1 e L2+A1 não liga-sem à GM-CSF humana expressa por *E. coli* recombinante.

Figura 14c Um ensaio de neutralização de IL-5, demonstrando que 6A1, 6A1 quimérico, L1+A1 e L2+A1 não inibem a bioactividade de IL-5 humana expressa por *E. coli* recombinante num ensaio de proliferação celular TF-1.

Figura 15 Uma ELISA que mapeia epitopos para determinar o epitopo de ligação para 6A1 na IL-13 humana e de cinomólogo.

Figura 16a Uma ELISA que mapeia epitopos para identificar a especificidade óptima de ligação de 6A1 na IL-13 humana.

Figura 16b Uma ELISA que mapeia epitopos para identificar a especificidade de ligação fina de 6A1 na IL-13 de cinomólogo.

Figura 17A Uma ELISA que mapeia epitopos para determinar os resíduos de aminoácidos chave requeridos para a ligação de 6A1 à IL-13 humana.

Figura 17b Uma ELISA que mapeia epitopos para determinar os resíduos de aminoácidos chave requeridos para a ligação de L1+A1 à IL-13 humana.

A Figura 17c e 17d são gráficos que ilustram a análise em varrimento de alanina para o 6A1 parental (murina) (Fig. 17c) e anticorpo L1-A1 humanizado.

Descrição Detalhada da Invenção

1. Estruturas de Anticorpo

1.1 Anticorpos Intactos

Os anticorpos intactos incluem glicoproteínas heteromultiméricas compreendendo, pelo menos, duas cadeias pesadas e duas leves. Com exceção de IgM, os anticorpos intactos são geralmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150 kDa, compostas de duas cadeias leves (L) idênticas e duas cadeias pesadas (H) idênticas. Tipicamente, cada cadeia leve está ligada a uma cadeia pesada por uma ligação persulfureto covalente enquanto o número de ligações persulfureto entre as cadeias pesadas de diferentes isotipos de imunoglobulina varia. Cada cadeia pesada tem numa extremidade um domínio variável (VH) seguido por várias regiões constantes. Cada cadeia leve tem um domínio variável (VL) e uma região constante na sua outra extremidade; a região constante da cadeia leve está alinhada com a primeira região constante da cadeia

pesada e o domínio variável de cadeia leve está alinhado com o domínio variável da cadeia pesada. As cadeias leves de anticorpos da maioria de espécies de vertebrados podem ser classificadas num de dois tipos denominados Kappa e Lambda, baseados na sequência de aminoácidos da região constante. Dependendo da sequência de aminoácidos da região constante de suas cadeias pesadas, os anticorpos humanos podem ser classificados em cinco classes diferentes, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. IgG e IgA podem ser subdivididas adicionalmente em subclasses, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; e IgA1 e IgA2. Existem variantes específicas, com murganho e rato tendo, pelo menos, IgG2a, IgG2b. O domínio variável do anticorpo confere especificidade de ligação ao antígeno com certas regiões exibindo variabilidades particulares chamadas regiões determinantes de complementaridade (CDR). As porções mais conservadas da região variável são chamadas regiões Estruturais (FR). Os domínios variáveis de cadeias pesada e leve intactas cada, compreendem quatro FR conectadas por três CDR. As CDR em cada cadeia são mantidas juntas em justa proximidade pelas regiões FR e com as CDR da outra cadeia contribuindo para a formação do sítio de ligação ao antígeno dos anticorpos. As regiões constantes não estão directamente envolvidas na ligação do anticorpo ao antígeno, mas apresentam várias funções efectoras, tal como participação em citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC), fagocitose através de ligação a receptor de Fc γ , meia vida/taxa de depuração através de receptor Fc neonatal (FcRn) e citotoxicidade dependente de complemento através do componente C1q da cascata do complemento.

Numa forma de realização, é deste modo proporcionado um anticorpo terapêutico intacto que se liga especificamente a hIL-13, anticorpo esse que inibe a interacção entre hIL-13 e

hIL-13R e compreende a CDRH3: SEQ ID N°:3 que se segue. O anticorpo terapêutico intacto pode compreender uma região constante de qualquer isotipo ou subclasse deste descrito *supra*. Numa forma de realização, o anticorpo é do isotipo IgG, particularmente IgG1. O anticorpo pode ser de rato, murganho, coelho, primata ou humano. Em uma forma de realização típica, o anticorpo é de primata (tal como cinomólogo, Macaco do Velho Mundo ou grandes primatas, ver e. g., documentos WO 99/55369, WO 93/02108) ou humano.

Noutra forma de realização é proporcionado um anticorpo terapêutico intacto compreendendo uma região variável possuindo CDR de SEQ ID N°: 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

Noutra forma de realização, é proporcionado um anticorpo terapêutico intacto de murino isolado ou um seu fragmento de ligação a antigénio compreendendo um domínio VH possuindo a sequência de SEQ ID N°: 7 e um domínio VL da sequência de SEQ ID N°: 8.

1.1.2 Anticorpos humanos

Os anticorpos humanos podem ser produzidos por vários métodos conhecidos pelos especialistas na técnica. Os anticorpos humanos podem ser feitos pelo método do hibridoma utilizando linhas celulares de mieloma humano ou de heteromieloma murganho-humano, ver Kozbor *J. Immunol.* 133, 3001 (1984) e Brodeur, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker Inc, 1987). Os métodos alternativos incluem a utilização de bibliotecas de fago ou murganhos transgénicos dos quais utilizam repertórios da região V humana (ver Winter G,

(1994), *Annu. Rev. Immunol.* 12: 433-455, Green LL (1999) *J. Immunol. Methods* 231: 11-23).

Várias estirpes de murganhos transgênicos estão agora disponíveis, em que seus loci de imunoglobulina de murganho foram substituídos com segmentos gênicos de imunoglobulina humana (ver Tomizuka K, (2000) *PNAS* 97: 722-727; Fishwild D. M. (1996) *Nature Biotechnol.* 14: 845-851, Mendez, *Nature Genetics*, 15: 146-156). Sob exposição ao antigénio, estes murganhos são capazes de produzir um repertório de anticorpos humanos a partir dos quais os anticorpos de interesse podem ser selecionados. De nota particular é o sistema TrimerTM (ver Eren R et al., (1998) *Immunology* 93: 154-161) em que linfócitos humanos são transplantados em murganhos irradiados, o sistema de anticorpo de linfócito selecionado (SLAM, ver Babcook et al., *PNAS* (1996) 93: 7843-7848) em que linfócitos humanos (ou de outras espécies) são efectivamente colocados através de um processo de produção de massa de uma mistura de anticorpos *in vitro* seguido por um processo de desconvulação, diluição limitante e seleção e o Xenomouse IITM (Abgenix Inc). Uma abordagem alternativa está disponível a partir de Morphotek Inc utilizando a tecnologia de MorphodomaTM.

A tecnologia de exposição em fago pode ser utilizada para produzir anticorpos humanos (e seus fragmentos), ver McCafferty, *Nature* 348: 552-552 (1990) e Griffiths AD et al., (1994) *EMBO* 13: 3245-3260. De acordo com esta técnica genes de domínio V do anticorpo são clonados em fase num gene de proteína de revestimento maior ou menor de um bacteriófago filamentosos tal como M13 ou fd e exibidos (geralmente com o auxílio de um fago auxiliar) como fragmentos de anticorpo funcional na superfície da partícula do fago. As selecções com base em propriedades

funcionais do anticorpo resultam na seleção do gene que codifica o anticorpo que exhibe aquelas propriedades. A técnica de exposição em fago pode ser utilizada para seleccionar anticorpos específicos para antígenos de bibliotecas feitas de células B humanas retiradas de indivíduos que sofrem de uma doença ou distúrbio descrito acima ou a partir de dadores humanos não imunizados (ver Marks; *J. Mol. Bio.* 222: 581-597, 1991). Quando é desejado um anticorpo humano intacto compreendendo um domínio Fc é necessário reclonar o fragmento derivado apresentado em fago em vectores de expressão em mamíferos compreendendo as regiões constantes desejadas e estabelecendo linhas celulares de expressão estável.

A técnica de maturação por afinidade (Marks; *Bio/technol* 10: 779-783 (1992)) pode ser utilizada para melhorar a afinidade de ligação em que a afinidade do anticorpo humano primário é melhorada pela substituição sequencial das regiões V de cadeia H e L por variantes de ocorrência natural e pela seleção com base em afinidades de ligação melhoradas. Variantes desta técnica, tal como "marcação de epitopo" também estão agora disponíveis, ver documento WO 93/06213. Ver, também, Waterhouse; *Nucl. Acids Res.* 21: 2265-2266 (1993).

Noutro aspecto, é proporcionado um anticorpo terapêutico intacto humano isolado ou seu fragmento de ligação a antígeno compreendendo uma CDRH3 de SEQ ID N°: 3 que se liga especificamente a hIL-13 e modula (e. g., inibe ou bloqueia) a interacção entre hIL-13 e hIL-13R. Noutro aspecto, é proporcionado um anticorpo terapêutico intacto humano isolado ou seu fragmento de ligação a antígeno compreendendo uma região variável que tem CDR de SEQ ID N°: 1, 2, 3, 4, 5 e 6 como definido *supra*.

1.2 Anticorpos Quiméricos e Humanizados

A utilização de anticorpos não humanos intactos no tratamento de doenças ou distúrbios humanos carrega consigo o potencial para os problemas agora bem estabelecidos de imunogenicidade, isto é, o sistema imunitário do doente pode reconhecer o anticorpo intacto não humano como não próprio e organizar uma resposta neutralizadora. Isto é particularmente evidente sob múltipla administração do anticorpo não humano a um doente humano. Foram desenvolvidas várias técnicas ao longo de anos para superar esses problemas e geralmente envolvem a redução da composição de sequências de aminoácidos não humanas no anticorpo intacto embora retendo a relativa facilidade de obtenção de anticorpos não humanos a partir de um animal imunizado, e. g., murganho, rato ou coelho. Em geral, foram utilizadas duas abordagens para atingir isto. A primeira são anticorpos quiméricos, que geralmente compreendem um domínio variável não humano (e. g., roedor tal como murganho) em fusão com uma região constante humana. Por causa do sítio de ligação a antigénio de um anticorpo estar localizado nas regiões variáveis, o anticorpo quimérico retém sua afinidade de ligação para o antigénio, mas adquire as funções efectoras da região constante humana e é, portanto, capaz de realizar funções efectoras tal como descrito *supra*. Os anticorpos quiméricos são tipicamente produzidos utilizando métodos de ADN recombinante. O ADN que codifica os anticorpos (e. g., ADNc) é isolado e sequenciado utilizando processos convencionais (e. g., pela utilização de sondas oligonucleotídicas que são capazes de ligação específica a genes que codificam as cadeias H e L do anticorpo da invenção, e. g., ADN que codifica SEQ ID N°: 1, 2, 3, 4, 5 e 6 descrito *supra*). As células de hibridoma servem como uma fonte típica desse ADN. Uma vez isolado, o ADN é colocado em

vectores de expressão que são então transfectados em células hospedeiras tal como *E. coli*, células COS, células CHO ou células de mieloma que não produzem de outro modo proteína de imunoglobulina para obter a síntese do anticorpo. O ADN pode ser modificado pela substituição das regiões constantes H e L não humanas (e. g., murinas) correspondentes pela sequência codificante de cadeias L e H humanas ver, e. g., Morrison; *PNAS* 81: 6851 (1984).

A segunda abordagem envolve a produção de anticorpos humanizados em que o conteúdo não humano do anticorpo é reduzido pela humanização das regiões variáveis. Duas técnicas para humanização ganharam popularidade. A primeira é humanização por enxerto de CDR. As CDR formam ansas próximas ao terminal N do anticorpo onde elas formam uma superfície organizada numa estrutura proporcionada pelas regiões estruturais. A especificidade de ligação a antígeno do anticorpo é principalmente definida pela topografia e pelas características químicas de sua superfície de CDR. Estas características são por, sua vez, determinadas pela conformação das CDR individuais, pela disposição relativa das CDR e pela natureza e disposição das cadeias laterais dos resíduos compreendendo as CDR. Um grande decréscimo em imunogenicidade pode ser atingido pelo enxerto apenas das CDR de um anticorpo não humano (e. g., murino) (anticorpos do "dador") em estrutura humana ("estrutura do receptor") e regiões constantes (ver Jones *et al.*, (1986) *Nature* 321: 522-525 e Verhoeyen M *et al.*, (1988) *Science* 239, 1534-1536). No entanto, o enxerto de CDR *per se* pode não resultar na retenção completa de propriedades de ligação ao antígeno e é frequentemente descoberto que alguns resíduos estruturais (às vezes referidos como "retromutações") do anticorpo do dador precisam ser preservados na molécula

humanizada se for para ser recuperada uma afinidade de ligação ao antigénio significativa (ver Queen C *et al.*, (1989) *PNAS* 86: 10029-10033, Co. M *et al.*, (1991) *Nature* 351: 501-502). Neste caso, regiões V humanas mostrando a maior homologia de sequência com o anticorpo do dador não humano são escolhidas a partir de um banco de dados de modo a prover a estrutura (FR) humana. A seleção de FR humanas pode ser feita ou a partir de consenso humano ou anticorpos humanos individuais. Sempre que necessário, os resíduos chave do anticorpo do dador são substituídos na estrutura do receptor humano para preservar as conformações de CDR. A modelagem computacional do anticorpo pode ser utilizada para ajudar a identificar tais resíduos estruturalmente importantes, ver documento WO 99/48523.

Alternativamente, a humanização pode ser atingida por um processo de “revestimento”. Uma análise estatística de regiões variáveis de cadeia leve e pesada de imunoglobulina murina e humana únicas revelou que os padrões exactos de resíduos apresentados são diferentes em anticorpos humanos e de murinos e que a maioria das posições de superfície individual têm uma forte um modo preferido por um pequeno número de resíduos diferentes (ver Padlan E. A. *et al.*, (1991) *Mol. Immunol.* 28: 489-498 e Pedersen J. T. *et al.*, (1994) *J. Mol. Biol.* 235: 959-973). Deste modo, é possível reduzir a imunogenicidade de uma Fv não humana pela substituição de resíduos apresentados nas suas regiões estruturais que diferem dos geralmente encontrados em anticorpos humanos. Por causa da antigenicidade proteica poder ser correlacionada com acessibilidade de superfície, a substituição dos resíduos de superfície pode ser suficiente para tornar a região variável de murganho “invisível” ao sistema imunitária humano (ver, também, Mark G. E. *et al.*, (1994) em *Handbook of Experimental Pharmacology* vol. 113: The Pharmacology

of Monoclonal Antibodies, Springer-Verlag, 105-134). Este processo de humanização é referido como “revestimento” porque apenas a superfície do anticorpo é alterada, os resíduos de suporte permanecem intocados.

Noutra forma de realização é proporcionado um anticorpo terapêutico quimérico compreendendo uma região variável não humana (e. g., de roedor) e uma região constante humana (que pode ser de um isotipo de IgG, e. g., IgG1) que se liga especificamente a hIL-13, anticorpo esse que compreende adicionalmente uma CDRH3 de SEQ ID N°: 3. Tais anticorpos podem compreender adicionalmente uma região constante humana do isotipo de IgG, e. g., IgG1.

Noutra forma de realização é proporcionado um anticorpo terapêutico quimérico compreendendo uma região variável não humana (e. g., de roedor) e uma região constante humana (que pode ser de um isotipo de IgG, e. g., IgG1) que se liga especificamente a hIL-13 possuindo as CDR de SEQ ID N°: 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

Noutra forma de realização é proporcionado um anticorpo terapêutico quimérico compreendendo um domínio VH de SEQ ID N°: 7 e um domínio VL de SEQ ID N°: 8 e uma região constante humana de um isotipo de IgG, e. g., IgG1 que se liga especificamente a hIL-13 e modula (e. g., inibe ou bloqueia) a interação entre hIL-13 e hIL-13R.

Noutra forma de realização é proporcionado um anticorpo terapêutico humanizado ou seu fragmento de ligação a antigénio que se liga especificamente a hIL-13 e modula (e. g., inibe ou bloqueia) a interacção entre hIL-13 e hIL-13R.

Noutra forma de realização é proporcionado um anticorpo terapêutico humanizado ou seu fragmento de ligação a antigénio que se liga especificamente a hIL-13 e compreende uma CDRH3 de SEQ ID N°: 3. Estes anticorpos podem compreender uma região constante humana de isotipo de IgG, e. g., IgG1.

Noutras formas de realização é proporcionado um anticorpo terapêutico humanizado ou seu fragmento de ligação a antigénio que se liga especificamente a hIL-13 e compreende as CDR de SEQ ID N°: 1, 2, 3, 4, 5 e 6. Estes anticorpos podem compreender uma região constante humana de isotipo de IgG, e. g., IgG1.

De acordo com a presente invenção é proporcionado um anticorpo terapêutico humanizado, anticorpo este que compreende um domínio VH seleccionado do grupo: SEQ ID N°: 11, 12, 13, 14 e um domínio VL seleccionado do grupo: SEQ ID N°: 15, 16. Estes anticorpos podem compreender uma região constante humana de isotipo de IgG, e. g., IgG1.

Noutra forma de realização é proporcionado um anticorpo terapêutico humanizado, anticorpo esse que compreende um domínio VH de SEQ ID N°: 11 e um domínio VL de SEQ ID N°: 15.

Noutra forma de realização é proporcionado um anticorpo terapêutico humanizado, anticorpo esse que compreende um domínio VH de SEQ ID N°: 12 e um domínio VL de SEQ ID N°: 15.

Noutra forma de realização é proporcionado um anticorpo terapêutico humanizado, anticorpo esse que compreende um domínio VH de SEQ ID N°: 13 e um domínio VL de SEQ ID N°: 15.

Noutra forma de realização é proporcionado um anticorpo terapêutico humanizado, anticorpo esse que compreende um domínio VH de SEQ ID N°: 14 e um domínio VL de SEQ ID N°: 15.

Noutra forma de realização é proporcionado um anticorpo terapêutico humanizado, anticorpo esse que compreende um domínio VH de SEQ ID N°: 11 e um domínio VL de SEQ ID N°: 16.

Noutra forma de realização é proporcionado um anticorpo terapêutico humanizado, anticorpo esse que compreende um domínio VH de SEQ ID N°: 12 e um domínio VL de SEQ ID N°: 16.

Noutra forma de realização é proporcionado um anticorpo terapêutico humanizado, anticorpo esse que compreende um domínio VH de SEQ ID N°: 13 e um domínio VL de SEQ ID N°: 16.

Noutra forma de realização é proporcionado um anticorpo terapêutico humanizado, anticorpo esse que compreende um domínio VH de SEQ ID N°: 14 e um domínio VL de SEQ ID N°: 16.

Noutra forma de realização da presente invenção é proporcionado um anticorpo terapêutico humanizado ou seu fragmento de ligação a antigénio que se liga especificamente a hIL-13, em que o referido anticorpo ou seu fragmento compreende CDRH3 (SEQ ID N°: 3) compreendendo adicionalmente, opcionalmente, CDR de SEQ ID N°: 1, 2, 3, 4, 5 e 6, em que os resíduos seleccionados do grupo consistindo em 19, 38, 73 e 81 da região estrutural de cadeia pesada de receptor humano e o resíduo na posições 85 da estrutura de cadeia leve de receptor humano são substituídos pelos resíduos correspondentes encontrados na estrutura de anticorpo do dador a partir do qual é derivada CDRH3.

Será óbvio paa os especialistas na técnica que o termo “derivado” se destina a definir não apenas a fonte no sentido de ser a origem *física* do material, mas também definir o material que é estruturalmente idêntico ao material (em termos de sequência de aminoácidos primária), mas que não se origina da fonte de referência. Assim, os “resíduos encontrados no anticorpo dador a partir do qual é derivada CDRH3” não precisam necessariamente de ser purificados a partir do anticorpo do dador.

Noutra forma de realização é proporcionado um anticorpo terapêutico humanizado ou seu fragmento de ligação a antigénio que se liga especificamente a hIL-13, em que o referido anticorpo ou seu fragmento compreende CDRH3 de SEQ ID N°: 3 compreendendo adicionalmente, opcionalmente, CDR de SEQ ID N°: 1, 2, 3, 4, 5 e 6, em que a estrutura de cadeia pesada humana compreende um ou mais (e. g., todos) dos seguintes resíduos (ou seus substitutos conservados):

Posição	Resíduo
38	I
19	R
73	T
81	R

e a cadeia leve humana compreende

Posição	Resíduo
85	V

É bem reconhecido na técnica que certas substituições de aminoácidos são consideradas como sendo “conservadoras”. Os aminoácidos são divididos em grupos com base em propriedades de cadeia lateral comum e substituições dentro de grupos que mantêm todas ou consideravelmente todas as afinidades de ligação do anticorpo da invenção ou seu fragmento de ligação a antígeno são consideradas como substituições conservadoras, ver a tabela seguinte:

<u>Cadeia Lateral</u>	<u>Membros</u>
Hidrofóbica	met, ala, val, leu, ile
Hidrofílica neutra	cys, ser, thr
Ácida	asp, glu
Básica	asn, gln, his, lys, arg
Resíduos que influenciam orientação de cadeia	gly, pro
Aromática	trp, tyr, phe

De acordo com a presente invenção é proporcionado um anticorpo terapêutico humanizado compreendendo uma cadeia pesada selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID N°: 18, 19, 20, 21 e uma cadeia leve selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID N°: 22, 23.

Numa forma de realização da invenção é proporcionado um anticorpo terapêutico humanizado que se liga especificamente a hIL-13 compreendendo uma cadeia pesada de SEQ ID N°: 18 e uma cadeia leve de SEQ ID N°: 22.

Numa forma de realização da invenção é proporcionado um anticorpo terapêutico humanizado que se liga especificamente a hIL-13 compreendendo uma cadeia pesada de SEQ ID N°: 19 e uma

cadeia leve de SEQ ID N°: 22.

Numa forma de realização da invenção é proporcionado um anticorpo terapêutico humanizado que se liga especificamente a hIL-13 compreendendo uma cadeia pesada de SEQ ID N°: 20 e uma cadeia leve de SEQ ID N°: 22.

Numa forma de realização da invenção é proporcionado um anticorpo terapêutico humanizado que se liga especificamente a hIL-13 compreendendo uma cadeia pesada de SEQ ID N°: 21 e uma cadeia leve de SEQ ID N°: 22.

Numa forma de realização da invenção é proporcionado um anticorpo terapêutico humanizado que se liga especificamente a hIL-13 compreendendo uma cadeia pesada de SEQ ID N°: 18 e uma cadeia leve de SEQ ID N°: 23.

Numa forma de realização da invenção é proporcionado um anticorpo terapêutico humanizado que se liga especificamente a hIL-13 compreendendo uma cadeia pesada de SEQ ID N°: 19 e uma cadeia leve de SEQ ID N°: 23.

Numa forma de realização da invenção é proporcionado um anticorpo terapêutico humanizado que se liga especificamente a hIL-13 compreendendo uma cadeia pesada de SEQ ID N°: 20 e uma cadeia leve de SEQ ID N°: 23.

Numa forma de realização da invenção é proporcionado um anticorpo terapêutico humanizado que se liga especificamente a hIL-13 compreendendo uma cadeia pesada de SEQ ID N°: 21 e uma cadeia leve de SEQ ID N°: 23.

1.3 Anticorpos biespecíficos

Um anticorpo biespecífico é um anticorpo que tem especificidades de ligação para, pelo menos, dois epitopos diferentes. Os métodos para fazer estes anticorpos são conhecidos na técnica. Tradicionalmente, a produção recombinante de anticorpos biespecíficos é baseada na co-expressão de dois pares de cadeia H-cadeia L de imunoglobulina, onde as duas cadeias H têm diferentes especificidades de ligação ver Millstein et al., *Nature* 305: 537-539 (1983), documento WO 93/08829 e Traunecker et al., *EMBO* 1991 10: 3655-3659. Por causa da variedade aleatória de cadeias H e L, é produzida uma mistura potencial de dez estruturas de anticorpo diferentes, das quais apenas uma tem a especificidade de ligação desejada. Uma abordagem alternativa envolve a fusão dos domínios variáveis com as especificidades de ligação desejadas para região constante de cadeia pesada compreendendo, pelo menos, parte da região de charneira, regiões CH2 e CH3. É preferido ter a região CH1 contendo o sítio necessário para ligação de cadeia leve presente em, pelo menos, uma das fusões. O ADN que codifica estas fusões e, se desejado, a cadeia L, é inserido em vectores de expressão separados e é então co-transfectado num organismo hospedeiro adequado. É possível inserir as sequências codificantes para duas ou todas as três cadeias num vector de expressão. Numa abordagem preferida, o anticorpo biespecífico é composto de uma cadeia H com uma primeira especificidade de ligação num braço e um par de cadeias H-L, proporcionando uma segunda especificidade de ligação no outro braço, ver documento WO 94/04690. Ver, também, Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121: 210, 1986.

Numa forma de realização da invenção, é proporcionado um anticorpo terapêutico biespecífico, em que, pelo menos, uma especificidade de ligação do referido anticorpo é para hIL-13, em que o referido anticorpo compreende uma CDRH3 de SEQ ID N°: 3 e em que o referido anticorpo inibe a interacção entre hIL-13 e IL-13R. Estes anticorpos podem compreender adicionalmente uma região constante humana do isotipo de IgG, e. g. IgG1. Nalgumas formas de realização, o anticorpo terapêutico biespecífico possui uma primeira especificidade de ligação para hIL-13 e modula (e. g., inibe ou bloqueia) a interacção entre hIL-13 e hIL-13R e uma segunda especificidade de ligação para hIL-4 e modula (e. g., inibe ou bloqueia) a interacção entre hIL-4 e um receptor para hIL-4.

Numa forma de realização da invenção, é proporcionado um anticorpo terapêutico biespecífico, em que, pelo menos, uma especificidade de ligação do referido anticorpo é para hIL-13, em que o referido anticorpo compreende, pelo menos, CDR de SEQ ID N°: 1, 2, 3, 4, 5 e 6. Estes anticorpos podem compreender adicionalmente uma região constante humana do isotipo de IgG, e. g., IgG1.

1.4 Fragmentos de Anticorpo

Em certas formas de realização da invenção, são proporcionados fragmentos de anticorpo terapêutico que modulam a interacção entre hIL-13 e hIL-13R. Estes fragmentos podem ser fragmentos de ligação a antigénio funcionais de anticorpos humanizados e/ou quiméricos e/ou intactos tal como fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, ScFv dos anticorpos descritos *supra*. Tradicionalmente estes fragmentos são produzidos pela digestão

proteolítica de anticorpos intactos por, e. g., digestão de papaína (ver, e. g., documento WO 94/29348), mas podem ser produzidos de células hospedeiras recombinantemente transformadas. Para a produção de ScFv, ver Bird et al., (1988) *Science* 242: 423-426. Além disso, os fragmentos de anticorpo podem ser produzidos utilizando uma variedade de técnicas de engenharia como descrito a seguir.

Os fragmentos Fv parecem ter menos energia de interação nas suas duas cadeias do que em fragmentos Fab. Para estabilizar a associação dos domínios VH e VL, eles foram ligados com péptidos (Bird et al., (1988) *Science* 242: 423-426, Huston et al., *PNAS* 85: 5879-5883), pontes persulfureto (Glockshuber et al., (1990) *Biochemistry* 29: 1362-1367) e mutações chave em fechadura (Zhu et al., (1997) *Protein Sci.* 6: 781-788). Os fragmentos ScFv podem ser produzidos por métodos bem conhecidos pelos especialistas na técnica, ver Whitlow et al., (1991) *Methods companion Methods Enzymol.* 2: 97-105 e Huston et al., (1993) *Int. Rev. Immunol.* 10: 195-217. O ScFv pode ser produzido em células bacterianas, tal como *E. coli*, mas é, de um modo preferido produzido, em células eucarióticas. Uma desvantagem de ScFv é a monovalência do produto, que impede uma avidéz aumentada devido a ligação polivalente e sua curta meia-vida. As tentativas para superar esses problemas incluem (ScFv')₂ bivalentes produzidos de ScFv contendo uma cisteína C-terminal adicional por acoplamento químico (Adams et al., (1993) *Can. Res.* 53: 4026-4034 e McCartney et al., (1995) *Protein Eng.* 8: 301-314) ou por dimerização sítio-específica de ScFv contendo um resíduo de cisteína C-terminal não coincidente (ver Kipriyanov et al., (1995) *Cell. Biophys.* 26: 187-204). Alternativamente, o ScFv pode ser forçado a formar multímeros pelo encurtamento do ligante peptídico em 3 a 12 resíduos para formar "diacorpos",

ver Holliger et al., *PNAS* (1993), 90: 6444-6448. A redução do ligante ainda pode resultar em trímeros de ScFv ("triacorpos", ver Kortt et al., (1997) *Protein Eng.* 10: 423-433) e tetrâmeros ("tetracorpos", ver Le Gall et al., (1999) *FEBS Lett.* 453: 164-168). A construção de moléculas de ScFv bivalente também pode ser atingida por fusão genética com motivos que dimerizam proteína para formar "minianticorpos" (ver Pack et al., (1992) *Biochemistry* 31: 1579-1584) e "minicorpos" (ver Hu et al., (1996), *Cancer Res.* 56: 3055-3061). Podem também ser produzidos repetições de ScFv-Sc-Fv ((ScFv)₂) pela ligação de duas unidades de ScFv por um terceiro ligante peptídico, ver Kurucz et al., (1995) *J. Immunol.* 154: 4576-4582. Os diacorpos biespecíficos podem ser produzidos através da associação não covalente de dois produtos de fusão de cadeia única consistindo no domínio VH de um anticorpo conectado por um ligante curto ao domínio VL de um outro anticorpo, ver Kipriyanov et al., *Int. J. Can.* 77: 763-772. A estabilidade destes diacorpos biespecíficos pode ser melhorada pela introdução de pontes persulfureto ou mutações chave em fechadura como descrito *supra* ou pela formação de diacorpos de cadeia única (ScDb) em que dois fragmentos de ScFv híbridos são conectados através de um ligante peptídico, ver Kontermann et al., (1999) *J. Immunol. Methods* 226: 179-188. As moléculas biespecíficas tetravalentes estão disponíveis por, e. g., fusão de um fragmento ScFv com o domínio CH3 de uma molécula de IgG ou com um fragmento Fab através da região de charneira, ver Coloma et al., (1997) *Nature Biotechnol.* 15: 159-163. Alternativamente, as moléculas biespecíficas tetravalentes foram criadas pela fusão de diacorpos de cadeia única biespecíficos (ver Alt et al., (1999) *FEBS Lett.* 454: 90-94. As moléculas biespecíficas tetravalentes menores também podem ser formadas pela dimerização de repetições de ScFv-Sc-Fv com um ligante contendo um motivo hélice-ansa-hélice (minianticorpos DiBi, ver

Muller *et al.*, (1998) *FEBS Lett.* 432: 45-49) ou uma molécula de cadeia única compreendendo quatro domínios variáveis de anticorpo (VH e VL) numa orientação que evita o emparelhamento intramolecular (diacorpo em repetição, ver Kipriyanov *et al.*, (1999) *J. Mol. Biol.* 293: 41-56). Os fragmentos de F(ab')₂ biespecíficos podem ser criados por acoplamento químico de fragmentos Fab' ou por heterodimerização através de fechos de leucina (ver Shalaby *et al.*, (1992) *J. Exp. Med.* 175: 217-225 e Kostelny *et al.*, (1992), *J. Immunol.* 148: 1547-1553). Também disponíveis estão os domínios de Vh e VL isolados (Domantis plc), ver documentos US 6248516, US 6291158, US 6172197.

Numa forma de realização é proporcionado um fragmento de anticorpo terapêutico (e. g., ScFv, Fab, Fab', F(ab')₂) ou um fragmento de anticorpo manipulado como descrito *supra* que se liga especificamente a hIL-13 e inibem a interação entre hIL-13 e hIL-13R. O fragmento de anticorpo terapêutico compreende tipicamente uma CDRH3 que possui a sequência de SEQ ID N°: 3 opcionalmente em conjunto com CDR possuindo a sequência apresentada em SEQ ID N°: 1, 2, 4, 5 e 6.

1.5 Anticorpos heteroconjugados

Os anticorpos heteroconjugados também formam uma forma de realização da presente invenção. Os anticorpos heteroconjugados são compostos por dois anticorpos covalentemente ligados formados utilizando quaisquer métodos de reticulação convenientes. ver, e. g., documento US 4676980.

1.6 Outras Modificações

Crê-se que a interacção entre a região Fc de um anticorpo e vários receptores de Fc (FcγR) medeia as funções efectoras do anticorpo que inclui a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), fixação de complemento, fagocitose e meia-vida/depuração do anticorpo. As várias modificações da região Fc de anticorpos da invenção podem ser efectuadas dependendo da propriedade desejada. Por exemplo, as mutações específicas na região Fc para tornar um anticorpo, de outro modo lítico, não lítico, são detalhadas nos documentos EP 0629240B1 e EP 0307434B2 ou pode incorporar um epitopo de ligação de receptor de resgate no anticorpo para aumentar a meia-vida sérica, ver documento US 5739277. Há cinco receptores Fcγ humanos reconhecidos actualmente, FcγR (I), FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa e FcRn neonatal. Shields *et al.*, (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 6591-6604 demonstraram que um grupo comum de resíduos de IgG1 está envolvido na ligação de todos FcγRs, enquanto FcγRII e FcγRIII utilizam sítios distintos fora deste grupo comum. Um grupo de resíduos de IgG1 reduziu a ligação para todos os FcγRs quando alterados para alanina: Pro-238, Asp-265, Asp-270, Asn-297 e Pro-239. Todos estão no domínio de CH2 de IgG e agrupados próximo da charneira que junta CH1 e CH2. Enquanto o FcγRI utiliza apenas o grupo comum de resíduos de IgG1 para ligação, o FcγRII e FcγRIII interagem com resíduos distintos além do grupo comum. A alteração de alguns resíduos reduziu a ligação apenas para FcγRII (e. g., Arg-292) ou FcγRIII (e. g., Glu-293). Algumas variantes mostraram ligação melhorada para FcγRII ou FcγRIII, mas não afectaram a ligação para o outro receptor (e. g., Ser-267Ala melhorou a ligação para FcγRII, mas a ligação para FcγRIII não foi afectada). Outras variantes apresentaram ligação melhorada para FcγRII ou FcγRIII com

redução na ligação para o outro receptor (e. g., Ser-298Ala melhorou a ligação para FcγRIII e reduziu a ligação para FcγRIII). Para FcγRIIIa, as melhores variantes de ligação de IgG1 tiveram substituições de alanina combinadas em Ser-298, Glu-333 e Lys-334. Crê-se que o receptor FcRn neonatal esteja envolvido tanto na depuração de anticorpo como na transcitose através de tecidos (ver Junghans R. P. (1997) *Immunol. Res.* 16: 29-57 e Ghetie *et al.*, (2000) *Annu. Ver. Immunol.* 18: 739-766). Os resíduos de IgG1 humano determinados para interagir directamente com FcRn humano incluem Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 e His435. Mudanças em qualquer destas posições descritas nesta secção podem permitir meia-vida aumentada e/ou propriedades efectoras alteradas de anticorpos da invenção.

Outras modificações incluem variantes de glicosilação dos anticorpos da invenção. A glicosilação de anticorpos em posições conservadas nas suas regiões constantes é conhecida por ter um profundo efeito na função de anticorpo, particularmente funcionamento effector, tal como aqueles descritos acima, ver, e. g., Boyd *et al.*, (1996) *Mol. Immunol.* 32: 1311-1318. São contempladas variantes de glicosilação dos anticorpos terapêuticos ou seus fragmentos de ligação a antigénio da presente invenção em que uma ou mais unidades de hidrato de carbonos são adicionadas, substituídas, deletadas ou modificadas. A introdução de um motivo asparagina-X-serina ou asparagina-X-treonina cria um sítio potencial para adesão enzimática de unidades de hidrato de carbono e pode, portanto, ser utilizada para manipular a glicosilação de um anticorpo. Em Raju *et al.*, (2001) *Biochemistry* 40: 8868-8876 a sialização terminal de uma imunoadesina de TNFR-IgG foi aumentada através de um processo de reglactosilação e/ou resialização utilizando

beta-1,4-galactosiltransferase e/ou alfa 2,3 sialiltransferase. Crê-se que aumentando a sialização terminal aumenta-se a meia-vida da imunoglobulina. Os anticorpos, em comum com a maioria das glicoproteínas, são tipicamente produzidos como uma mistura de glicoformas. Esta mistura é particularmente aparente quando anticorpos são produzidos em células eucarióticas, particularmente mamíferas. Foram desenvolvidos vários métodos para fabricar glicoformas definidas, ver Zhang *et al.*, *Science* (2004) 303: 371, Sears *et al.*, *Science* (2001) 291: 2344, Wacker *et al.*, (2002) *Science* 298: 1790, Davis *et al.*, (2002) *Chem. Ver.* 102: 579, Hang *et al.*, (2001) *Acc. Chem. Res.* 34: 727. Assim, a invenção contempla uma pluralidade de anticorpos terapêuticos (monoclonais) (que podem ser do isotipo IgG, e. g., IgG1) como aqui descrito compreendendo um número definido (e. g., 7 ou menos, por exemplo 5 ou menos tal como dois ou um único) de gliforma(s) dos referidos anticorpos ou seus fragmentos de ligação a antigénio.

As formas de realização adicionais da invenção incluem anticorpos terapêuticos da invenção ou seus fragmentos de ligação a antigénio acoplados a um polímero não proteínáceo, tal como polietilenoglicol (PEG), polipropilenoglicol ou polioxialquileno. A conjugação de proteínas a PEG é uma técnica estabelecida para aumentar a meia-vida de proteínas, assim como reduz a antigenicidade e imunogenicidade de proteínas. A utilização de PEGuilação com diferentes pesos moleculares e estilos (linear ou ramificado) foi investigada com anticorpos intactos, assim como fragmentos Fab', ver Koumenis I. L. *et al.*, (2000) *Int. J. Pharmaceut.* 198: 83-95.

3. Métodos de Produção

Os anticorpos da invenção podem ser produzidos como uma população policlonal, mas são, de um modo mais preferido, produzidos como uma população monoclonal (isto é, como uma população consideravelmente homogênea de anticorpos idênticos direccionados contra um sítio de ligação antigénico específico). É óbvio que será evidente para os especialistas na técnica que uma população implica mais de uma entidade de anticorpo. Os anticorpos da presente invenção podem ser produzidos em organismos transgénicos tal como cabras (ver Pollock *et al.*, (1999) *J. Immunol. Methods* 231: 147-157), galinhas (ver Morrow KJJ (2000) *Genet. Eng. News* 20: 1-55, murganhos (ver Pollock *et al.*) ou vegetais (ver Doran PM (2000) *Curr. Opinion Biotechnol.* 11: 199-204, Ma JK-C (1998) *Nat. Med.* 4: 601-606, Baez J *et al.*, *BioPharm* (2000) 13: 50-54, Stoger E. *et al.*, (2000) *Plant Mol. Biol.* 42: 583-590). Os anticorpos também podem ser produzidos por síntese química. No entanto, os anticorpos da invenção são tipicamente produzidos utilizando tecnologia de cultura de células recombinantes bem conhecida pelos especialistas na técnica. Um polinucleótido que codifica o anticorpo é isolado e inserido num vector replicável tal como um plasmídeo para futura clonagem (amplificação) ou expressão. Um sistema de expressão útil é um sistema de glutamato sintetase (tal como o vendido por Lonza Biologics), particularmente quando a célula hospedeira é CHO ou NS0 (ver a seguir). O polinucleótido que codifica o anticorpo é prontamente isolado e sequenciado utilizando processos convencionais (*e. g.*, sondas oligonucleotídicas). Os vectores que podem ser utilizados incluem plasmídeo, vírus, fago, transposões, minicromossomas dos quais os plasmídeos são uma forma de realização típica. Geralmente, tais vectores incluem adicionalmente uma sequência

sinal, origem de replicação, um ou mais genes marcadores, um elemento estimulador, um promotor e sequências de terminação de transcrição ligados operacionalmente ao polinucleótido da cadeia leve e/ou pesada para facilitar a expressão. O polinucleótido que codifica a cadeia leve e pesada pode ser inserido em vectores separados e transfectado na mesma célula hospedeira ou, se desejado, tanto a cadeia pesada como a cadeia leve podem ser inseridas no mesmo vector para transfecção na célula hospedeira. Assim, de acordo com um aspecto da presente invenção, é proporcionado um processo para construir um vector que codifica as cadeias leve e/ou pesada de um anticorpo terapêutico ou seu fragmento de ligação a antigénio da invenção, compreendendo esse método a inserção num vector, um polinucleótido que codifica uma cadeia leve e/ou cadeia pesada de um anticorpo terapêutico da invenção.

Noutro aspecto da invenção, é proporcionado um polinucleótido que codifica um domínio VH de murino que tem a sequência apresentada como SEQ ID N°: 24.

Noutro aspecto da invenção, é proporcionado um polinucleótido que codifica um domínio VL de murino que tem a sequência apresentada como SEQ ID N°: 25.

Noutro aspecto da invenção, é proporcionado um polinucleótido que codifica um domínio VH que tem a sequência seleccionada do grupo consistindo em SEQ ID N°: 26, 27, 28, 29.

Noutro aspecto da invenção, é proporcionado um polinucleótido que codifica um domínio VL que tem a sequência seleccionada do grupo consistindo em SEQ ID N°: 30, 31.

De acordo com a presente invenção é proporcionado um polinucleótido que codifica uma cadeia pesada da invenção, cujo polinucleótido é seleccionado do grupo consistindo em; SEQ ID N°: 32, 33, 34, 35.

De acordo com a presente invenção é proporcionado um polinucleótido que codifica uma cadeia leve da invenção, cujo polinucleótido é seleccionado do grupo consistindo em SEQ ID N°: 36, 37.

Será imediatamente evidente para os especialistas na técnica que devido à redundância do código genético, também estão disponíveis polinucleótidos alternativos àqueles aqui divulgados que codificam os polipéptidos da invenção.

3.1 Sequências sinal

Os anticorpos da presente invenção podem ser produzidos como uma proteína de fusão com uma sequência sinal heteróloga que tem um sítio de clivagem específico no terminal N da proteína madura. A sequência sinal deve ser reconhecida e processada pela célula hospedeira. Para células hospedeiras procarióticas, a sequência sinal pode ser uma fosfatase alcalina, penicilinase, ou líderes de enterotoxina II estável ao calor. Para secreção em levedura, as sequências sinal podem ser um líder de invertase de levedura, líder de factor α ou líderes de fosfatase ácida, ver e. g., WO 90/13646. Em sistemas de célula mamífera, líderes secretórios virais tal como sinal gD de herpes simples e uma sequência sinal de imunoglobulina nativa estão disponíveis. Tipicamente a sequência sinal está ligada em fase de leitura ao ADN que codifica o anticorpo da invenção.

3.2 Origem de replicação

As origens de replicações são bem conhecidas na técnica com pBR322 adequado para a maioria das bactérias gram-negativas, 2 μ plasmídeo para a maioria das leveduras e várias origens virais tal como SV40, políoma, adenovírus, VSV ou BPV para a maioria das células mamíferas. Geralmente, o componente de origem de replicação não é necessário para vectores de expressão em mamíferos, mas o SV40 pode ser utilizada já que contém o promotor inicial.

3.3 Marcador de selecção

Os genes de selecção típicos codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras toxinas, *e. g.*, ampicilina, neomicina, metotrexato ou tetraciclina ou (b) complementam as deficiências auxotróficas ou suplementam nutrientes não disponíveis nos meios complexos. O esquema de selecção pode envolver a detenção do crescimento da célula hospedeira. As células, que foram satisfatoriamente transformadas com os genes que codificam o anticorpo terapêutico da presente invenção, sobrevivem devido a, *e. g.*, resistência à fármaco conferida pelo marcador de selecção. Um outro exemplo é o também chamado marcador de selecção DHFR em que os transformantes são cultivadas na presença de metotrexato. Em formas de realização típicas, as células são cultivadas na presença de quantidades crescentes de metotrexato para amplificar o número de cópias do gene exógeno de interesse. As células CHO são de uma linha celular particularmente útil para a selecção de DHFR. Um exemplo adicional é o sistema de expressão da glutamato sintetase (Lonza Biologics). Um gene para selecção

adequado para utilização em levedura é o gene *trp1*, ver Stinchcomb *et al.*, *Nature* 282: 38, 1979.

3.4 Promotores

Os promotores adequados para os anticorpos de expressão da invenção estão ligados operacionalmente ao ADN/polinucleótido que codifica o anticorpo. Os promotores para hospedeiros procarióticos incluem promotor *phoA*, sistemas promotores de Beta-lactamase e lactose, promotores de fosfatase alcalina, triptofano e híbridos, tal como Tac. Os promotores adequados para expressão em células de levedura incluem os de 3-fosfoglicerato cinase ou outras enzimas glicolíticas, *e. g.*, enolase, gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase, hexocinase, piruvato descarboxilase, fosfofrutocinase, glicose 6 fosfato isomerase, 3-fosfoglicerato mutase e glicocinase. Os promotores de levedura induzíveis incluem os de álcool desidrogenase 2, isocitocromo C, fosfatase ácida, metalotioneína e enzimas responsáveis pelo metabolismo de azoto ou utilização de maltose/galactose.

Os promotores para expressão em sistemas celulares de mamíferos incluem promotores virais, tal como políoma, vírus da varíola das aves e adenovírus (*e. g.*, adenovírus 2), vírus do papiloma bovino, vírus do sarcoma de aves, citomegalovírus (em particular o promotor génico inicial imediato), retrovírus, vírus da hepatite B, actina, promotor do vírus do sarcoma de Rous (RSV) e o vírus de sírio 40 inicial ou tardio. Claro que a escolha do promotor é baseada na compatibilidade adequada com a célula hospedeira utilizada para expressão. Numa forma de realização, é deste modo, proporcionado um primeiro plasmídeo

compreendendo um promotor e RSV e/ou de SV40 e/ou de CMV, ADN que codifica região V de cadeia leve (VL) da invenção, região κC em conjunto com marcadores de selecção de resistência a ampicilina e um segundo plasmídeo compreendendo um promotor de RSV ou de SV40, ADN que codifica a região V de cadeia pesada (VH) da invenção, ADN que codifica a região constante γ1, marcadores de DHFR e de resistência a ampicilina.

3.5 Elemento estimulador

Quando apropriado, e. g., para expressão em eucariotos superiores, um elemento estimulador ligado operacionalmente ao elemento promotor num vector pode ser utilizado. As sequências estimuladoras mamíferas adequadas incluem elementos estimuladores para globina, elastase, albumina, fetoproteína e insulina. Alternativamente, alguém pode usar um elemento estimulador de um vírus de células eucarióticas tal como um estimulador de SV40 (em 100-270 bp), estimulador de promotor inicial de citomegalovírus, estimulador de políoma, estimulador baculoviral ou locus de IgG2a murino (ver documento WO 04/009823). O estimulador é, de um modo preferido, localizado no vector num sítio à montante do promotor.

3.6 Células hospedeiras

As células hospedeiras adequadas para vectores de clonagem ou expressão que codificam anticorpos da invenção são células procarióticas, de levedura ou eucarióticas superiores. Células procarióticas adequadas incluem eubactérias, e. g., *Enterobacteriaceae*, tal como *Escherichia*, e. g., *E. coli* (e. g.,

ATCC 31 446; 31 537; 27 325), *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, e. g., *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, e. g., *Serratia mascescans* e *Shigella* assim como Bacilli tal como *B. subtilis* e *B. licheniformis* (ver documento DD 266710), *Pseudomonas* tal como *P. aeruginosa* e *Streptomyces*. Das células hospedeiras de levedura, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* (e. g., ATCC 16 045, 12 424, 24 178, 56 500), *Yarrowia* (EP402.226), *Pichia Pastoris* (documento EP183070, ver também Peng et al., *J. Biotechnol.* 108 (2004): 185-192, *Candida*, *Trichoderma reesia* (EP244.234), *Penicillin*, *Tolypocladium* e hospedeiros de *Aspergillus*, tal como *A. nidulans* e *A. niger* também são contemplados.

Embora as células hospedeiras procarióticas e de levedura sejam especificamente contempladas pela invenção, de um modo preferido, no entanto, as células hospedeiras da presente invenção são células eucarióticas superiores. As células hospedeiras eucarióticas superiores adequadas incluem células mamíferas tal como COS-1 (ATCC N° CRL 1650), COS-7 (ATCC CRL 1651), linha de rim embrionário humano 293, célula de rim de hamster bebé (BHK) (ATCC CRL 1632), BHK570 (ATCC NO: CRL 10314), 293 (ATCC NO: CRL 1573), células de ovário de hamster Chinês CHO (e. g., CHO-K1, ATCC NO: CCL 61, linha celular DHFR-CHO tal como DG44 (ver Urlaub et al., (1986) *Somatic Cell Mol. Genet.* 12: 555-556)), particularmente aquelas linhagens celulares de CHO adaptadas para cultura em suspensão, células de sertoli de murganho, células de rim de macaco, células de rim de macaco verde africano (ATCC CRL-1587), células HeLa, células de rim canino (ATCC CCL 34), células de pulmão humano (ATCC CCL 75), células Hep G2 e de mieloma ou linfoma, e. g., NS0 (ver documento US 5807715), Sp2/0, Y0. Assim, numa forma de realização da invenção é proporcionada uma célula hospedeira

estavelmente transformada compreendendo um vector que codifica uma cadeia pesada e/ou cadeia leve do anticorpo terapêutico ou seu fragmento de ligação a antígeno como aqui descrito. De um modo preferido, estas células hospedeiras compreendem um primeiro vector que codifica a cadeia leve e um segundo vector que codifica a referida cadeia pesada.

Fermentação bacteriana

Os sistemas bacterianos são particularmente convenientes para a expressão de fragmentos de anticorpo. Tais fragmentos estão localizados intracelularmente ou dentro do periplasma. As proteínas periplasmáticas insolúveis podem ser extraídas e reorganizadas para formar proteínas activas de acordo com métodos conhecidos pelos especialistas na técnica, ver Sanchez *et al.*, (1999) *J. Biotechnol.* 72: 13-20 e Cupit PM *et al.*, (1999) *Lett. Appl. Microbiol.* 29: 273-277.

3.7 Métodos para Cultivo de Células

As células hospedeiras transformadas com vectores que codificam os anticorpos terapêuticos da invenção ou seus fragmentos de ligação a antígeno podem ser cultivadas por qualquer método conhecido pelos especialistas na técnica. As células hospedeiras podem ser cultivadas em frascos de agitação, tubos rolantes ou sistemas de fibra oca, mas é preferido para produção em grande escala que sejam utilizados reactores em tanque com agitação particularmente para culturas em suspensão. De um modo preferido, os tanques com agitação são adaptados para arejamento utilizando, *e. g.*, pulverizador de água, septos, ou

impulsor de fragmentação lenta. Para colunas de espuma e reactores com arejamento pode ser utilizado o arejamento directo com bolhas de ar ou oxigénio. Quando as células hospedeiras são cultivadas em meios de cultura sem soro é preferido que os meios sejam suplementados com um agente protector celular, tal como plurónico F-68 para ajudar a prevenir lesão celular como resultado do processo de arejamento. Dependendo das características da célula hospedeira, os microveículos podem ser utilizados como substratos para crescimento para linhas celulares dependentes de ancoragem ou as células podem ser adaptadas para cultura em suspensão (o que é típico). O cultivo de células hospedeiras, particularmente células hospedeiras de invertebrados, pode utilizar uma variedade de modos operacionais, tal como alimentação em contínuo, processamento repetido em contínuo (ver Drapeau *et al.*, (1994) *Cytotechnology* 15: 103-109), processo de contínuo estendido ou cultura de perfusão. Embora as células hospedeiras mamíferas transformadas recombinantemente possam ser cultivadas em meios contendo soro, tal como soro de vitelo fetal (FCS), prefere-se que tais células hospedeiras sejam cultivadas em meios sintéticos sem soro, tal como divulgado em Keen *et al.*, (1995) *Cytotechnology* 17: 153-163, ou meios disponíveis comercialmente, tal como ProCHO-CDM ou UltraCHO™ (Cambrex NJ, EUA), suplementado quando necessário com uma fonte de energia, tal como glicose e factores de crescimento sintéticos, tal como insulina recombinante. O cultivo sem soro de células hospedeiras pode requerer que estas células sejam adaptadas para crescer em condições sem soro. Uma abordagem de adaptação é cultivar estas células hospedeiras em meios contendo soro e trocar repetidamente 80% do meios de cultura por meios sem soro para que as células hospedeiras aprendam a adaptar-se em condições sem soro (ver, e. g., Scharfenberg K *et al.*, (1995) em *Animal Cell Technology: Developments towards The 21st Century*

(Beuvery E. C. et al. eds), 619-623, Kluwer Academic Publishers).

Os anticorpos da invenção secretados nos meios podem ser recuperados e purificados utilizando uma variedade de técnicas para proporcionar um grau de purificação adequado para a utilização pretendida. Por exemplo, a utilização de anticorpos terapêuticos da invenção para o tratamento de doentes humanos requer tipicamente, pelo menos, 95% de pureza, mais tipicamente 98% ou 99% ou mais de pureza (comparado com o meio de cultura bruto). No primeiro caso, os resíduos celulares dos meios de cultura são removidos, tipicamente, utilizando centrifugação seguida por uma etapa de clarificação do sobrenadante utilizando, e. g., microfiltração, ultrafiltração e/ou filtração profunda. Estão disponíveis várias outras técnicas, tal como diálise e eletroforese em gel e técnicas cromatográficas, tal como hidroxipatite (HA), cromatografia de afinidade (envolvendo opcionalmente um sistema de marcação de afinidade, tal como poli-histidina) e/ou cromatografia de interacção hidrofóbica (HIC, ver documento US 5429746). Numa forma de realização, os anticorpos da invenção, seguindo várias etapas de clarificação, são capturados utilizando cromatografia de afinidade de Proteína A ou G seguida por etapas de cromatografia adicionais, tal como cromatografia HA e/ou de troca iónica, troca aniónica ou catiónica, cromatografia de exclusão em gel e precipitação por sulfato de amónio. Tipicamente, são também empregues várias etapas de remoção de vírus (e. g., nanofiltração utilizando, e. g., filtro DV-20). Após estas várias etapas, uma preparação purificada (de um modo preferido monoclonal) compreendendo, pelo menos, 75 mg/mL ou mais, e. g., 100 mg/mL ou mais do anticorpo da invenção ou seu fragmento de ligação a antígeno é proporcionado e forma, deste modo, uma forma de realização da

invenção. Adequadamente, tais preparações são consideravelmente livres de formas agregadas de anticorpos da invenção.

4. Composições Farmacêuticas

As preparações purificadas de anticorpos da invenção (particularmente preparações monoclonais) como descrito *supra*, podem ser incorporadas em composições farmacêuticas para utilização no tratamento de doenças e distúrbios humanos, tais como doenças atópicas, e. g., asma, rinite alérgica, COPD. Tipicamente, estas composições compreendem um veículo farmacêuticamente aceitável como conhecido e denominado por prática farmacêutica aceitável, ver, e. g., Remingtons Pharmaceutical Sciences, 16th edition (1980), Mark Publishing Co. Exemplos destes veículos incluem veículos esterilizados, tal como soro fisiológico, solução de Ringer ou solução de dextrose, tamponada com tampões apropriados para um pH numa faixa de 5 até 8. As composições farmacêuticas para injeção (e. g., intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, subcutânea, intramuscular ou intraportal) ou infusão contínua são adequadamente livres de matéria particulada visível e podem compreender entre 0,1 ng até 100 mg de anticorpo, de um modo preferido entre 5 mg e 25 mg de anticorpo. Os métodos para a preparação de tais composições farmacêuticas são bem conhecidos pelos especialistas na técnica. Numa forma de realização, as composições farmacêuticas compreendem entre 0,1 ng até 100 mg de anticorpos terapêuticos da invenção em forma de unidade de dosagem, opcionalmente em conjunto com instruções para utilização. As composições farmacêuticas da invenção podem ser liofilizadas (secas congeladas) para reconstituição antes da administração de acordo com métodos bem conhecidos ou evidentes

para os especialistas na técnica. Quando as formas de realização da invenção compreendem anticorpos da invenção com um isotipo IgG1, pode ser adicionado um quelante de cobre, tal como citrato (e. g., citrato de sódio) ou EDTA ou histidina à composição farmacêutica para reduzir o grau de degradação mediada por cobre dos anticorpos deste isotipo, ver documento EP0612251. O tratamento anti-hIL-13 pode ser dado oralmente, por inalação, topicamente (e. g., intra-ocular, intranasal, rectal em ferimentos na pele).

As doses e regimes de tratamento eficazes para administração do anticorpo da invenção são geralmente determinados empiricamente e são dependentes de factores, tais como a idade, peso e estado de saúde do doente e doença ou distúrbio a ser tratado. Tais factores estão dentro do alcance do médico assistente. A orientação na selecção de doses apropriadas pode ser encontrada em e. g., Smith *et al.*, (1977) *Antibodies in human diagnosis and therapy*, Raven Press, Nova Iorque, mas em geral está entre 1 mg e 1000 mg.

Dependendo da doença ou distúrbio a ser tratado (mas particularmente asma), as composições farmacêuticas compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo da invenção podem ser utilizadas simultaneamente, separadamente ou sequencialmente com uma quantidade eficaz de um outro medicamento, tais como agentes anti-inflamatórios (e. g., corticosteróide ou um NSAID), agentes anticolinérgicos (particularmente antagonistas de receptor M1/M2/M3), agonistas de adrenoreceptor β_2 , agentes anti-infecciosos (e. g., antibióticos, antivirais), anti-histaminas, inibidor de PDE4. Exemplos de agonistas de adrenoreceptor β_2 incluem salmeterol, salbutamol, formoterol, salmefamol, fenoterol, terbutalina.

Agonistas de adrenoreceptor β_2 de longa duração preferidos incluem aqueles descritos nos documentos WO 02/66422A, WO 02/270490, WO 02/076933, WO 03/024439 e WO 03/072539. Os corticosteróides adequados incluem metilprednisolona, prednisolona, dexametasona, propionato de fluticasona, éster S-fluormetílico do ácido $6\alpha,9\alpha$ -difluor- 17α -[(2-furanilcarbonil)oxi]- 11β -hidroxi- 16α -metil-3-oxo- 17α -propioniloxi-androsta-1,4-dieno- 17β -carbottióico, éster S-(2-oxo-tetra-hidro-furan-3S-ílico) do ácido $6\alpha,9\alpha$ -difluor- 11β -hidroxi- 16α -metil-3-oxo-androsta-1,4-dieno- 17β -carbottióico, ésteres de beclometasona (e. g., o éster de 17-propionato ou o éster de 17,21-dipropionato), budesonida, flunisolida, ésteres de mometasona (e. g., o éster de furoato), acetonida de triancinolona, rofleponida, ciclesonida (16α - 17 [[(R) -ciclohexilmetileno]bis(oxi)]- 11β ,21-di-hidroxi-pregna-1,4-dieno-3,20-diona), propionato de butixocorte, RPR-106541 e ST-126. Os corticosteróides preferidos incluem propionato de fluticasona, éster S-fluormetílico do ácido $6\alpha,9\alpha$ -difluor- 17α -[(2-furanilcarbonil)oxi]- 11β -hidroxi- 16α -metil-3-oxo- 17α -propioniloxi-androsta-1,4-dieno- 17β -carbottióico e éster S-fluormetílico do ácido $6\alpha,9\alpha$ -difluor- 17α -[(2-furanilcarbonil)oxi]- 11β -hidroxi- 16α -metil-3-oxo-androsta-1,4-dieno- 17β -carbottióico, de um modo mais preferido, éster S-fluormetílico do ácido $6\alpha,9\alpha$ -difluor- 17α -[(2-furanilcarbonil)oxi]- 11β -hidroxi- 16α -metil-3-oxo-androsta-1,4-dieno- 17β -carbottióico. Os compostos não esteroidais possuindo agonismo glicocorticóide que podem possuir selectividade para transrepressão sobre a transativação e que podem ser úteis em terapia de associação incluem os documentos cobertos nas seguintes patentes: WO 03/082827, WO 01/10143, WO 98/54159, WO 04/005229, WO 04/009016, WO 04/009017, WO 04/018429, WO 03/104195, WO 03/082787, WO 03/082280, WO 03/059899, WO 03/101932, WO 02/02565, WO 01/16128,

WO 00/66590, WO 03/086294, WO 04/026248, WO 03/061651, WO 03/08277.

Os agentes anti-inflamatórios adequados incluem fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (NSAID).

Os NSAID adequados incluem cromoglicato de sódio, nedocromil sódico, inibidores de fosfodiesterase (PDE) (e. g., teofilina, inibidores de PDE4 ou inibidores de PDE3/PDE4 misturados), antagonistas de leucotrieno, inibidores de síntese de leucotrieno (e. g., montelukast), inibidores de iNOS, inibidores de triptase e elastase, antagonistas de integrina beta-2 e agonistas ou antagonistas de receptor de adenosina (e. g., agonistas de adenosina 2a), antagonistas de citocina (e. g., antagonistas de quimiocina, tal como um antagonista de CCR3) ou inibidores de síntese de citocina, ou inibidores de 5-lipoxigenase. Outros agonistas de adrenoreceptor β_2 adequados incluem salmeterol (e. g., como o xinafoato), salbutamol (e. g., como o sulfato ou a base livre), formoterol (e. g., como o fumarato), fenoterol ou terbutalina e seus sais. Um iNOS (inibidor de óxido nítrico sintase induzível) é de um modo preferido para administração oral. Os inibidores de iNOS adequados incluem os divulgados nos documentos WO 93/13055, WO 98/30537, WO 02/50021, WO 95/34534 e WO 99/62875. Os inibidores de CCR3 adequados incluem os divulgados no documento WO 02/26722.

De particular interesse é a utilização dos anticorpos da invenção em combinação com um inibidor de fosfodiesterase 4 (PDE4). O inibidor específico de pDE4 útil neste aspecto da invenção pode ser qualquer composto que seja conhecido por inibir a enzima PDE4 ou que se verificou agir como um inibidor

de PDE4, e que seja apenas inibidor de PDE4, não compostos que inibem outros membros da família de PDE, tal como PDE3 e PDE5, assim como PDE4.

Os compostos de interesse incluem ácido *cis*-4-ciano-4-(3-ciclopentilóxi-4-metoxifenil)ciclo-hexano-1-carboxílico, 2-carbometoxi-4-ciano-4-(3-ciclopropilmetoxi-4-difluorometoxifenil)ciclo-hexano-1-ona e *cis*-[4-ciano-4-(3-ciclopropilmetoxi-4-difluormetoxifenil)ciclo-hexano-1-ol]. Também, o ácido *cis*-4-ciano-4-(3-ciclopentilóxi-4-metoxifenil)ciclo-hexano-1-carboxílico (também conhecido como cilomilast) e seus sais, ésteres, pró-fármacos ou formas físicas, que são descritas na patente U. S. 5552438 apresentada em 3 de Setembro de 1996; esta patente e os compostos que ela divulga são aqui incorporados na totalidade como referência.

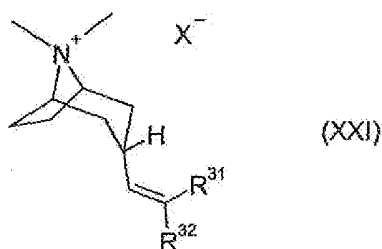
AWD-12-281 da Elbion (Hofgen, N. *et al.* 15^a EFMC Int. Symp. Med. Chem. (6-10 Set., Edimburgo) 1998, Res. p. 98; referência CAS N° 247584020-9); um derivado de 9-benziladenina denominado NCS-613 (INSERM); D-4418 da Chiroscience e Schering-Plough; um inibidor de PDE4 benzodiazepina identificado como CI-1018 (PD-168787) e atribuído a Pfizer; um derivado de benzodioxol divulgado por Kyowa Hakko no documento WO 99/16766; K-34 de Kyowa Hakko; V-11294A de Napp (Landells, L. J. *et al.*, Eur. Resp. J. [Annu. Cong. Eur. Resp. Soc. (19-23 Set., Genebra) 1998] 1998, 12 (Suppl. 28): Res. P2393); roflumilast (referência CAS N° 162401-32-3) e uma ftalazinona (documento WO 99/47505, a divulgação da qual é, desse modo, incorporada por referência) de Byk-Gulden; pumafentrina, (-)-p-[(4aR*,10bS*)-9-etoxi-1,2,3,4,4a,10b-hexaidro-8-metoxi-2-metilbenzo[c][1,6]naftiridin-6-il]-N,N-diisopropilbenzamida que é um inibidor de PDE3/PDE4 misto que foi preparado e publicado por Byk-Gulden, agora

Altana; arofilina sob desenvolvimento por Almirali-Prodesfarma; VM554/UM565 de Vernalis; ou T-440 (Tanabe Seiyaku; Fuji, K. *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998, 284(1): 162) e T2585.

Os compostos adicionais de interesse são divulgados no pedido de patente internacional publicado WO 04/024728 (Glaxo Group Ltd), documentos PCTEP2003/014867 (Glaxo Group Ltd) e PCTEP2004/005494 (Glaxo Group Ltd).

Os agentes anticolinérgicos adequados são aqueles compostos que actuam como antagonistas nos receptores muscarínicos, em particular os compostos que são antagonistas dos receptores M₁ ou M₃, antagonistas duais dos receptores M₁/M₃ ou M₂/M₃ ou pan-antagonistas dos receptores M₁/M₂/M₃. Os compostos exemplares para administração através de inalação incluem ipratrópio (e. g., como o brometo, CAS 22254-24-6, vendido sob o nome Atrovent), oxitrópio (e. g., como o brometo, CAS 30286-75-0) e tiotrópio (e. g., como o brometo, CAS 136310-93-5, vendido sob o nome Spiriva). Também de interesse são revatropato (e. g., como o brometo, CAS 262586-79-8) e LAS-34273 que é divulgado no documento WO 01/04118. Os compostos exemplares para administração oral incluem pirenzepina (CAS 28797-61-7), darifenacina (CAS 133099-04-4, ou CAS 133099-07-7 para o brometo vendido sob o nome Enablex), oxiburtinina (CAS 5633-20-5, vendido sob o nome Ditropan), terodilina (CAS 15793-40-5), tolterodina (CAS 124937-51-5, ou CAS 124937-52-6 para o tartarato, vendido sob o nome Detrol), otilónio (e. g., como o crometo, CAS 26095-59-0, vendido sob o nome Spasmomen), cloreto de tróspio (CAS 10405-02-4) e solifenacina (CAS 242478-37-1, ou CAS 242478-38-2 para o succinato também conhecido como YM-905 e vendido sob o nome Vesicare).

Os outros agentes anticolinérgicos incluem compostos de fórmula (XXI), que são divulgados no pedido de patente U.S. 60/487981:



em que a orientação preferida da cadeia de alquilo ligada ao anel de tropano é endo; R^{31} e R^{32} são, independentemente, seleccionados do grupo consistindo em grupos alquilo inferior de cadeia ramificada ou linear possuindo de um modo preferido de 1 a 6 átomos de carbono, grupos cicloalquilo possuindo de 5 a 6 átomos de carbono, cicloalquil-alquilo que tem de 6 a 10 átomos de carbono, 2-tienilo, 2-piridilo, fenilo, fenilo substituído com um grupo alquilo que não tem mais do que 4 átomos de carbono e fenilo substituído com um grupo alcóxido que não tem mais do que 4 átomos de carbono; X^- representa um anião associado com a carga positiva do átomo N. X^- pode ser, mas não está limitado a cloreto, brometo, iodeto, sulfato, sulfonato de benzeno e sulfonato de tolueno, incluindo, por exemplo:

Brometo de (3-*endo*)-3-(2,2-di-2-tienileténil)-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano;

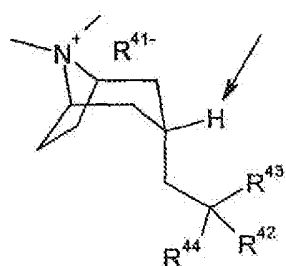
Brometo de (3-*endo*)-3-(2,2-difenileténil)-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano;

4-metilbenzenossulfonato de (3-*endo*)-3-(2,2-difenil-etenil)-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano;

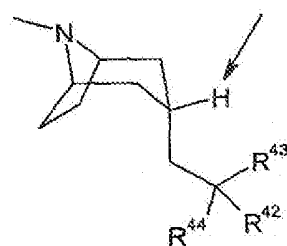
Brometo de (3-*endo*)-8,8-dimetil-3-[2-fenil-2-(2-tienil)etenil]-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano; e/ou

Brometo de (3-*endo*)-8,8-dimetil-3-[2-fenil-2-(2-piridinil)etenil]-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano.

Os agentes anticolinérgicos adequados adicionais incluem compostos de fórmula (XXII) ou (XXIII), que são divulgados no pedido de patente U.S. 60/511009:



(XXII)



(XXIII)

em que:

o átomo H indicado está na posição *exo*;

R^{41} representa um anião associado com a carga positiva do átomo N. R^{1-} pode ser, mas não está limitado a, cloreto, brometo, iodeto, sulfato, sulfonato de benzeno e sulfonato de tolueno;

R^{42} e R^{43} são independentemente seleccionados do grupo consistindo em grupos de alquilo inferior de cadeia ramificada ou linear (que têm de um modo preferido de 1 a 6 átomos de carbono), grupos cicloalquilo (que têm de 5 a 6 átomos de carbono), cicloalquil-alquilo (que têm de 6 a 10 átomos de carbono), heterocicloalquilo (que têm de 5 a 6 átomos de carbono) e N ou O como o heteroátomo, heterocicloalquil-alquilo (que têm de 6 até 10 átomos de carbono) e N ou O como o heteroátomo, arilo, opcionalmente arilo substituído, feteroarilo e, opcionalmente, heteroarilo substituído;

R^{44} é seleccionado do grupo consistindo em alquilo(C_1-C_6),
 cicloalquilo(C_3-C_{12}), heterocicloalquilo(C_3-C_7),
 alquilo(C_1-C_6)cicloalquilo(C_3-C_{12}), alquilo(C_1-C_6)
 heterocicloalquilo(C_3-C_7), arilo, heteroarilo, alquilo(C_1-C_6)-arilo,
 alquilo(C_1-C_6)-heteroarilo, $-OR^{45}$, $-CH_2OR^{45}$, $-CH_2OH$, $-CN$, $-CF_3$, $-$
 $CH_2O(CO)R^{46}$, $-CO_2R^{47}$, $-CH_2NH_2$, $-CH_2N(R^{47})SO_2R^{45}$, $-SO_2N(R^{47})(R^{48})$, $-$
 $CON(R^{47})(R^{48})$, $-CH_2N(R^{48})CO(R^{46})$, $-CH_2N(R^{48})SO_2(R^{46})$, $-CH_2N(R^{48})CO_2(R^{45})$,
 $-CH_2N(R^{48})CONH(R^{47})$;

R^{45} é seleccionado do grupo consistindo em alquilo(C_1-C_6),
 alquilo(C_1-C_6)cicloalquilo(C_3-C_{12}), alquilo(C_1-C_6)
 heterocicloalquilo(C_3-C_7), alquilo(C_1-C_6)-arilo, alquilo(C_1-C_6)-
 heteroarilo;

R^{46} é seleccionado do grupo consistindo em alquilo(C_1-C_6),
 cicloalquilo(C_3-C_{12}), heterocicloalquilo(C_3-C_7),
 alquilo(C_1-C_6)cicloalquilo(C_3-C_{12}), alquilo(C_1-C_6)
 heterocicloalquilo(C_3-C_7), arilo, heteroarilo, alquilo(C_1-C_6)-
 arilo, alquilo(C_1-C_6)-heteroarilo;

R^{47} e R^{48} são, independentemente, seleccionados do grupo
 consistindo em H, alquilo(C_1-C_6), cicloalquilo(C_3-C_{12}),
 heterocicloalquilo(C_3-C_7), alquilo(C_1-C_6)cicloalquilo(C_3-C_{12}),
 alquilo(C_1-C_6)heterocicloalquilo(C_3-C_7), alquilo(C_1-C_6)-arilo e
 alquilo(C_1-C_6)-heteroarilo, incluindo, por exemplo:

Iodeto de (endo)-3-(2-metoxi-2,2-di-tiofen-2-il-etil)-8,8-
 dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano;

3-((endo)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-
 propionitrilo;

(endo)-8-metil-3-(2,2,2-trifenil-etil)-8-aza-biciclo

[3.2.1]octano;

3-((endo)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propionamida;

ácido 3-((endo)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propiónico;

iodeto de (endo)-3-(2-ciano-2,2-difenil-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano;

brometo de (endo)-3-(2-ciano-2,2-difenil-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano;

3-((endo)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propan-1-ol;

N-benzil-3-((endo)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propionamida;

iodeto de (endo)-3-(2-carbamoil-2,2-difenil-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano;

1-benzil-3-[3-((endo)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propil]-ureia;

1-etil-3-[3-((endo)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propil]-ureia;

N-[3-((endo)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propil]-acetamida;

N-[3-((endo)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propil]-benzamida;

3-((endo)-8-metil-8-aza-biciclo [3.2.1] oct-3-il)-2,2-di-tiofen-2-il-propionitrila;

iodeto de (endo)-3-(2-ciano-2,2-di-tiofen-2-il-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano;

N-[3-((endo)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propil]-benzenossulfonamida;

[3-((endo)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propil]-ureia;

N-[3-((endo)-8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-

difenil-propil]-metanossulfonamida; e/ou

brometo de (endo)-3-{2,2-difenil-3-[(1-fenil-metanoil)-amino]-propil}-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano.

Os compostos mais preferidos úteis na presente invenção incluem:

iodeto de (endo)-3-(2-metoxi-2,2-di-tiofen-2-il-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano;

iodeto de (endo)-3-(2-ciano-2,2-difenil-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano;

brometo de (endo)-3-(2-ciano-2,2-difenil-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano;

iodeto de (endo)-3-(2-carbamoil-2,2-difenil-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano;

iodeto de (endo)-3-(2-ciano-2,2-di-tiofen-2-il-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano; e/ou

brometo de (endo)-3-{2,2-difenil-3-[(1-fenil-metanoil)-amino]-propil}-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano.

As anti-histaminas adequadas (também referidas como antagonistas de receptor H1) incluem qualquer um ou mais dos numerosos antagonistas conhecidos que inibem os receptores H1 e são seguros para utilização humana. Os antagonistas de primeira geração, incluem derivados de etanolaminas, etilenodiaminas e alquilominas, *e. g.*, difenil-hidramina, pirilamina, clemastina, clorofeniramina. Os antagonistas de segunda geração, que não são sedantes, incluem loratidina, desloratidina, terfenadina, astemizol, acrivastina, azelastina, levocetrisina, fexofenadina e cetrisina.

Os exemplos de anti-histaminas preferidas incluem loratidina, desloratidina, fexofenadina e cetirizina.

Outras combinações contempladas incluem a utilização de anticorpos da invenção em combinação com o agente anti-IL-4 (e. g., anticorpo anti-IL-4, tal como pascolizumab) e/ou agente anti-IL-5 (e. g., anticorpo anti-IL-5, tal como mepolizumab) e/ou agente anti-IgE (e. g., anticorpo anti-IgE, tal como omalizumab (Xolair™) ou talizumab).

Convenientemente, também é contemplada pela presente invenção uma composição farmacêutica compreendendo um kit de partes do anticorpo da invenção ou seu fragmento de ligação a antigénio em conjunto com outros destes medicamentos, opcionalmente o com instruções para utilização.

A invenção contempla ainda uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapêuticamente eficaz de anticorpo monoclonal terapêutico ou seu fragmento de ligação a antigénio como aqui descrito para utilização no tratamento de doenças responsivas a modulação da interacção entre hIL-13 e hIL-13R.

De acordo com a presente invenção é proporcionada uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo monoclonal terapêutico humanizado, anticorpo esse que compreende um domínio VH seleccionado do grupo consistindo em: SEQ ID N°: 11, 12, 13, 14 e um domínio VL seleccionado do grupo consistindo em: SEQ ID N°: 15, 16.

De acordo com a presente invenção é proporcionada uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo monoclonal terapêutico compreendendo uma cadeia pesada selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID N°: 18, 19, 20, 21 e uma cadeia leve selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID N°: 22, 23.

De acordo com a presente invenção é proporcionada uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo monoclonal terapêutico compreendendo uma cadeia pesada de SEQ ID N°: 18 e uma cadeia leve de SEQ ID N°: 22 e um veículo farmaceuticamente aceitável.

De acordo com a presente invenção é proporcionada uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo monoclonal compreendendo (ou consistindo essencialmente de) uma cadeia pesada de SEQ ID N°: 18 e uma cadeia leve de SEQ ID N°: 22 e um veículo farmaceuticamente aceitável.

De acordo com a presente invenção é proporcionada uma composição farmacêutica compreendendo um veículo farmaceuticamente aceitável e uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma população de anticorpo monoclonal terapêutico, anticorpo terapêutico esse que compreende uma cadeia pesada de SEQ ID N°: 18 e uma cadeia leve de SEQ ID N°: 22.

5. Utilizações clínicas

Os anticorpos da invenção podem ser utilizados no tratamento de doenças/distúrbios atópicos e doenças/distúrbios inflamatórios crônicos. De particular interesse, são as suas utilizações no tratamento de asma, tal como asma alérgica,

particularmente asma grave (esta é a asma que não responde a tratamento actual, incluindo corticosteróides administrados sistemicamente; ver Busse WW *et al.*, *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000, 106: 1033-1042), asma “difícil” (definida como o fenótipo asmático caracterizado por insuficiência para atingir o controlo apesar de doses máximas recomendadas de esteróides inalados prescritos, ver Barnes PJ (1998), *Eur. Respir. J.* 12: 1208-1218), asma “frágil” (define um subgrupo de doentes com asma instável, grave, que mantém uma variabilidade de fluxo expiratório de pico amplo (PEF) apesar das altas doses de esteróides inalados, ver Ayres JG *et al.*, (1998) *Thorax* 58: 315-321), asma noturna, asma pré-menstrual, asma resistente a esteróide (ver Woodcock AJ (1993) *Eur. Respir. J.* 6: 743-747), asma dependente de esteróide (definida como asma que pode ser controlada apenas com altas doses de esteróides orais), asma induzida por aspirina, asma de início adulto, asma pediátrica. Os anticorpos da invenção podem ser utilizados para prevenir, reduzir a frequência de, ou aliviar os efeitos de episódios asmáticos agudos (*status asthmaticus*). Os anticorpos da invenção podem também ser utilizados para reduzir a dosagem necessária (em termos de quantidade administrada ou frequência de dosagem) de outros medicamentos utilizados no tratamento de asma. Por exemplo, os anticorpos da invenção podem ser utilizados para reduzir a dosagem necessária para tratamento por esteróide de asma, tal como tratamento por corticosteróide (“limitação de esteróide”). Outras doenças ou distúrbios que podem ser tratados com anticorpos da invenção incluem dermatite atópica, rinite alérgica, doença de Crohn, doença pulmonar obstrutiva crónica (COPD), esofagite eosinofílica, doenças fibróticas ou distúrbios, tal como fibrose pulmonar idiopática, esclerose sistémica progressiva (escleroderma), fibrose hepática, granulomas hepáticos, esquistossomose, leishmaniose e doenças de

regulação de ciclo celular, e. g., doença de Hodgkins, leucemia linfocítica crónica de célula B. Doenças ou distúrbios adicionais que podem ser tratados com anticorpos da invenção são detalhados nos Antecedentes da invenção acima.

Numa forma de realização da invenção é proporcionado um método para tratar um doente humano que sofre de uma doença asmática que é refractária a tratamento com corticosteróides, método esse que compreende a etapa de administrar ao referido doente uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo da invenção.

Noutra forma de realização é proporcionado um método para prevenir um ataque asmático agudo num doente humano, método esse que compreende a etapa de administrar ao referido doente uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo da invenção.

Noutra forma de realização é proporcionado um método para reduzir a frequência de e/ou aliviar os efeitos de um ataque asmático agudo num doente humano, método esse que compreende a etapa de administrar ao referido doente uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo da invenção.

Noutra forma de realização da invenção é proporcionado um método para tendenciar a resposta de célula auxiliar T para uma resposta tipo Th1 após uma agressão inflamatória e/ou alérgica num doente humano, método esse que compreende administrar ao referido doente uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo ou seu fragmento de ligação a antigénio da invenção.

Noutra forma de realização da invenção é proporcionado um método para tratar um doente humano que tem a variante

Q130hIL-13, doente esse que sofre de asma, tal como asma grave, compreendendo o referido método a etapa de administrar ao referido doente uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno da invenção.

Embora a presente invenção tenha sido descrita principalmente em relação ao tratamento de doenças ou distúrbios humanos, a presente invenção também pode ter aplicações no tratamento de doenças ou distúrbios semelhantes em mamíferos não humanos.

A presente invenção é agora descrita apenas através de exemplo.

Exemplificação

1. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL DE MURGANHO 6A1

Os anticorpos monoclonais (mAb) são produzidos por células de hibridoma, geralmente de acordo com o método apresentado em Harlow E e Lane D, *Antibodies a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. O resultado da fusão de células de mieloma de murganho com linfócitos B de murganhos imunizados com o antígeno alvo. A célula de hibridoma é imortalizada pelo parceiro de fusão do mieloma enquanto a capacidade para produzir anticorpos é proporcionada pelo linfócito B.

Cinco murganhos SJL foram imunizados por injeção peritoneal, cada com 2 µg de IL-13 humana recombinante de *E. coli* (Cambridge Bioscience, Cat. Nº CH-013). Um cronograma de

imunização foi utilizado para desenvolver um título alto de resposta imunitária de anticorpo anti-IL-13 humana nos murganhos. Após 5 imunizações durante 64 dias, os murganhos foram seleccionados e as células de baço recuperadas. As células de baço de 3 dos murganhos foram removidas e os linfócitos B fundidos com células de mieloma de murganho derivadas de células P3X utilizando PEG1500 (Boehringer) para produzir hibridomas. As linhas celulares de hibridoma individual foram clonadas por diluição limitante (Harlow E e Lane D, *supra*). Os poços contendo colónias únicas foram identificados microscopicamente e os sobrenadantes testados por actividade. As células dos clones mais activos foram expandidas por criopreservação, produção de anticorpo, etc.

Inicialmente, os sobrenadantes de hibridoma foram testados para actividade de ligação contra uma proteína IL-13 humana marcada com det-1 recombinante expressa em *E. coli* ("preparada internamente") num formato de ensaio em sanduíche. Uma triagem secundária desses positivos foi terminada utilizando um método de BIAcore™ para detectar a ligação à proteína IL-13 humana marcada com det-1. As amostras desses hibridomas foram então testadas pela capacidade para neutralizar a bioactividade de IL-13 humana recombinante expressa em *E. coli* (Cambridge Bioscience, cat. N° CH-013) num bioensaio celular de TF-1.

Seis positivos identificados a partir do bioensaio de neutralização de IL-13 humana foram subclonados por diluição limitante para gerar linhas celulares monoclonais estáveis. As imunoglobulinas desses hibridomas, cultivados em fábricas celulares sob condições sem soro, foram purificadas utilizando colunas de proteína A imobilizada. Esses mAb purificados foram então triados novamente nos seguintes sistemas de ensaio;

- Ligação a IL-13 humana recombinante expressa em *E. coli* (num formato de ELISA em sanduíche)
- Inibição de ligação de IL-13 humana marcada com det-1 recombinante expressa em *E. coli* a ambas as cadeias de receptor de IL-13 (num formato de ELISA em sanduíche)
- Neutralização de IL-13 recombinante expressa em *E. coli* ou humana ou de cinomólogo (num bioensaio celular de TF-1)
- Neutralização de IL-13 humana expressa em mamífero (num bioensaio celular de TF-1)
- Neutralização de uma variante de IL-13 humana Q130 recombinante expressa em *E. coli* (num bioensaio celular de TF-1)
- Especificidade para ligação a IL-13 humana pela avaliação de reactividade cruzada de mAb para a IL-4 humana numa ELISA anti-IL-4 e avaliação de reactividade cruzada de mAb para a IL-5 humana num bioensaio de neutralização de IL-5.
- análise por BIAcore™ para medidas de afinidade de ligação a IL-13 humana

O anticorpo monoclonal 6A1 foi identificado como um anticorpo que neutralizou a bioactividade de IL-13 tanto humana como de cinomólogo. As seguintes análises descrevem o perfil para anticorpo monoclonal 6A1 nestes ensaios.

1.1 Ligação a IL-13 humana recombinante expressa em *E. coli*

O 6A1 ligou-se a IL-13 humana recombinante expressa em *E. coli* numa ELISA em sanduíche, método substancialmente como descrito na seção 7. Ver a Figura 1.

1.2 Inibição de ligação de IL-13 humana marcada com det-1 recombinante expressa em *E. coli* a IL-13R α 1 e IL-13R α 2 num formato de ELISA

O 6A1 inibiu a ligação de IL-13 humana marcada com det-1 recombinante expressa em *E. coli* a ambas as cadeias de receptor de IL-13 humana. Além disso, inibiu a ligação mais eficientemente que um reagente de anticorpo monoclonal anti-IL-13 humana e policlonal anti-IL-13 humana disponíveis comercialmente (fornecidos por R&D Systems). Um valor de IC₅₀ de 0,165 µg/mL foi calculado para a inibição da ligação de IL-13 humana a IL-13R α 1 pelo anticorpo monoclonal 6A1. Um valor de IC₅₀ de 0,056 µg/mL foi calculado para a inibição de ligação de IL-13 humana a IL-13R α 2 pelo anticorpo monoclonal 6A1. Ver as Figuras 2A e 2B. Uma IgG controlo de especificidade irrelevante não teve actividade detectável.

1.3 Neutralização de IL-13 humana e de cinomólogo recombinante expressa em *E. coli* num bioensaio de Proliferação celular de TF-1

As células TF-1 podem proliferar em resposta a IL-13 humana e IL-13 de cinomólogo. Um bioensaio foi desenvolvido para avaliar a capacidade neutralização de um mAb anti-IL-13 em proliferação celular TF-1 induzida por IL-13 humana e de cinomólogo. O 6A1 neutralizou a bioactividade tanto de IL-13 humana como de cinomólogo num bioensaio célula TF-1. Além disso, neutralizou tanto a IL-13 humana como de cinomólogo de modo mais potente que os reagentes de anticorpo monoclonal anti-IL-13 humana e policlonal anti-IL-13 humana disponíveis comercialmente (fornecido por R&D Systems). Ver a Figura 3.

Um valor ND₅₀ médio de 0,0783 µg/mL foi calculado para a neutralização de 5 ng/mL de bioatividade de IL-13 humana recombinante expressa em *E. coli* num bioensaio celular de TF-1 por anticorpo monoclonal 6A1. Um valor de ND₅₀ de 0,04 µg/mL foi calculado para a neutralização de 5 ng/mL de bioatividade de IL-13 de cinomólogo recombinante expressa em *E. coli* num bioensaio celular de TF-1 por anticorpo monoclonal 6A1. [O valor de ND₅₀ (dose de neutralização) é a concentração de anticorpo monoclonal necessária para reduzir a proliferação celular de TF-1 em 50%, em resposta a uma concentração selecionada de IL-13].

1.4 Neutralização de IL-13 humana expressa em mamífero (células CHO) num bioensaio de proliferação celular de TF-1

A capacidade de neutralização do anticorpo monoclonal 6A1 para IL-13 humana expressa em células CHO foi avaliada num ensaio de proliferação celular de TF-1. O 6A1 neutralizou IL-13 humana expressa por mamífero de modo mais potente que um reagente policlonal anti-IL-13 humana disponível comercialmente como medido por valores de ND₅₀. Um valor de ND₅₀ de 0,037 µg/mL foi calculado para a neutralização de ~50 ng/mL de IL-13 humana expressa por mamífero num bioensaio celular de TF-1 por anticorpo monoclonal 6A1. Ver a Figura 4.

1.5 Neutralização da variante de IL-13 humana Q130 recombinante num bioensaio de proliferação celular de TF-1

A capacidade de neutralização de anticorpo monoclonal 6A1 para IL-13 humana Q130 recombinante expressa por *E. coli*

(Peprotech, Cat. N° 200-13A) foi avaliada num ensaio de proliferação celular de TF-1. O 6A1 neutralizou a IL-13 humana Q130 de modo mais potente que um reagente policlonal anti-IL-13 humana disponível comercialmente. Um valor de ND₅₀ de 0,11 µg/mL foi calculado para a neutralização de 60 ng/mL de bioactividade da IL-13 humana Q130 num bioensaio celular de TF-1 por anticorpo monoclonal 6A1. Ver a Figura 5.

1.6 Especificidade da ligação a IL-13 humana

Como a IL-4 humana compartilha a maior identidade com IL-13 humana tanto estruturalmente como funcionalmente, a especificidade de anticorpo monoclonal 6A1 para IL-13 humana foi avaliada numa ELISA de ligação a IL-4 humana. O 6A1 não se ligou detectavelmente a IL-4 humana recombinante expressa por *E. coli*, indicando o alto nível de especificidade deste anticorpo monoclonal para a IL-13 humana. Além disso, 6A1 não neutralizou de forma cruzada detectável a bioactividade de IL-5 humana recombinante expressa por *E. coli* num bioensaio celular de TF-1. Ver as Figuras 6 e 7.

1.7 Análise por BIAcore™

A afinidade de 6A1 para IL-13 de cinomólogo e humana recombinante foi avaliada por análise de BIAcore™. Ver a Tabela 1.

Tabela 1

Amostra de IL-13	Taxa de associação Ka (1/Ms)	Taxa de dissociação Kd (1/s)	Constante de afinidade (KD)
IL-13 humana marcado com det-1	$2,25 \times 10^6$	$7,2 \times 10^{-5}$	32 pM
Il-13 humana	$6,82 \times 10^5$	$1,84 \times 10^{-4}$	270 pM
IL-13 cino	$9,14 \times 10^5$	$5,6 \times 10^{-5}$	61,2 pM

Estes dados indicam que 6A1 tem uma afinidade tanto para a IL-13 humana como para a de cinomólogo. [Duas amostras de IL-13 humana diferentes (ambas produzidas em *E. coli*) foram utilizadas para esta análise. A IL-13 é consideravelmente insolúvel quando produzida em *E. coli*, mas pode ser solubilizada e então reorganizada *in vitro*. As diferenças na qualidade das duas amostras de IL-13 reorganizadas podem explicar a diferença em afinidades de ligação para cada uma destas amostras de IL-13 humana].

2. CLONAGEM DE REGIÕES VARIÁVEIS DE CLONE 6A1

O ARN total foi extraído de células de hibridoma de clone 6A1 e o ADNc dos domínios variáveis de cadeia leve e pesada foi produzido por transcrição reversa utilizando iniciadores específicos para a sequência líder murina e as regiões constantes de anticorpo de acordo com o isotipo pré-determinado (IgG1/k). O ADNc dos domínios pesado e leve variáveis foi então clonado novector pCR2.1 para sequenciação.

2.1 Extração de ARN

O ARN total foi extraído de sedimentados de aproximadamente 10^6 células de clone 6A1 de hibridoma utilizando o Sistema de Isolamento de ARN total de SV da Promega de acordo com as instruções do fabricante.

2.2 Transcrição Reversa

O ARN foi transcrito reversamente para produzir o ADNc dos domínios pesado e leve variáveis utilizando iniciadores específicos para as sequências líderes murinas e regiões constantes de IgG1/ κ murinas. A mistura de iniciadores utilizados é exposta em Jones ST Bendig MM *Bio/Technology* 9: 88-89 (1991).

As misturas de iniciadores directos de sequência líder de V_H e V_L de murinos foram preparados a 50 μ M. As soluções dos iniciadores reversos de região constante de IgG1 e κ de murino também foram preparadas a 50 μ M.

2.3 PCR de Transcrição Reversa e (RT-PCR)

A transcrição reversa do ARN que codifica as regiões pesada e leve variáveis foram efectuadas em duplicados utilizando o Access RT-PCR System da Promega de acordo com as instruções do fabricante. Os iniciadores directo e reverso de V_H e V_L foram como descrito acima.

2.4 Purificação em gel de produto de RT-PCR

Os produtos de RT-PCR ($2 \times V_H$ e $2 \times V_L$) foram aplicados em solução marcadora de corrida num gel de agarose 1% preparativo contendo 0,01% de brometo de etídeo e separado em tampão TAE a 100 V durante 1 hora e as bandas de região V excisadas. Um marcador de ADN de 100 pb também foi separado no gel para permitir a identificação das bandas de V_H e V_L .

Os fragmentos de ADN foram extraídos e purificados do gel utilizando o kit de extração de gel QIAquick™ da Qiagen de acordo com instruções do fabricante.

2.5 Ligação

Os fragmentos de RT-PCR purificados ($2 \times V_H$ e $2 \times V_L$) foram clonados no vector pCR2.1 utilizando o kit T.A. cloning da Invitrogen de acordo com instruções do fabricante.

2.6 Transformação

Os plasmídeos ligados foram transformados em células TOP10F' de acordo com instruções do kit T.A. cloning. 50 μ L e 200 μ L de células transformadas foram espalhados em placas de L-agar contendo 100 μ g/mL de ampicilina e cobertas com 8 μ L de solução de IPTG de 500 mM e 16 μ L de solução de X-Gal em DMF. As placas foram incubadas de um dia para o outro a 37 °C.

2.7 Sequenciação

As colónias foram picadas e cultivadas de um dia para o outro a 37 °C em 5 mL de meio LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina.

Os plasmídeos pCR2.1 contendo domínios V_H e V_L de 6A1 foram extraídos e purificados utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep da Qiagen de acordo com instruções do fabricante. Os domínios V_H e V_L foram sequenciados utilizando os iniciadores T7, M13 directo e M13 reverso.

Sequência de aminoácidos da região V_H de 6A1 (consenso de 10 clones de 2 reações de RT-PCR): SEQ ID N°: 7

Sequência de aminoácidos da região V_L de 6A1 (consenso de 10 clones de 2 reações de RT-PCR): SEQ ID N°: 8

3. ANTICORPO QUIMÉRICO

Um anticorpo quimérico consistindo em regiões V murinas parentais (descrito na seção 2.7) foi enxertado em regiões tipo C selvagens de IgG1/k humanas, isto foi concebido para confirmar a clonagem das regiões V murinas correctas e também para ser utilizada como uma referência quando testar construções humanizadas. O anticorpo quimérico foi expresso em células CHO, purificado e testado para ligação a IL-13 humana por ELISA.

3.1 Amplificação por PCR

As regiões V murinas clonadas foram amplificadas por PCR para introduzir sítios de restrição requeridos para clonagem em vectores de expressão em mamífero Rld e Rln. Os sítios de *Hind* III e *Spe* I foram concebidos para pôr em fase o domínio V_H e permitir a clonagem num vector Rld modificado contendo a região tipo C selvagem γ1 humana. Os sítios de *Hind* III e *BsiW* I foram concebidos para pôr em fase o domínio V_L e permitir a clonagem num vector Rln modificado contendo a região κ C humana.

Iniciador directo de V_H:

GAT GAA GCT **TGC CAC** CAT GAA ATG CAG CTG GGT CAT C-3'
(SEQ ID N°: 86)

O sítio de restrição de *Hind* III está sublinhado e a sequência de Kozak em negrito.

Iniciador reverso de V_H:

5'-GAT GGA CTA GTG TTC CTT GAC CCC AGT A -3'

O sítio de restrição de *Spe* I está sublinhado.

Iniciador directo de V_L:

5'-GAT GAA GCT **TGC CAC** CAT GAA GTT GCC TGT TAG GCT G-3'
(SEQ ID N°: 88)

O sítio de restrição de *Hind* III está sublinhado e a sequência de Kozak em negrito.

Iniciador reverso de V_L:

5'-GAT GCG TAC GTT TGA TTT CCA GCT TGG TGC C-3'
(SEQ ID N°: 89)

O sítio de restrição de BsiW I está sublinhado.

Reação de PCR:	água	66 µL
	tampão de PCR 10x	10 µL
	dNTP (2 mM)	10 µL
	iniciador 1 (5 µM)	4 µL
	iniciador 2 (5 µM)	4 µL
	AmpliTaq polimerase	2 µL
	plasmídeo	4 µL
	purificado	
	vol. total	100 µL

Iniciador 1: iniciador direto de V_H ou V_L

Iniciador 2: iniciador reverso de V_H ou V_L

Plasmídeo purificado: plasmídeo pCR2.1 de V_H ou V_L
purificado por Minipreps da Qiagen (diluído 200x).

ciclo de PCR: 1- 95 °C durante 4 min
2- 95 °C durante 1 min
3- 55 °C durante 1 min
4- 72 °C durante 1 min
5- 72 °C durante 7 min
etapas 2 até 4: foram repetidas 30 vezes

3.2 Clonagem em vectores de expressão de mamífero

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit de purificação de PCR MinELute da Qiagen de acordo com instruções do fabricante.

O produto de PCR de V_H e vector de expressão de mamífero Rld hCylwt foram digeridos com *Hind* III-*Spe* I:

tampão 10x (NEBuffer 2)	5 µL
BSA 100x (NEB)	0,5 µL
ADN	5 µL
<i>Hind</i> III (Promega)	2 µL
<i>Spe</i> I (NEB)	2 µL
água	35,5 µL
vol. total	50 µL

ADN: produto de PCR de V_H purificado ou vector Rld hCylwt (a 0,25 mg/mL).

Incubado por 2 h a 37 °C.

O produto de PCR de V_L e vector de expressão de mamífero Rln hCk foram digeridos com *Hind* III-*Bsi*W I:

tampão 10x (NEBuffer 2)	5 µL
ADN	5 µL
<i>Hind</i> III (Promega)	2 µL
água	38 µL
vol. total	50 µL

ADN: produto de PCR de V_L purificado ou vector Rln hCk (a 0,25 mg/mL). Incubado durante 2 h a 37 °C. 2 µL de *Bsi*W I (NEB)

foram adicionados e incubados por 2h a 55 °C.

Os produtos de digestão por restrição foram aplicados em solução de aplicação em gel em um gel preparativo de agarose a 1% contendo 0,01% de brometo de etídeo e corrida em tampão TAE a 100 V durante 1 hora e o vector Rld e Rln assim como as bandas de fragmento de PCR de V_H e V_L foram excisadas. Um marcador de ADN de 100 pb também foi separado no gel para permitir a identificação das bandas de V_H e V_L e do vector. O ADN foi extraído e purificado do gel utilizando o kit de extração de gel QIAquick da Qiagen de acordo com instruções do fabricante.

O fragmento de PCR de V_H digerido com *Hind* III-*Spe* I foi ligado no vector Rld hCylwt digerido com *Hind* III-*Spe* I. O fragmento de PCR de V_L digerido com *Hind* III-*Bsi*W I foi ligado no vector Rln hCk digerido com *Hind* III-*Bsi*W I. A ligação foi efectuada utilizando o LigaFast Rapid ADN Ligation System da Promega de acordo com instruções do fabricante proporcionando:

V_H :vector: Rld hCylwt digerido com *Hind* III-*Spe* I

inserção fragmento de PCR de V_H digerido com *Hind* III-*Spe* I

V_L :vector: Rln hCk digerido com *Hind* III-*Bsi*W I

Inserção: fragmento de PCR de V_L digerido com *Hind* III-*Bsi*W I

Os produtos ligados foram transformados em células competentes de DH5 α . Frascos com 200 μ L de DH5 α foram arrefecidos em gelo. Foram preparadas alíquotas de 50 μ L em tubos de transformação. Foram adicionados 2 μ L de mistura de ligação e misturados gentilmente com uma ponteira de pipeta seguido por incubação por 30 min em gelo. A mistura foi incubada

por 45 s a 42 °C sem agitação. Esta foi então transferida para gelo durante 2 min. Foram adicionados 450 µL de meio SOC e os tubos incubados durante 1 h a 37 °C em incubador com agitação. Foram espalhados 100 µL de cultura em placas de L-agar suplementadas com 100 µg/mL de ampicilina e incubadas de um dia para o outro a 37 °C.

3.3 Sequenciação

Os clones de V_H e V_L foram cultivados de um dia para o outro a 37 °C em 5 mL de meio LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina. Plasmídeos Rld e Rln contendo domínios de V_H e V_L respectivamente, foram extraídos e purificados utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep da Qiagen de acordo com instruções do fabricante. A região V_H foi sequenciada utilizando iniciadores directos no vector Rld e sequência sinal e o iniciador reverso na região Cγ1 humana.

A região V_L foi sequenciada utilizando iniciadores diretos no vector Rln e sequência sinal e iniciador reverso na região Cκ humana. Os clones com sequências de V_H e V_L corretas foram identificados e os plasmídeos preparados para expressão em células CHO.

3.4 Expressão de anticorpo quimérico em células CHO

Os plasmídeos Rld e Rln contendo os domínios V_H e V_L de 6A1 respectivamente, foram transientemente co-transfectados em células CHO e expressos. O anticorpo quimérico produzido foi

purificado de sobrenadante da cultura de células por cromatografia de afinidade em Sepharose de Proteína A.

3.4.1 Purificação de plasmídeo

As células DH5 α contendo plasmídeos Rld-6A1V_L foram cultivadas em 5 mL de meio LB suplementado com 100 μ g/mL de ampicilina por 8 h, a 37 °C, num incubador com agitação. 200 mL de meios LB suplementado com 100 μ g/mL de ampicilina foram inoculados com 1 mL de cultura do dia e incubados de um dia para o outro, a 37 °C, num incubador com agitação. Os plasmídeos foram extraídos e purificados utilizando o kit QIAfilter Plasmid Maxi da Qiagen de acordo com instruções do fabricante. O sedimento de etanol foi ressuspenso em 200 μ L de tampão TE e a concentração do plasmídeo foi medida por absorbância a 260 nm após diluição de 100-vezes da solução de armazenamento.

3.4.2 Transfecção

As células CHO foram cultivadas até confluência em MEM de Dulbecco com meios Glutamax-1 (DMEM) suplementados com Soro Bovino Fetal Ultra Low e 1% de Penicilina-Estreptomicina em frascos de cultura Falcon BD de 4x175 cm² a 37 °C.

Para cada frasco, num tubo Falcon de 50 mL, foi adicionado e misturado o seguinte:

8 mL de Optimem 1 com Glutamax-1

20 μ g de plasmídeo purificado Rld-6A1V_H

20 μ g de plasmídeo purificado Rln-6A1V_L

240 mL de Reagente de Transfecção TransFast sob vórtex

A mistura foi incubada durante 10-15 min à t.a. O meio DMEM foi removido do frasco, e então a mistura foi submetida a vórtex e adicionada ao frasco. A mistura foi incubada a 37 °C durante 1 h. Foram adicionados 32 mL de Optimem ao frasco e incubados a 37 °C durante 48-72 h.

3.4.3 Purificação de Anticorpo quimérico

O meio de frascos de 175 cm² foi reservado e centrifugado a 1500 rpm durante 3 min num MSE Mistral 2000 e o sobrenadante passado através de um sistema de filtro de 500 mL de 0,22 µm CA. O anticorpo foi purificado de sobrenadante clarificado num Amersham Biosciences Akta Explorer utilizando software Uniorn. A coluna utilizada foi uma de 1 mL HiTrap rProtein A Sepharose FF. A taxa de fluxo foi de 1 mL/min.

A coluna foi equilibrada com 1 °CV de PBS de Dulbecco, foi depois carregada com sobrenadante clarificado através de bomba A. A coluna foi lavada com 2 °CV de PBS de Dulbecco, a bomba A foi lavada e um 1 °CV de PBS de Dulbecco adicional foi passado através da coluna para garantir completa depuração de sobrenadante.

O anticorpo foi eluído com 1 °CV de tampão de eluição de IgG ImmunoPure (Pierce) e colectado em fracções de 1 mL contendo 100 µL de tampão de neutralização Trisma-HCl 1M a pH 8,0. A coluna foi re-equilibrada com 5CV de PBS de Dulbecco.

O anticorpo em frações de eluato foi quantificado pela leitura da absorbância a 280 nM contra uma solução de branco contendo 10 volumes de tampão de eluição de IgG ImmunoPure + 1 volume de Trisma-HCl 1M pH 8,0 e as frações com quantidades suficientes de anticorpo puro foram juntas e armazenadas em alíquotas de 100 µL a -20 °C.

3.4.4 Análise de anticorpo quimérico

O sobrenadante e anticorpo quimérico 6A1 purificado (6A1c) foram analisados em ELISA de ligação a IL-13 de cinomólogo e humana.

O sobrenadante de células CHO transientemente transfectadas com anticorpo monoclonal 6A1 quimérico, ligadas tanto a IL-13 humana como de cinomólogo recombinante expressa em *E. coli* num ELISA em sanduíche. O anticorpo purificado também se ligou tanto a IL-13 humana como de cinomólogo recombinante expressa em *E. coli* no ELISA em sanduíche (dados não mostrados). Ver a Figura 8.

A sequência de aminoácidos e uma sequência de ADNc para IL-13 de cinomólogo (incluindo sequência sinal) é mostrada como SEQ ID N°: 90 e 91, respectivamente.

Esses resultados confirmam que as regiões variáveis de 6A1 correctas foram clonadas satisfatoriamente para produzir um anticorpo quimérico de ligação a antigénio capaz de liga-ser tanto a IL-13 humana como de cinomólogo.

4. HUMANIZAÇÃO DE CLONE 6A1

4.1 Estratégia de humanização

4.1.1 Busca do banco de dados de murganho

12 sequências de murganho com a maior homologia para a sequência de aminoácidos de V_H 6A1 e 11 sequências de murganho com a maior homologia para a sequência de aminoácidos de V_L foram identificadas por busca num banco de dados de péptidos (Genbank).

A sequência de aminoácidos de V_H 6A1 foi comparada a todas as 12 sequências de murganho da busca em banco de dados e os seguintes resíduos estruturais foram identificados como significativos:

Posição	6A1 VH	murganho	Ocorrência
19	R	K	12/12
38	I	K	12/12
81	R	Q	12/12

A posição está de acordo com o sistema de numeração de Kabat *et al.*

A sequência de aminoácidos de V_L 6A1 foi comparada a 11 sequências de murganho da busca em banco de dados, nenhum resíduo estrutural foi identificado como significativo.

4.1.2 Pesquisa do banco de dados humano

As sequências estruturais humanas com a maior homologia com estruturas de V_H e V_L 6A1 foram identificadas utilizando o EasyBlast num banco de dados peptídico.

Um grupo de sequências humanas foi identificado para V_H 6A1 das quais a seguinte estrutura foi selecionada para humanização:

SEQ ID N°: 92

Os seguintes resíduos estruturais foram identificados como potencialmente importantes na recuperação de afinidade e podem precisar de ser retromutados:

Posição (Kabat#)	V_H humana	V_H 6A1
19	K	R
38	R	I
73	E	T
81	E	R

Foram concebidas 4 construções de V_H humanizadas com diferentes retromutações, uma como um enxerto linear de acordo com as definições de CDR dadas acima (A1), as outras com várias retromutações (A2, A3, A4).

Portanto,

A2 é A1 mais R38I

A3 é A2 mais E73T

A4 é A3 mais K19R mais E81R

Foi identificado um grupo de sequências humanas para V_L 6A1 das quais a seguinte estrutura foi selecionada para humanização:

SEQ ID N°: 93

Os seguintes resíduos estruturais foram identificados como potencialmente importantes na recuperação de afinidade e podem precisar ser retromutados:

Posição (Kabat#)	V _L de 6A1 murganho	V _L humana
85	V	I

Foram concebidas duas construções, uma como um enxerto linear (L1), a outra com a retromutação (L2) (*i. e.*, L1 com I85V).

Construção de V_H humanizada A1:

SEQ ID N°: 11

Construção de V_H humanizada A2:

SEQ ID N°: 12

Construção de V_H humanizada A3:

SEQ ID N°: 13

Construção de V_H humanizada A4:

SEQ ID N°: 14

Construção de V_L humanizada L1:

SEQ ID N°: 15

Construção de V_L humanizada L2:

SEQ ID N°: 16

4.2 Humanização de 6A1

As construções de V_H e V_L humanizadas foram preparadas de novo pela construção de oligonucleótidos que se sobrepõem incluindo sítios de restrição para clonagem em vectores de expressão em mamífero Rld e Rln assim como sequência sinal humana. Os sítios de restrição *Hind* III e *Spe* I foram introduzidos em fase no domínio de V_H contendo a sequência sinal humana para clonagem em Rld contendo a região constante selvagem $\gamma 1$ humana. Os sítios de restrição de *Hind* III e *BsiW* I foram introduzidos em fase ao domínio V_L contendo a sequência sinal humana para clonagem em Rln contendo a região constante kappa humana.

Sequência sinal humana: SEQ ID N°: 17

Foram concebidas 4 construções de V_H humanizadas e duas construções de V_L humanizadas. Isto resultaria em 8 combinações de cadeia leve-cadeia pesada diferentes. Aproximadamente 10 oligonucleótidos de aproximadamente 60 bases de comprimento com aproximadamente 18 bases sobrepostas foram concebidas para construção.

4.2.1 Construção de Oligonucleótido

As soluções de misturas de oligonucleótido foram preparadas a partir de 5 μ L de cada solução de armazenamento de oligo a 100 μ M. A síntese dos genes de V_H e V_L humanizados pela construção de oligonucleótidos que se sobrepõe foi efectuada geralmente de acordo com Stemmer WP *et al.*, (1995) *Gene* 164(1): 49-53 utilizando o software descrito em Ertl PF *et al.*, (2003)

Methods 31: 199-206.

4.2.1.1 Reação de PCR de montagem representativa

água	41,5 µL
tampão de PCR ProofStart 10x	5 µL
dNTP (10 mM)	1,5 µL
Agrupamento de oligo	1 µL
ProofStart ADN Polimerase	1 µL
vol. total	50 µL

Ciclo de montagem por PCR:

- 1- 94 °C durante 2 min
- 2- 94 °C durante 30 s
- 3- 40 °C durante 2 min
- 4- 72 °C durante 10 s
- 5- 94 °C durante 15 s
- 6- 40 °C durante 30 s
- 7- 72 °C durante 20 s +
3 s/ciclo

Etapas 4 a 7 foram repetidas 25 vezes.

4.2.1.2 PCR de Recuperação Representativo

Os iniciadores 1 e 2 foram os primeiros oligonucleótidos superiores e inferiores utilizados no PCR de montagem. A PCR de recuperação permite a amplificação do gene V completo

Reação de PCR de recuperação:

água	42 µL
tampão de PCR ProofStart 10x	4 µL
dNTP (10 mM)	1,5 µL
Iniciador 1 (100 µM)	0,5 µL
Iniciador 2 (100 µM)	0,5 µL
Reação de PCR de montagem	1 µL
ProofStart ADN polimerase	0,5 µL
vol. total	50 µL

Ciclo de PCR de recuperação: 1- 94 °C durante 2 min

2- 94 °C durante 45 s

3- 60 °C durante 30 s

4- 72 °C durante 2 min

5- 72 °C durante 4 min

Etapas 2 até 4 foram
repetidas 25 vezes

Os produtos de PCR de recuperação foram purificados utilizando o kit de purificação de PCR MinElute da Qiagen de acordo com instruções do fabricante.

4.2.2 Digestões de restrição

As construções de V_H 6A1 humanizadas A1, A2, A3, A4 foram digeridas com *Hind* III-*Spe* I, as construções de V_L 6A1 humanizadas L1, L2 foram digeridas com *Hind* III-*Bsi*W I como descrito de modo semelhante na seção 3.

4.2.3 Purificação de gel

Os produtos de digestão de restrição foram purificados de modo semelhante à secção 3.

4.2.4 Ligação

Os fragmentos de V_H de 6A1 humanizados digeridos com *Hind* III-*Spe* I foram ligados no vector Rld hCylwt digerido com *Hind* III-*Spe* I.

Os fragmentos de V_L de 6A1 humanizados digeridos com *Hind* III-*Bsi*W I foram ligados no vector Rln hCk digerido com *Hind* III-*Bsi*W I.

A ligação foi efectuada utilizando o Sistema de Ligação de ADN rápida LigaFast da Promega de acordo com instruções do fabricante.

4.2.5 Transformação

De modo semelhante como descrito previamente na secção 3.

4.2.6 Método de sequenciação representativo

As colónias de cada placa de reacção foram cultivadas de um dia para o outro, a 37 °C, em 5 mL de meio LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina. Os plasmídeos foram extraídos e purificados utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep da Qiagen de

acordo com instruções do fabricante e sequenciados utilizando iniciadores descritos previamente na seção 3. Os clones com as sequências de V_H e V_L humanizadas correctas foram identificados e plasmídeos preparados para expressão em células CHO.

5. EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS HUMANIZADOS

Foram preparadas quatro construções de V_H humanizadas (A1, A2, A3, A4) e duas construções de V_L humanizadas (L1 e L2) em vectores de expressão em mamífero Rld hCylwt e Rln hCk. Oito combinações de cadeia leve-cadeia pesada de plasmídeos (A1L1, A1L2, A2L1, A2L2, A3L1, A3L2, A4L1, A4L2) foram co-transfectadas transientemente em células CHO e exprestas em pequena escala para dar 8 anticorpos humanizados diferentes. Os anticorpos produzidos no sobrenadante de célula CHO foram analisados no ELISA de ligação a IL-13 humana.

5.1 Método de purificação de plasmídeo representativo

As células DH5 α contendo um dos plasmídeos descritos acima foram cultivadas em 5 mL de meio LB suplementado com 100 μ g/mL de ampicilina por 8 h, a 37 °C, num incubador com agitação. Foram inoculados 200 mL de meio LB suplementado com 100 μ g/mL de ampicilina com 1 mL de cultura do dia e incubados de um dia para o outro a 37 °C num incubador com agitação. Os plasmídeos foram extraídos e purificados utilizando o kit QIAfilter Plasmid Maxi da Qiagen de acordo com instruções do fabricante. O sedimento de etanol foi ressuspenso em 200 μ L de tampão TE e a concentração de plasmídeo foi medida por absorbância a 260 nm após 100 vezes de diluição de solução stock.

5.2 Método de transfecção representativo

9 poços de placas de 6-poços 3506 Corning Costar foram semeados com 10^6 células CHO e cultivadas de um dia para o outro em meio MEM de Dulbecco com Glutamax-1 (DMEM) suplementado com Soro Bovino Fetal Ultra Low e 1% de Penicilina-Estreptomicina a 37 °C.

Para cada poço, foi adicionado o seguinte num Bijou de 5 mL para que cada transfecção contivesse uma combinação diferente de cadeias leves e pesadas.

1 mL de Optimem 1 com Glutamax-1
5 µg de plasmídeo contendo V_H humanizada
5 µg de plasmídeo contendo V_L humanizada
30 µg de Reagente de Transfecção TransFast sob vórtex

A incubação ocorreu por 10-15 min à temperatura ambiente. O meio DMEM foi removido dos poços, depois a mistura foi submetida vórtex e adicionada ao poço apropriado. A incubação ocorreu a 37 °C durante 1 h. Foram adicionados 2 mL de Optimem por poço e incubados a 37 °C durante 48-72h.

5.3 Análise de anticorpos humanizados

O meio de cada poço foi recuperado e centrifugado a 1300 rpm durante 1 min numa centrífuga de mesa 5415R Eppendorf e o sobrenadante passado através de um filtro de seringa de 25 mm Pall Acrodisc de 0,2 µm. O sobrenadante de células foi avaliado por ligação a IL-13 humana numa ELISA. Todos os 8 anticorpos humanizados ligaram-se à IL-13 humana com um perfil semelhante

ao do anticorpo quimérico 6A1 numa ELISA de ligação a IL-13 humana. Ver a Figura 9.

Os anticorpos humanizados L1+A1 e L2+A1 foram seleccionados para expressão em escala, purificação e futura análise.

6. AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS DE ANTI-IL-13 HUMANA HUMANIZADOS L1+A1 E L2+A1

6.1 Actividade em ELISA da ligação a IL-13 humana e de cinomólogo

L1+A1 e L2+A1 foram produzidos satisfatoriamente em larga escala e avaliados por ligação a IL-13 humana e de cinomólogo expressa em *E. coli* por ELISA. Ver as Figuras 10a e 10b e a Tabela B.

Tabela B

ELISA	mAb	EC₅₀ (µg/mL)
Ligação a IL-13 humana	mAb parental de 6A1	0,049
	6A1 quimérico	0,015
	L1+A1	0,018
	L2+A1	0,024
Ligação a IL-13 de cinomólogo	mAb parental de 6A1	0,039
	6A1 quimérico	0,018
	L1+A1	0,021
	L2+A1	0,028

Tanto L1+A1 como L2+A1 ligaram-se a IL-13 de cinomólogo e humana expressa em *E. coli* com um perfil semelhante. Os valores

de EC₅₀ (produzidos utilizando uma função de ajuste à curva “Robosage” de Excel) indicaram que a actividade de ligação é muito semelhante ao mAb 6A1 quimérico padrão.

6.2 Avaliação de L1+A1 E L2+A1 por ligação a IL-13 humana nativa (derivada de PBMC)

O sobrenadante de células CD4⁺ Th2 (produzidos em culturas de PBMC) estimuladas com anti-CD3 e anti-CD28 foi utilizado para avaliar a ligação de mAb de 6A1 quimérico, L1+A1 e L2+A1 a IL-13 humana nativa (derivada de PBMC). Numa ELISA, todos os 3 anticorpos ligaram-se a IL-13 humana nativa no sobrenadante de célula Th2 com desempenho muito semelhante ao do mAb 6A1 parental. Ver a Figura 11.

Além disso, uma curva padrão foi produzida utilizando reagentes disponíveis comercialmente, para determinar o nível de IL-13 humana nativa presente no sobrenadante de célula Th2, Todos os 3 anticorpos e um mAb de IL-13 anti-humano disponível comercialmente detectaram quantidades equivalentes de IL-13 na amostra de sobrenadante Th2. Ver a Tabela 2 abaixo.

Tabela 2

mAb	IL-13 nativa (ng/mL)
mAb parental de 6A1	22,5
6A1 quimérico	19,6
L1+A1	25,1
L2+A1	22,7
+ mAb controlo	28,0

6.3 Actividade inibitória de L1+A1 E L2+A1 para IL-13 humana em ELISA de ligação ao receptor de IL-13

O mAb de murganho parental 6A1, 6A1 quimérico, L1+A1 e L2+A1, foram avaliados por capacidade para inibir a ligação de IL-13 humana a cadeias de IL-13R α 1 e IL-13R α 2 num ELISA de competição. Ver as Figuras 12a e 12b e a Tabela 3 abaixo.

Tabela 3

ELISA	mAb	IC₅₀ (µg/mL)
Competição para IL-13Rα1 humana	mAb parental de 6A1	0,039
	6A1 quimérico	0,034
	L1+A1	0,044
	L2+A1	0,056
Competição para IL-13Rα2 humana	mAb parental de 6A1	0,020
	6A1 quimérico	0,040
	L1+A1	0,113
	L2+A1	0,1147

Todos os anticorpos inibiram a ligação de IL-13 humana marcada com det-1 recombinante expressa em *E. coli* a IL-13R α 1 com um perfil semelhante. De modo semelhante, todos os anticorpos inibiram a ligação de IL-13 humana marcada com det-1 recombinante expressa em *E. coli* a IL-13R α 2, embora com alguma redução em potência para L1+A1 e L2+A1 neste ensaio (valores de IC₅₀ foram produzidos utilizando a função que preenche a curva "Robosage" de Excel).

6.4 Avaliação de afinidade de L1+A1 E L2+A1 para ligação a IL-13 humana

As cinéticas de ligação de L1+A1 e L2+A1 para IL-13 humana foram avaliadas utilizando o sistema de BIAcore™. Ver a Secção 7 a seguir para os métodos utilizados.

Análise 1:

Completa tanto para IL-13 humana como para a de cinomólogo (proteína expressa por *E. coli*). Os valores apresentados são a média de 5 curvas de concentração de IL-13 diferentes (feitas em triplicado). Note que as questões de transferência de massa foram evidentes nesta análise e que um protocolo experimental modificado (para corrigir esta questão) foi efectuado na análise 4 (em que nenhuma questão de transferência de massa esteve presente). Ver a Tabela 4.

Tabela 4

Amostra de IL-13	mAb	Taxa de associação k_a ($M s^{-1}$)	Taxa de dissociação k_d (s^{-1})	Constante de afinidade KD (pM)
IL-13 humana	mAb parental de 6A1	$1,96 \times 10^6$	$6,78 \times 10^{-5}$	35
	6A1 quimérico	$4,64 \times 10^5$	2×10^{-5}	43
	L1+A1	$5,07 \times 10^5$	$1,55 \times 10^{-4}$	300
	L2+A1	$5,07 \times 10^5$	$1,56 \times 10^{-4}$	310
IL-13 de cinomólogo	mAb parental de 6A1	$9,14 \times 10^5$	$5,6 \times 10^{-5}$	61
	6A1 quimérico	$5,92 \times 10^5$	$3,27 \times 10^{-5}$	55
	L1+A1	$4,46 \times 10^5$	$1,55 \times 10^{-5}$	35
	L2+A1	$5,77 \times 10^5$	$5,58 \times 10^{-5}$	97

Análise 2:

Completa para IL-13 humana (proteína expressa por *E. coli*) de ligação a L1+A1. Ver a Tabela 5.

Tabela 5

Amostra de IL-13	mAb	Taxa de associação k_a ($M s^{-1}$)	Taxa de dissociação k_d (s^{-1})	Constante de Afinidade KD (pM)
IL-13 humana	L1+A1	$4,66 \times 10^5$	$6,95 \times 10^{-5}$	149

Análise 3:

Completa para o péptido de IL-13 humana biotinilado de 16mero de número 24 (identificado como o epítipo de ligação linear para mAb parental, ver a seção 6.7). Note-se que os valores de KD absolutos obtidos para ligação aos ligantes peptídicos são frequentemente bastante diferentes dos observados para a ligação de alvos protéicos inteiros. No entanto, crê-se que esses dados estejam consistentes com os dados de proteína inteira e os dados de neutralização de IL-13 (no bioensaio de TF-1) em que estes indicam a redução em afinidade de cerca de 3 vezes entre o 6A1 quimérico e L1+A1. Ver a Tabela 6.

Tabela 6

Amostra de IL-13	mAb	Taxa de associação k_a ($M s^{-1}$)	Taxa de dissociação k_d (s^{-1})	Constante de Afinidade KD (nM)
Péptido 24	mAb parental de 6A1	$2,95 \times 10^5$	$9,15 \times 10^{-4}$	3,11
	6A1 quimérico	$2,57 \times 10^5$	$9,19 \times 10^{-4}$	3,58
	L1+A1	$1,95 \times 10^5$	$1,7 \times 10^{-3}$	9,03
	L2+A1	$1,79 \times 10^5$	$1,67 \times 10^{-3}$	9,35

Análise 4:

Completa tanto para IL-13 humana como para de cinomólogo (proteína expressa por *E. coli*). Os valores de KD apresentados são a média de 5 curvas de concentração de IL-13 diferentes (feitas em triplicado). Note que nenhuma questão de transferência de massa foi evidente para este grupo de dados. Ver a Tabela 7.

Tabela 7

Amostra de IL-13	mAb	Taxa de associação k_a ($M s^{-1}$)	Taxa de dissociação k_d (s^{-1})	Constante de afinidade KD (pM)
IL-13 humana	6A1 quimérico	$1,05 \times 10^6$	4×10^{-5}	38
	L1+A1	$8,24 \times 10^5$	$1,4 \times 10^{-4}$	170
	L2+A1	$9,07 \times 10^5$	$1,39 \times 10^{-4}$	153
IL-13 de cinomólogo	6A1 quimérico	$8,85 \times 10^5$	$2,65 \times 10^{-5}$	30
	L1+A1	$7,3 \times 10^5$	$5,86 \times 10^{-5}$	80
	L2+A1	$7,72 \times 10^5$	$4,25 \times 10^{-5}$	55

Os resultados não indicam nenhuma diferença significativa entre as construções de L1+A1 e L2+A1.

L1+A1 mostra uma afinidade para IL-13 humana de aproximadamente 168 pM. As cinéticas são dominadas por uma taxa de dissociação excepcionalmente lenta, como seria previsto a partir da actividade de neutralização significativa do anticorpo. Os dados para a constante de associação k_{on} são consistentemente em torno de $6 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$. As estimativas da constante de dissociação k_{off} são mais variáveis, cobrindo a faixa de $1,4 \times 10^{-4}$ até $8,22 \times 10^{-5} s^{-1}$, refletindo o desafio técnico para obter a quantificação precisa para taxas de dissociação lentas.

6.5 Actividade de L1+A1 E L2+A1 em bioensaios de neutralização de IL-13

O mAb de murganho, 6A1 quimérico, L1+A1 e L2+A1, foram avaliados por actividade de neutralização de IL-13 num bioensaio celular de TF-1 *in vitro* (este bioensaio é o padrão industrial

para avaliação de bioactividade de IL-13 e para a avaliação da capacidade de neutralização de anticorpos de anti-IL-13 fornecidos comercialmente). Várias variantes de IL-13 foram avaliadas neste ensaio, incluindo IL-13 humana expressa por *E. coli*, IL-13 de cinomólogo expressa por *E. coli*, IL-13 humana Q130 expressa por *E. coli* (a variedade associada a asma) e IL-13 humana expressa por célula CHO mamífera (nota: a IL-13 humana nativa na amostra de sobrenadante de células Th2 não poderia ser utilizada neste bioensaio, já que esse sobrenadante também contém outras citocinas que são capazes de fazer as células TF-1 proliferarem). Ver as Figuras 13a, 13b, 13 c e 13d.

Todos os anticorpos testados neutralizaram a bioactividade de todas as variantes de IL-13 neste sistema de bioensaio; a capacidade de neutralização de cada anticorpo para cada variante de IL-13 foi determinada e expressa como um valor de ND₅₀. Ver a Tabela 8.

Tabela 8

Variante de IL-13	mAb	ND₅₀ médio para 2 ensaios (µg/mL)
IL-13 humana expressa por <i>E. coli</i>	6A1 quimérico	0,119
	L1+A1	0,428
	L2+A1	0,608
	mAb parental de 6A1	0,193
IL-13 de cinomólogo expressa por <i>E. coli</i>	6A1 quimérico	0,059
	L1+A1	0,078
	L2+A1	0,120
	mAb parental de 6A1	0,078
IL-13 humana Q130	6A1 quimérico	0,128

(continuação)

Variante de IL-13	mAb	ND₅₀ médio para 2 ensaios (µg/mL)
expressa por <i>E. coli</i>	L1+A1	0,438
	L2+A1	0,705
	mAb parental de 6A1	0,213
IL-13 humana expressa por CHO	6A1 quimérico	0,285
	L1+A1	0,975
	L2+A1	1,200
	mAb parental de 6A1	0,440

Nota: Como diferentes quantidades de cada variante de IL-13 são necessárias para fazer proliferar células TF-1 na mesma extensão neste bioensaio, pode não ser desejável comparar valores de ND₅₀ produzidos por um anticorpo particular por cada variante de IL-13 utilizada. No entanto, é apropriado comparar os valores de ND₅₀ produzidos por cada anticorpo para uma única variante de IL-13.

Em geral, o nível de neutralização atingido pelo mAb 6A1 parental e 6A1 quimérico foi semelhante, não indicando nenhuma perda detectável de potência entre o mAb parental e a quimera. No entanto, as potências de L1+A1 e L2+A1 foram mensuravelmente reduzidas em comparação tanto com mAb 6A1 parental como com 6A1 quimérico por uma média de aproximadamente 3 até 4 vezes para cada variante de IL-13 individual testada. Esses dados estão em íntima concordância com aqueles obtidos da avaliação por BIAcore™.

6.6 Especificidade de L1+A1 e L2+A1 para ligação a IL-13 humana

As especificidades de L1+A1 e L2+A1 para IL-13 humana foram avaliadas por análise da reactividade cruzada potencial contra IL-4 humana e GM-CSF humano em ELISAs de ligação. Ver as Figuras 14a e 14b.

Verificou-se que esses mAb são específicos para a ligação a IL-13, sem reactividade cruzada para IL-4 humana ou GM-CSF humano em concentrações de mAb até 30 µg/mL. Além disso, estes mAb não neutralizaram de forma cruzada a bioactividade de IL-5 humana num bioensaio de IL-5. Ver a Figura 14c.

6.7 Mapeamento de epitopo de 6A1 utilizando péptidos biotinilados

As proteínas de IL-13 humana e IL-13 de cinomólogo foram corridas num gel de SDS-PAGE desnaturante. O Western blotting com mAb 6A1 de murganho detectou bandas do tamanho esperado tanto para proteínas de IL-13 humanas (expressas por *E. coli*, "aqui produzidas") como de cinomólogo (expressas por *E. coli*, "aqui produzidas"). O 6A1 não detectou hIL-13 (expressa por *E. coli*, Cambridge Bioscience), devido a uma provável falha técnica. Esta análise sugere que o mAb 6A1 reconheceu um epitopo peptídico linear nas sequências de IL-13 humana e de cinomólogo (dados não mostrados).

Os péptidos biotinilados de 16 mero separados por 4 foram sintetizados para mapear a localização do epitopo de célula B reconhecido por mAb 6A1 tanto em IL-13 humana como de

cinomólogo. Um método de ELISA foi utilizado para detectar a ligação de péptido biotinilado imobilizado ao mAb 6A1 parental.

Os detalhes de péptidos desenhados de modo personalizado de 16 mero: 88 x 16 mero, deslocado por 4 (fornecido por Mimotopes, Austrália).

Formato:

Péptidos 25 & 44 = Biotina-SGSG-PÉPTIDO-ácido

Péptidos 2-24 & 27-43 = Biotina-SGSG-PÉPTIDO-amida

Nº	Hidro	Peso mol.	N-term.	sequência C-term
2	0,42	2 311,66	Biotina-	SEQ ID N°:38-NH2
3	0,27	2 453,82	Biotina-	SEQ ID N°:39-NH2
4	0,38	2 326,70	Biotina-	SEQ ID N°:40-NH2
5	0,31	2 231,58	Biotina-	SEQ ID N°:41-NH2
6	0,43	2 289,66	Biotina-	SEQ ID N°:42-NH2
7	0,59	2,190,57	Biotina-	SEQ ID N°:43-NH2
8	0,57	2 260,64	Biotina-	SEQ ID N°:44-NH2
9	0,62*	2 255,64	Biotina-	SEQ ID N°:45-NH2
10	0,51	2 197,56	Biotina-	SEQ ID N°:46-NH2
11	0,56	2 144,52	Biotina-	SEQ ID N°:47-NH2
12	0,46	2 090,38	Biotina-	SEQ ID N°:48-NH2
13	0,29	2 219,54	Biotina-	SEQ ID N°:49-NH2
14	0,29	2,180,53	Biotina-	SEQ ID N°:50-NH2
15	0,36	2 318,70	Biotina-	SEQ ID N°:51-NH2
16	0,32	2 303,73	Biotina-	SEQ ID N°:52-NH2
17	0,47	2 209,57	Biotina-	SEQ ID N°:53-NH2
18	0,48	2 257,60	Biotina-	SEQ.l.D.N°:54-NH2
19	0,17	2 273,57	Biotina-	SEQ ID N°:55-NH2
20	0,27	2 300,60	Biotina-	SEQ ID N°:56-NH2
21	0,29	2 383,77	Biotina-	SEQ ID N°:57-NH2
22	0,35	2 401,83	Biotina-	SEQ ID N°:58-NH2

23	0,45	2 407,92	Biotina-	SEQ ID N°:59-NH2
24	0,42	2 541,08	Biotina-	SEQ ID N°:60-NH2
25	0,33	2 513,97	Biotina-	SEQ ID N°:61-OH
27	0,42	2 283,64	Biotina-	SEQ ID N°:62-NH2
28	0,27	2 425,81	Biotina-	SEQ ID N°:63-NH2
29	0,57	2 22857	Biotina-	SEQ ID N°:64-NH2
30	0,62*	2 223,57	Biotina-	SEQ ID N°:65-NH2
31	0,51	2 165,49	Biotina-	SEQ ID N°:66-NH2
32	0,56	2,112,45	Biotina-	SEQ ID N°:67-NH2
33	0,27	2,207,56	Biotina-	SEQ ID N°:68-NH2
34	0,33	2 345,73	Biotina-	SEQ ID N°:69-NH2
35	0,29	2 330,76	Biotina-	SEQ.I.D.NO.70-NH2
36	0,45	2 236,60	Biotina-	SEQ ID N°:71-NH2
37	0,43	2 276,64	Biotina-	SEQ ID N°:72-NH2
38	0,12	2,292,62	Biotina-	SEQ ID N°:73-NH2
39	0,22	2,319,64	Biotina-	SEQ.I.D.NO.74-NH2
40	0,24	2,402,82	Biotina-	SEQ ID N°:75-NH2
41	0,33	2,387,80	Biotina-	SEQ.I.D.NO.76-NH2
42	0,43	2 393,90	Biotina-	SEQ ID N°:77-NH2
43	0,39	2 527,05	Biotina-	SEQ.I.D.NO.78-NH2
44	0,35	2 471,88	Biotina-	SEQ ID N°:79-OH

(*indica um valor elevado de hidrofobicidade)

Exemplo: Uma placa de 96 poços típica preparada para esse ensaio.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
B	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
C	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
D	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
E	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
F	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
G	39	39	40	40	41	41	42	42	43	43	44	44
H	+VE (4)	+VE (16)	+VE (32)	+VE (4)	+VE (16)	+VE (32)	-VE (4)	-VE (16)	-VE (32)	-VE (4)	-VE (16)	-VE (32)

NB: Números indicam o péptido em cada poço.

Números em parênteses indicam o fator de diluição do anticorpo de controlo.

Absorbâncias a 490nm dos 96-poços

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,057	0,067	0,079	0,063	0,072	0,061	0,084	0,061	0,075	0,064	0,075	0,066
B	0,068	0,070	0,105	0,065	0,075	0,072	0,071	0,070	0,064	0,061	0,062	0,063
C	0,119	0,081	0,099	0,064	0,073	0,077	0,060	0,061	0,090	0,144	2,109	2,200
D	0,115	0,129	0,141	0,060	0,090	0,063	0,104	0,078	0,076	0,135	2,148	2,210
E	0,060	0,074	0,098	0,062	0,064	0,071	0,088	0,082	0,089	0,073	0,068	0,067
F	0,082	0,078	0,071	0,062	0,056	0,057	0,084	0,067	0,090	0,074	0,063	0,056
G	0,057	0,055	0,060	0,060	0,058	0,058	0,104	0,108	2,236	2,237	2,229	2,229
H	1,499	1,197	0,739	1,548	1,209	0,976	0,077	0,080	0,072	0,072	0,082	0,103

Este resultado (um de várias tentativas) correlaciona-se com um resultado positivo para péptidos 24, 25, 43 e 44 como mostrado abaixo (assim como os péptidos de controlo positivo). Ver a Figura 15. Todas as tentativas demonstraram que os péptidos 24, 25, 43 e 44 foram positivos.

Péptido 24:	QFVKDLLLHLKKLFRE	<u>(SEQ ID N°: 80)</u>
Péptido 25:	DLLLHLKKLFREGRFN	<u>(SEQ ID N°: 81)</u>
Péptido 43:	QFVKDLLVHLKKLFRE	<u>(SEQ ID N°: 82)</u>
Péptido 44:	DLLVHLKKLFREGQFN	<u>(SEQ ID N°: 83)</u>

Os péptidos 24 e 25 são derivados de hIL-13. Os péptido 43 e 44 são derivados de cinoIL-13.

Além disso, mAb de 6A1 quimérico, L1+A1 e L2+A1, todos ligaram o mesmo epitopo linear na região C-terminal tanto na IL-13 humana como de cinomólogo (dados para mAb de 6A1 quimérico, L1+A1 e L2+A1 não são mostrados).

Em resumo, os resultados de ELISA indicaram que mAb 6A1 de murganho parental, mAb de 6A1 quimérico, L1+A1 e L2+A1 todos, ligaram a seguinte sequência da proteína IL-13 humana:

DLLLHLKKLFRE (SEQ ID N°:84)

E dentro da seguinte sequência da proteína IL-13 de cinomólogo:

DLLVHLKKLFRE (SEQ ID N°:85)

NB: NEGRITO indica diferenças de resíduo entre IL-13 humana e o ortólogo de IL-13 de cinomólogo.

Consequentemente, foi determinado que mAb 6A1 de murganho parental, mAb de 6A1 quimérico, L1+A1 e L2+A1 ligaram-se imuno especificamente a IL-13 humana entre os resíduos 97 a 108 de SEQ ID N°: 9.

6.8 Mapeamento fino de epitopo de 6A1 utilizando péptidos biotinilados

Um epitopo de ligação para mAb 6A1 foi determinado utilizando um grupo de péptidos baseados em torno de KDLLLHLKKLFREG para ligação a IL-13 humana e KDLLVHLKKLFREG para ligação a IL-13 de cinomólogo. Os péptidos foram encomendados com 1 aminoácido removido sequencialmente do N- ou do C-término destas sequências peptídicas parentais (*i. e.*, KDLLLHLKKLFREG ou KDLLVHLKKLFREG), a fim de definir o epitopo de ligação linear preciso para mAb 6A1.

Um método de ELISA foi utilizado para detectar a ligação de péptido biotinilado imobilizado ao mAb 6A1 parental.

O número de identificação de péptido (413 a 447) e as sequências correspondentes são mostrados a seguir.

Sequências peptídicas:

<u>Péptido N°</u>	<u>N-term.</u>	<u>Sequência</u>	<u>C-term.</u>
413	Biotina-	SEQ ID N°: 94	-NH ₂
414	Biotina-	SEQ ID N°: 95	-NH ₂
415	Biotina-	SEQ ID N°: 96	-NH ₂
416	Biotina-	SEQ ID N°: 97	-NH ₂
417	Biotina-	SEQ ID N°: 98	-NH ₂
418	Biotina-	SEQ ID N°: 99	-NH ₂
419	Biotina-	SEQ ID N°: 100	-NH ₂
420	Biotina-	SEQ ID N°: 101	-NH ₂
421	Biotina-	SEQ ID N°: 102	-NH ₂

(continuação)

<u>Péptido N°</u>	<u>N-term.</u>	<u>Sequência</u>	<u>C-term.</u>
422	Biotina-	SEQ ID N°: 103	-NH ₂
423	Biotina-	SEQ ID N°: 104	-NH ₂
424	Biotina-	SEQ ID N°: 105	-NH ₂
425	Biotina-	SEQ ID N°: 106	-NH ₂
426	Biotina-	SEQ ID N°: 107	-NH ₂
427	Biotina-	SEQ ID N°: 108	-NH ₂
428	Biotina-	SEQ ID N°: 109	-NH ₂
429	Biotina-	SEQ ID N°: 110	-NH ₂
430	Biotina-	SEQ ID N°: 111	-NH ₂
431	Biotina-	SEQ ID N°: 112	-NH ₂
432	Biotina-	SEQ ID N°: 113	-NH ₂
433	Biotina-	SEQ ID N°: 114	-NH ₂
434	Biotina-	SEQ ID N°: 115	-NH ₂
435	Biotina-	SEQ ID N°: 116	-NH ₂
436	Biotina-	SEQ ID N°: 117	-NH ₂
437	Biotina-	SEQ ID N°: 118	-NH ₂
438	Biotina-	SEQ ID N°: 119	-NH ₂
439	Biotina-	SEQ ID N°: 120	-NH ₂
440	Biotina-	SEQ ID N°: 121	-NH ₂
441	Biotina-	SEQ ID N°: 122	-NH ₂
442	Biotina-	SEQ ID N°: 123	-NH ₂
443	Biotina-	SEQ ID N°: 124	-NH ₂
444	Biotina-	SEQ ID N°: 125	-NH ₂
445	Biotina-	SEQ ID N°: 126	-NH ₂
446	Biotina-	SEQ ID N°: 127	-NH ₂
447	Biotina-	SEQ ID N°: 128	-NH ₂
44 (Controlo)	Biotina-	SEQ ID N°: 79	-OH

Exemplo: Uma placa de 96 poços preparada para esse ensaio.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424
B	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424
C	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436
D	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436
E	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	444
F	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	444
G	BRANCO	BRANCO	BRANCO	BRANCO	BRANCO	BRANCO	BRANCO	BRANCO	BRANCO	BRANCO	BRANCO	BRANCO
H	BRANCO	BRANCO	BRANCO	BRANCO	BRANCO	BRANCO	BRANCO	BRANCO	BRANCO	BRANCO	BRANCO	BRANCO

NB: Números indicam o péptido em cada poço.

Absorvências a 490 nm dos 96-poços

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,456	2,501	2,434	2,419	2,476	2,661	2,224	2,407	0,059	0,052	0,052	2,527
B	2,480	2,452	2,444	2,624	2,639	3,106	2,188	2,473	0,059	0,055	0,052	2,568
C	2,472	0,099	0,065	0,059	0,070	0,058	0,053	0,054	0,162	2,479	2,389	2,883
D	2,399	0,100	0,067	0,053	0,049	0,051	0,052	0,047	0,485	2,838	2,783	2,640
E	2,582	2,359	2,585	2,512	0,096	0,052	0,054	0,048	0,049	0,183	0,051	2,424
F	2,431	2,872	2,522	2,243	0,097	0,059	0,052	0,049	0,057	0,047	0,050	2,342
G	0,056	0,051	0,058	0,065	0,056	0,067	0,049	0,047	0,053	0,057	0,052	0,056
H	0,047	0,052	0,050	0,070	0,054	0,047	0,056	0,053	0,049	0,050	0,052	0,049

Ver as Figuras 16a e 16b. Os resultados indicam que mAb 6A1 parental liga-se ao epítipo de aminoácido linear KKLFR na região C-terminal tanto de IL-13 humana como de ortólogo de IL-13 de cinomólogo.

Além disso, os mAb de 6A1 quimérico, L1+A1 e L2+A1 todos, ligaram o mesmo epítipo linear (isto é, KKLFR) na região C-terminal em IL-13 humana (os dados para mAb de 6A1 quimérico, L1+A1 e L2+A1 não são mostrados). Subsequentemente foi mostrado

que mAb 6A1 parental se ligou ao mesmo epitopo em IL-13 de cinomólogo.

Em resumo, os resultados de ELISA indicaram que mAb 6A1 de murganho parental, mAb de 6A1 quimérico, L1+A1 e L2+A1 todos, ligaram-se na seguinte sequência da proteína de IL-13 humana: **KKLFR**

6.9 Varrimento de alanina do epitopo de ligação de 6A1 utilizando péptidos biotinilados

A fim de identificar certos resíduos chave envolvidos na interacção de IL-13 com mAb 6A1, uma abordagem de varrimento de alanina foi adotada utilizando uma sequência peptídica parental contendo o epitopo de ligação KKLFR (*i. e.*, QFVKDLLLHLKKLFREGRFN). Para esta análise, péptidos foram produzidos (fornecidos por AnaSpec Inc.) onde um aminoácido foi sequencialmente substituído por um resíduo de alanina em cada posição de aminoácido no epitopo KKLFR (e também para cada um dos aminoácidos directamente contornantes do epitopo).

Um método de ELISA foi utilizado para detectar a ligação de péptido biotinilado imobilizado ao mAb 6A1 parental e L1+A1.

Os péptidos produzidos para esta análise e um número de identificação de péptido correspondente são mostrados abaixo:

<u>Péptido N°</u>	<u>N-term.</u>	<u>Sequência</u>
1	Biotina	SEQ ID N°: 129
62	Biotina	SEQ ID N°: 130
63	Biotina	SEQ ID N°: 131
64	Biotina	SEQ ID N°: 132
65	Biotina	SEQ ID N°: 133
66	Biotina	SEQ ID N°: 134
67	Biotina	SEQ ID N°: 135
68	Biotina	SEQ ID N°: 136

Resultados: Absorvências a 490 nm

Média de resultados de teste (n=2).

Para mAb 6A1 parental (murino):

Número de péptido	1	62	63	64	65	66	67	68
Média A ₄₉₀	3,543	3,489	3,2795	1,468	3,8495	3,5995	0,595	3,581

Para L1+A1:

Número de péptido	1	62	63	64	65	66	67	68
Média A ₄₉₀	2,8535	2,832	2,6535	1,8175	3,0165	2,84	0,816	2,8085

Ver as Figuras 17a e 17b.

Estes dados sugerem que os resíduos de aminoácidos chave envolvidos na interação de mAb 6A1 ou L1+A1 com IL-13 humana são arginina (R) na posição 107 e lisina (K) na posição 103.

Esta análise foi repetida, mas utilizando mAb de 6A1 e L1+A1 numa faixa de concentrações a fim de confirmar este efeito sobre

uma gama de diluição de mAb.

O mAb 6A1 de murganho parental (Figura 17c) e o candidato humanizado L1+A1 (Figura 17d) foram avaliados para ligação aos péptidos de varrimento de alanina (SEQ ID 129, 131-135) em concentrações variantes. Como os péptidos tinham que ser distribuídos por duas placas de 96 poços, o péptido de sequência parental não contendo nenhuma substituição com alanina (SEQ ID N°: 129) foi avaliado em ambas as placas - daí dois resultados por gráfico. Isto foi para determinar se houve qualquer variação importante de placa para placa e em ambos os casos, não houve nenhuma variação aparente.

Os péptidos contendo as substituições K103A, L105A e F106A (SEQ ID 131, 133 e 134 respectivamente, numeração de resíduo como apresentado em SEQ ID: 9) mostraram ligação muito semelhante aos mAb como o péptido parental (SEQ ID 129) - portanto, estes resíduos não são críticos para ligação de 6A1/L1+A1 para IL-13. Os péptidos contendo as substituições K104A e R107A (SEQ ID 132 e 135 respectivamente, numeração de resíduo como apresentado em SEQ ID: 9) no entanto, mostram ligação reduzida a 6A1/L1+A1 em comparação com o péptido parental (SEQ ID 129), particularmente nas concentrações mais baixas, indicando que esses resíduos são críticos para ligação ótima de 6A1/L1+A1 a IL-13.

Ver as Figuras 17c e 17d.

Estes dados indicam que os resíduos de aminoácidos chave envolvidos na interacção de 6A1 parental (*i. e.*, murino) ou L1+A1 com a IL-13 humana são a arginina (R) na posição 107 e a lisina (K) na posição 103 de SEQ ID: 9.

SECÇÃO 7 - MATERIAIS E MÉTODOS

Na secção que se segue os seguintes materiais e métodos foram utilizados quando apropriado. Estes são materiais e métodos representativos. Alterações menores em materiais e métodos podem ter ocorrido em experiências repetidas.

MATERIAIS

Sistema de isolamento de ARN total SV: Promega Z3100
Sistema para RT-PCR Access: Promega A1250
QIAquick Gel Extraction kit: Qiagen 28704
Solução de carregamento de gel: Sigma G7654
Agarose: Invitrogen 15510-019
Brometo de etídeo: Sigma E1510
Tampão TAE: caseiro
Marcador de ADN de 100 pb: New England Biolabs N3231S
Kit de clonagem T.A.: Invitrogen 45-0046
Células TOP10F': Invitrogen 44-0300
L-agar + 100 µg/mL de ampicilina: caseiro
X-Gal, 50 mg/mL em DMF: Promega V394A
AmpliTaq ADN polimerase: Applied Biosystems
tampão de PCR 10X: Applied Biosystems
E-gel de agarose 1,2%: Invitrogen G501801
Meio LB + 100µg/mL de ampicilina: "aqui preparado"

Kit QIAprep Spin Miniprep: Qiagen 27106
Kit para purificação de PCR MinElute: Qiagen 28004
NEBuffer2 10x conc.: New England Biolabs B7002S
BSA purificado 100x conc.: New England Biolabs B9001S
BsiW I: New England Biolabs R0553L
Hind III: Promega R604A
Spe I: New England Biolabs R0133S
Sistema de ligação de ADN rápido LigaFast: Promega M8225
Células competentes quimicamente DH5 α MAX Efficiency:
Invitrogen 18258-012
Meios SOC: caseiro
Kit QIAfilter Plasmid Maxi: Qiagen 12263
MEM de Dulbecco com Glutamax-1: Invitrogen 31966-021
Optimem 1 com Glutamax-1: Invitrogen 51985-026
Reagente de transfecção TransFast: Promega E2431
1 mL de HiTrap rProtein A Sepharose FF: Amersham Biosciences
17-5079-01
PBS de Dulbecco: Sigma D8537
Tampão de eluição de IgG ImmunoPure: Pierce 21009
Trisma-HCl 1 M pH 8,0: Sigma T2694
ProofStart ADN polimerase: Qiagen 1016816
Tampão de PCR ProofStart: Qiagen 1016961

7.1 ELISA de ligação a IL-13 humana ou de cinomólogo

Este ensaio descreve uma ELISA que detecta a ligação de um anticorpo a IL-13 humana ou de cinomólogo. Esta é uma ELISA em formato sanduíche.

7.1.1 Materiais

1. Nunc Immunoplate 1 F96 Maxisorp (Life Technologies, 4-39454A)
2. IL-13 humana (Cambridge Biosciences, cat. N° CH1-013)
3. IL-13 de cinomólogo (feita por GlaxoSmithkline)
4. anticorpo policlonal anti-IL-13 humana de cabra (R+D Systems, cat. N° AF-213-NA)
5. IgG-HRP anti-humano (Sigma, Cat. N° A-6029)
6. IgG-HRP anti-murganho (Sigma, Cat. N° A-9309)
7. tampão carbonato/bicarbonato (Sigma, Cat. N° C-3041)
8. TBST [soro fisiológico tamponada com Tris (6,06g de Tris + 8,06 g de NaCl + 0,2 g de KCl + H₂O até 1 L) + 0,05% de Tween 20]
9. BSA (Sigma A-7030)
10. OPD (Sigma, Cat. N° P-9187)
11. Ácido sulfúrico

7.1.2 Método

1. Solução de bloqueio é 3% de BSA + TBST
2. Solução de lavagem é TBST
3. placas de ELISA “Nunc Maxisorp” cobertas com 50 µL de 5 µg/mL de anticorpo policlonal anti-IL-13 humana de cabra (R+D Systems, cat. N° AF-213-NA). Feita numa concentração de armazenamento de 500 µg/mL de acordo com instruções do fabricante e armazenada em alíquotas a -20 °C em tampão de carbonato/bicarbonato (Sigma, Cat. N° C-3041, feito como instruções do fabricante), coberta com um vedante de placa e incubada de um dia para o outro a 4 °C.
4. Bloqueio com 100 µL de 3% de BSA/TBST incubada à t.a.

durante 1 h.

5. Lavagem 3X em TBST (pelo menos 200 µL de solução de lavagem por poço por lavagem).

6. Adição de 20 ng por poço (num volume de 50 µL) de IL-13 humana (Cambridge Biosciences, cat. N° CH1-013). Feita numa concentração de armazenamento de 100 ng/mL de acordo com instruções do fabricante e armazenada em alíquotas a -20 °C ou 20 ng por poço de IL-13 de cinomólogo, em solução de bloqueio e incubação à temperatura ambiente durante 1 h.

7. Lavagem 3X em TBST.

8. Adição de 50 µL de amostra de anticorpo (titulado para obter dados de ponto de fim de titulação, se necessário) em solução de bloqueio, incubação à t.a. durante 1 h.

9. Lavagem 3X em TBST.

10. Para anticorpo quimérico 6A1 ou anticorpo humanizado, a ligação detectada utilizando 50 µL por poço de IgG-HRP anti-humano (Sigma, Cat. N° A-6029) numa diluição 1/2000 em solução de bloqueio durante 1 h à t.a. Para anticorpo monoclonal de murganho 6A1, a ligação detectada utilizando 50 µL por poço de IgG-HRP anti-murganho (Sigma, Cat. N° A-9309) numa diluição 1/1000 em solução de bloqueio durante 1 h à t.a..

11. Lavagem 3X em TBST.

12. Desenvolvimento com 100 µL de OPD (Sigma, Cat. N° P-9187. Feita como pelas instruções do fabricante), interrompida com 50 µL de H₂SO₄ 3 M, lida numa absorvência de 490 nm. Tempo de desenvolvimento é de -12 minutos.

7.2 ELISA de ligação de IL-13 humana à cadeia de IL-13R α 1 humana

Este ELISA determina se um anticorpo pode inibir a ligação de IL-13 humana à cadeia de IL-13R α 1 humana.

7.2.1 Materiais

1. Nunc Immunoplate 1 F96 Maxisorp (Life Technologies, 4-39454A)
2. IL-13R α 1-Fc humano (R&D Systems, cat. N° 146-IR)
3. IL-13 humana marcada com det-1 (caseira)
4. anti-IL-13 humana biotinilado (R&D Systems, cat. N° BAF213)
5. Estreptavidina-HRP
6. tampão carbonato/bicarbonato (Sigma, Cat. N° C-3041)
7. TBST [salino tamponada com Tris (6,06 g de Tris + 8,06 g de NaCl + 0,2 g de KCl + H₂O até 1L) + 0,05% de Tween 20]
8. BSA (Sigma A-7030)
9. OPD (Sigma, Cat. N° P-9187)
10. Ácido sulfúrico

7.2.2 Método

1. Solução de bloqueio é 3% de BSA + TBST
2. Solução de lavagem é TBST
3. placas de ELISA "Nunc Maxisorp" cobertas com 50 µL de 5 ng/mL de IL-13R α 1-Fc humano em tampão de carbonato/bicarbonato. Coberta com um vedante de placa e incubada de um dia para o outro a 4 °C.
4. Bloqueio com 100 µL de 3% de BSA/TBST incubada à t.a. durante 1 h.
5. Lavagem 3X em TBST (pelo menos 200 µL de solução de lavagem por poço por lavagem).
6. Num volume total de 50 µL, pré-incubação de 0,04 ng/µL de IL-13 humana marcada com det-1 com amostra de anticorpo (titulação) em solução de bloqueio por 30 minutos. Adição da amostra pré-incubada à placa de ELISA coberta com receptor e incubada à temperatura ambiente durante 1 h.
7. Lavagem 3X em TBST.
8. Detecção de qualquer IL-13 humana ligada utilizando 50 µL por poço de anti-IL-13 humana biotinilado diluído a 1 µg/mL. Incubação durante 1 hora à temperatura ambiente.
9. Lavagem 3X em TBST.
10. Adição de 50 µL por poço de conjugado de estreptavidina-

HRP numa diluição de 1/1000. Incubação durante 1 hora à temperatura ambiente.

11. Lavagem 3X em TBST.

12. Desenvolvimento com 100 µL por poço de OPD (Sigma, Cat. N° P-9187. Feita como instruções do fabricante), interrompida com 50 µL por poço de H₂SO₄ 3 M, lida numa absorbância de 490 nm. Tempo de desenvolvimento é de ~2 minutos.

7.3 ELISA de ligação de IL-13 humana à cadeia de IL-13Rα2 humana

Este ELISA determina se um anticorpo pode inibir a ligação de IL-13 humana à cadeia de IL-13Rα2 humana.

7.3.1 Materiais

1. Nunc Immunoplate 1 F96 Maxisorp (Life Technologies, 4-39454A)

2. Anti-IgG humana (Sigma, cat. N° I-3382)

3. IL-13Rα2-Fc humano (R&D Systems, cat. N° 614-IR)

4. IL-13 humana marcada com det-1 (caseiro)

5. Anti-IL-13 humana biotinilado (R&D Systems, cat. N° BAF213)

6. Estreptavidina-HRP

7. Tampão carbonato/bicarbonato (Sigma, Cat. N° C-3041)

8. TBST [salino tamponada com Tris (6,06 g de Tris + 8,06 g de NaCl + 0,2 g de KCl + H₂O até 1 L) + 0,05% de Tween 20]

9. BSA (Sigma A-7030)

10. OPD (Sigma, Cat. N° P-9187)

11. Ácido sulfúrico

7.3.2 Método

1. Solução de bloqueio é 3% de BSA + TBST

2. Solução de lavagem é TBST

3. placas de ELISA “Nunc Maxisorp” cobertas com 50 µL de anti-IgG humano diluído 1/1000 em tampão de carbonato/bicarbonato. Coberta com um vedante de placa e incubada de um dia para o outro a 4 °C.

4. Bloqueio com 100 µL de 3% de BSA/TBST incubada à t.a. durante 1 h.

5. Lavagem 3X em TBST (pelo menos 200 µL de solução de lavagem por poço por lavagem).

6. Adição de 50 µL por poço de 1 µg/mL de 13Rα2-Fc humano em solução de bloqueamento. Coberta com um vedante de placa e incubada à temperatura ambiente durante 1 h.

7. Lavagem 3X em TBST.

8. Num volume total de 50 µL, pré-incubação de 0,004 ng/µL de IL-13 humana marcada com det-1 com amostra de anticorpo (titulação) em solução de bloqueio por 30 minutos.

A adição da amostra pré-incubada à placa de ELISA coberta com receptor e incubada à temperatura ambiente durante 1 h.

9. Lavagem 3X em TBST.

10. Detecção de qualquer IL-13 humana ligada utilizando 50 µL por poço de anti-IL-13 humana biotinilada diluído a 1 µg/mL. Incubação durante 1 hora à temperatura ambiente.

11. Lavagem 3X em TBST.

12. Adição de 50 µL por poço de conjugado de estreptavidina-HRP em uma diluição de 1/1000. Incubação durante 1 hora à temperatura ambiente.

13. Lavagem 3X em TBST.

14. Desenvolvimento com 100 µL por poço de OPD (Sigma, Cat. N° P-9187. Feita como instruções do fabricante), interrompida com 50 µL por poço de H₂SO₄ 3 M, lida numa absorvência de 490 nm. Tempo de desenvolvimento é de -2 minutos.

7.4 Bioensaio de neutralização de IL-13 (ensaio de proliferação de célula TF-1)

Este é um bioensaio de IL-13 que pode ser utilizado para determinar a capacidade de neutralização de um anticorpo anti-IL-13. O método descrito a seguir utiliza IL-13 humana ou de cinomólogo recombinante. A IL-13 humana expressa por mamífero ou a variante de IL-13 humana Q130 também podem ser utilizada neste ensaio. (células TF-1 também proliferam em resposta a IL-5 humana. Este ensaio também foi utilizado para avaliar a capacidade de neutralização de 6A1 na bioactividade de IL-5 humana).

7.4.1 Materiais

1. linhagem celular TF-1 (obtida no lab.)
2. placas de cultura de tecidos de 96 poços (Invitrogen)
3. IL-13 humana (Cambridge Bioscience, Cat. N° CH-013)
4. CellTiter de 96 ensaios de proliferação celular não radioativos (Promega, Cat. N° G4000)

7.4.2 Método

1. Método para medir a capacidade de um mAb anti-IL13 humana para neutralizar a bioactividade de IL-13 humana ou de cinomólogo recombinante num bioensaio de célula TF-1 (linhagem celular TF-1 obtida no lab, não a versão do ATCC).

2. Este ensaio é realizado em placas de cultura de tecidos de 96 poços estéreis (Invitrogen), sob condições estéreis. Todos os testes são realizados em triplicado.

3. Pré-incubação de 10 ng/mL de IL-13 humana (Cambridge Bioscience, Cat. N° CH-013. Feita numa concentração de armazenamento de 100 ng/mL de acordo com instruções do fabricante utilizando técnica estéril em ambiente para cultura de tecido de classe 2, armazenada em pequenas alíquotas a -20 °C) ou 10 ng/mL de cino IL-13 (obtida no lab. de CA) com várias diluições do mAb anti-IL-13 humana (diluído de 6 µg/mL em diluições de 3 vezes baixas até 0,025 µg/mL) num volume total de 50 µL durante 1 hora a 37 °C. Também incluídos serão poços de controlo positivo, que têm IL-13 presente, mas não o mAb anti-IL-13 humana. Além disso, os poços de controlo negativo não terão IL-13 e nenhum anti-IL-13 humana presente. Utilizar uma placa de 96 poços de fundo redondo, de baixa ligação de proteína, estéril para esta pré-incubação. (Note-se que a concentração de IL-13 e mAb anti-IL-13 humana será reduzida pela metade num estágio posterior quando células foram adicionadas).

4. Plaquear 50 µL de células TF-1 a 2×10^5 por mL numa placa de cultura de tecidos de 96 poços estéril. Após a 1 hora de pré-incubação, adicionar a IL-13 e a amostra de mAb anti-IL-13 humana às células. O volume de ensaio de 100 µL finais, contendo várias diluições de mAb anti-IL-13 humana, IL-13 recombinante e células TF-1, é incubado a 37 °C durante ~70 horas num incubador de CO₂ humidificado.

5. Às -66 h, varre-se os poços para confirmar que eles estão

estéreis e que nenhuma contaminação bacteriana ocorreu.

6. Adição de 15 μ L de substrato MTT esterilizado por filtro por poço (Cat. N° G4000, Promega. Feito como pelas instruções do fabricante) durante as 4 horas finais de incubação.

7. Interromper a reação com 100 μ L de solução de interrupção (proporcionada no kit de MTT) para solubilizar o produto de formazan azul metabolizado. Deixar durante, pelo menos, 2 horas, então pipete para cima e para baixo para ajudar a dissolver os cristais. Alternativamente, cobrir com um vedante de placa e deixar a 4 °C de um dia para o outro, então pipetar para cima e para baixo no próximo dia (isto é mais fácil em termos de pipetagem).

8. Leitura da absorvência da solução em cada poço num leitor de placa de 96 poços a comprimentos de onda de 570 nm.

9. A capacidade do mAb anti-IL-13 humana para neutralizar a bioactividade de IL-13 humana ou de cinomólogo é expressa como a concentração de mAb anti-IL-13 humana necessária para neutralizar a bioactividade de uma quantidade definida de IL-13 humana ou de cinomólogo (5 ng/mL) em 50% (= ND₅₀). Quanto menor a concentração necessária, mais potente a capacidade de neutralização.

Exemplo: Uma placa de 96 poços preparada para esse ensaio.

Amostra 1

Anticorpo positivo

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3 µg/mL de mAb anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1			amostra de mAb 2			amostra de mAb 3			3 µg/mL de poli anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1		
B	1 µg/mL de mAb anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1									1 µg/mL de poli anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1		
C	0,33 µg/mL de mAb anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1									0,33 µg/mL de poli anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1		
D	0,11 µg/mL de mAb anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1									0,11 µg/mL de poli anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1		
E	0,037 µg/mL de mAb anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1									0,037 µg/mL de poli anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1		
F	0,0123 µg/mL de mAb anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1									0,0123 µg/mL de poli anti-hIL-13 + IL-13 + TF-1		
G	Controlo positivo para proliferação de célula TF-1 = células TF-1 + IL-13 (nenhum mAb, 12 poços)											
H	Controlo de sinal ruído = Apenas células TF-1 presentes (nenhuma IL-13, nenhum mAb, 12 poços)											

7.5 ELISA de ligação a IL-4 humana

Este ensaio descreve um ELISA que detecta a ligação de um anticorpo a IL-4 humana. Este está em formato de ELISA em sanduíche.

7.5.1 Materiais

1. Nunc Immunoplate 1 F96 Maxisorp (Life Technologies, 4-39454A)
2. IL-4 humana (R+D Systems, cat. N°)
3. Anticorpo policlonal anti-IL-4 humana de cabra (R+D Systems, cat. N° AF-204-NA)
4. Anticorpo monoclonal anti-IL-4 humana de rato biotinilado (BD/Pharmlingen, Cat. N°)
5. IgG-HRP anti-murganho (Dako, Cat. N° P0260)
6. IgG-HRP anti-murganho (Sigma, Cat. N° A-9309)
7. Tampão carbonato/bicarbonato (Sigma, Cat. N° C-3041)
8. PBST (PBS + 0,05% de Tween 20)
9. BSA (Sigma A-7030)
10. OPD (Sigma, Cat. N° P-9187)

11. Ácido sulfúrico

7.5.2 Método

1. Solução de bloqueio é 3% de BSA + PBST

2. Solução de lavagem é PBST

3. Placas de ELISA “Nunc Maxisorp” cobertas com 50 µL de 5 µg/mL de anticorpo policlonal anti-IL-4 humana de cabra (R+D Systems, cat. N° AF-204-NA. Feito numa concentração de armazenamento de 500 µg/mL de acordo com instruções do fabricante e armazenado em alíquotas a -20 °C) em tampão de carbonato/bicarbonato (Sigma, Cat. N° C-3041, feito como instruções do fabricante), coberta com um vedante de placa e incubada de um dia para o outro a 4 °C.

4. Bloqueio com 100 µL de 3% de BSA/PBST incubada a pressão e temperatura ambiente (pta) durante 1 h.

5. Lavagem 3X em PBST (pelo menos 200 µL de solução de lavagem por poço por lavagem).

6. Adição de 1 ng/mL (em um volume de 50 µL) de IL-4 humana em solução de bloqueio e incubada à temperatura ambiente durante 1 h.

7. Lavagem 3X em PBST.

8. Adição de 50 µL de amostra de anticorpo (titulação para obter dados de ponto final de título, se necessário) em

solução de bloqueio, incubação à pta durante 1 h. Como controlo positivo para ligação a IL-4 humana, utilizar um anticorpo monoclonal anti-IL-4 humana biotinilado (titulado).

9. Lavagem 3X em PBST.

10. Para anticorpo monoclonal de murganho 6A1, detecção de ligação utilizando 50 µL por poço de IgG-HRP anti-murganho (Sigma, Cat. N° A-9309) numa diluição de 1/1000 em solução bloqueio durante 1 h à t.a. Para anticorpo quimérico 6A1 ou anticorpo humanizado, detecção de ligação utilizando 50 µL por poço de IgG-HRP anti-humano (Sigma, Cat. N° A-6029) numa diluição de 1/2000 em solução bloqueio durante 1 h à t.a.. Para controlo positivo o anticorpo monoclonal anti-IL-4 humana de rato biotinilado, detectado utilizando um anticorpo conjugado a estreptavidina-HRP. (Senão, o anticorpo HRP anti-murganho, P0260, detectará 6A1 e o anticorpo monoclonal anti-IL-4 humana de rato biotinilado).

11. Lavagem 3X em PBST.

12. Desenvolvimento com 100 µL de OPD (Sigma, Cat. N° P-9187. Feita como pelas instruções do fabricante), interrompida com 50 µL por poço de H₂SO₄ 3 M, lida numa absorbância de 490 nm.

7.6 ELISA de mapeamento de epitopo

Este ensaio descreve uma ELISA que detecta a ligação de mAb 6A1 de murganho a péptidos de IL-13 humana ou de cinomólogo.

7.6.1 Materiais

1. Nunc Immunoplate 1 F96 Maxisorp (Life Technologies, 4-39454A)
2. Estreptavidina ImmunoPure® (Pierce, cat. N° 21125)
3. PBST (Soro Fisiológico Tamponado com Fosfato + 0,05% de Tween 20)
4. BSA (Sigma A-7030)
5. Péptidos de 16 mero de IL-13 humana e de cinomólogo, deslocamento = 4 (pedido personalizado Mimotopes)
6. Péptidos de 20 mero de controlo positivo e negativo (Fornecidos com pedido personalizado Mimotopes)
7. Mab 6A1
8. controlo Ab (Fornecido com pedido personalizado Mimotopes)
9. conjugado de HRP e anti-Ig de murganho de coelho (DAKO, Cat. N° P0260)
10. OPD (Sigma, Cat. N° P-9187)
11. Ácido sulfúrico 3M

7.6.2 Métodos

1. Solução de bloqueio é 3% de BSA + PBST

2. Solução de lavagem é PBST

3. placas de ELISA “Nunc Maxisorp” cobertas com 100 µL de 5 µg/mL de Estreptavidina ImmunoPure® (Pierce, cat. N° 21125 feito numa concentração de armazenamento de 1mg/mL de acordo com instruções do fabricante e armazenada em alíquotas a +4 °C) utilizando PBST como diluente. Incubação de um dia para o outro a 37 °C para permitir que a solução seque.

4. Bloqueio com 200 µL de 3% de BSA/PBST. Adição de vedante de placa e incubação à pta durante 1 h.

5. Lavagem 3X em PBST (pelo menos 200 µL de solução de lavagem por poço por lavagem).

6. Em duplicado e utilizando PBST como diluente, adicionar 10 µL por poço (exceto poços de controlo) de diluições de 1000 vezes de cada péptido (dissolvidos como as instruções do fabricante em 200µL de acetonitrila 40% e água 60%, então aliquotar em diluições de 10 vezes no mesmo solvente e armazenar a -20 °C).

7. Nos poços de controlo, em duplicado e utilizando PBST como diluente, adicionar 100 µL por poço de diluições de 10 vezes de péptidos controlo (dissolvidos como instruções do fabricante em 1 mL de acetonitrilo 40% e água 60% e armazenar a -20 °C). Adicionar vedante de placa e incubar à pta durante 1 h numa placa agitadora.

8. Lavagem 3X em PBST (pelo menos 200µL de solução de lavagem por poço por lavagem).
9. Adicionar 100 µL por poço (excepto poços de controlo) de mAb de murganho a 1,506 µg/mL em PBST.
10. Adicionar 100 µL por poço apenas a poços de controlo, de diluições de 4, 16 e 32 vezes de anticorpo controlo (utilizado como fornecido pelo fabricante e armazenada a -20 °C) utilizando PBST como diluente. Adicionar vedante de placa e incubar à pta (pressão e temperatura ambiente) por 1 h numa placa agitadora.
11. Lavagem 3X em PBST (pelo menos 200 µL de solução de lavagem por poço por lavagem).
12. Adicionar 100 µL por poço de diluição de 2000 vezes e anti-Ig de murganho de coelho conjugado a HRP DAKO, Cat. N° P0260 utilizado como fornecido, armazenado a +4 °C) utilizando PBST como diluente. Adicionar vedante de placa e incubar à pta durante 1 h numa placa agitadora.
13. Lavagem 3X em PBST (pelo menos 200 µL de solução de lavagem por poço por lavagem).

14. Desenvolvimento com 100 μ L de OPD (Sigma, Cat. N° P-9187. Feita como instruções do fabricante), interrompida com 50 μ L de H_2SO_4 3 M, lida numa absorbância de 490 nm. Tempo de desenvolvimento é ~10 minutos.

7.7 ELISA de mapeamento fino de epitopo

Este ensaio descreve um ELISA que detecta a ligação de mAb 6A1 a péptidos de IL-13 humana ou de cinomólogo.

7.7.1 Materiais

1. Nunc Immunoplate 1 F96 Maxisorp (Life Technologies, 4-39454A)
2. Streptavidina ImmunoPure® (Pierce, cat. N° 21125)
3. PBST (PBS + 0,05% de Tween 20)
4. BSA (Sigma A-7030)
5. Péptidos rede de janela parcial de IL-13 humana e de cinomólogo (de 14 meros, truncados por um aminoácido de cada vez a partir tanto da extremidade N- como do terminal C; pedido personalizado Mimotopes)
6. Péptido de 16 mer de controlo positivo (Fornecidos com prévio pedido personalizado Mimotopes)
7. mAb 6A1 (caseiro)

8. Anticorpo conjugado a HRP anti-IgG (específico para Fc) de murganho de cabra (Sigma A-9309)

10. OPD (Sigma, Cat. N° P-9187)

11. Ácido sulfúrico 3 M

7.7.2 Método

1. Solução de bloqueio é 3% de BSA + PBST.

2. Solução de lavagem é PBST.

3. placas de ELISA "Nunc Maxisorp" cobertas com 100 µL de 5 µg/mL de Estreptavidina ImmunoPure® em água ultra pura (Pierce, cat. N° 21125 feito numa concentração de armazenamento de 1 mg/mL de acordo com instruções do fabricante e armazenada em alíquotas a +4 °C). Incubação de um dia para o outro a 37 °C.

4. Bloqueio com 200 µL de 3% de BSA/PBST. Adição de vedante de placa e incubação de um dia para o outro a +4 °C.

5. Lavagem 3X em PBST (pelo menos 200 µL de solução de lavagem por poço por lavagem).

6. Em duplicado e utilizando 3% de BSA em PBST como diluente, adicionar 100 µL por poço de diluições de 1000 vezes de cada péptido (dissolvidos como instruções do fabricante em 200 µL de acetonitrilo 40% e água 60% e

armazenar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Adição de vedante de placa e incubação à temperatura ambiente durante 1 hora numa placa agitadora.

7. Lavagem 3X em PBST (pelo menos 200 μL de solução de lavagem por poço por lavagem).

8. Adicionar 100 μL por poço de 3 $\mu\text{g/mL}$ de 6A1 diluído em 3% de BSA em PBST. Adição de vedante de placa e incubação à temperatura ambiente durante 1 hora numa placa agitadora.

9. Lavagem 3X em PBST (pelo menos 200 μL de solução de lavagem por poço por lavagem).

10. Adicionar 100 μL por poço de diluição de anticorpo conjugado a HRP anti-IgG de murganho de cabra (Sigma A-9309 utilizado como fornecido, armazenado a $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$) utilizando 3% de BSA em PBST como diluente. Adicionar vedante de placa e incubar à temperatura ambiente durante 1 h numa placa agitadora.

11. Lavagem 3X em PBST (pelo menos 200 μL de solução de lavagem por poço por lavagem).

12. Desenvolvimento com 100 μL de OPD (Sigma, Cat. N° P-9187. Feita como pelas instruções do fabricante), interrompida com 50 μL de H_2SO_4 3 M, lida numa absorvência de 490 nm. Tempo de desenvolvimento é ~10 minutos.

7.8 Método de Biacore™ para construções humanizadas para anticorpo de IL-13 X IL-13 inteira

A análise de cinética foi realizada numa máquina Biacore 3000, utilizando um método para capturar anticorpo. Em resumo, para as construções de anticorpo 6A1 quimérico e humanizado foi utilizada captura de Proteína A, enquanto para o anticorpo 6A1 murino parental, a captura foi através de um anticorpo anti-Fc de murganho fornecido por Biacore.

Em resumo, o método é como se segue, o ligante de captura foi imobilizado num chip biossensor CM5 por acoplamento de amina primária de acordo com protocolos padrões Biacore e utilizando reagentes fornecidos no kit de acoplamento de amina primária de Biacore. O método envolve a activação de superfície de sensor CM5 pela passagem de uma solução de 50 mM de N-hidroxisuccinimida (NHS) e 200 mM de N-etil-N'-dimetilaminopropilcarbomida (EDC) sobre a superfície. Então, o ligante de captura (dissolvido em tampão de acetato pH5 ou pH 4,5) foi acoplado à superfície de sensor activado após o que quaisquer ésteres activados foram bloqueados por uma injeção de cloreto de etanolamina 1 M, pH 8,5.

O anticorpo candidato foi então passado sobre a superfície de proteína A ou anticorpo anti-Fc de murganho, dependendo se é de origem humana ou de murganho e capturado. Uma vez que um sinal de ligação estável tenha sido visto, a IL-13 é passada sobre a superfície de anticorpo capturado em várias concentrações definidas. As curvas de ligação subsequentes foram analisadas com o programa de análise de Biacore BIAeval v4.1 para determinar a cinética. As experiências foram efectuadas utilizando tampão Biacore HBS-EP.

7.8.1 Método de Biacore™ para Anticorpo de IL-13 vs péptido

A análise cinética foi realizada numa máquina Biacore 3000 utilizando ligação directa de anticorpo a péptido de IL-13 imobilizado. Em resumo, o péptido biotinilado de IL-13 foi capturado utilizando chip biossensor SA (estreptavidina) Biacore. Os anticorpos foram então passados sobre a superfície do sensor em várias concentrações. As curvas de ligação subsequentes foram analisadas com software de análise de Biacore BIAeval 4.1 para determinar a cinética. A experiência foi efectuada utilizando tampão Biacore HBS-EP.

8. Eficácia de mAB anti-IL13 humanizada de L1+A1 em modelo de asma de cinomólogo

Esta secção é profética.

O modelo de bronco-constricção pulmonar induzida por *Ascaris suum* em macacos cinomólogos (*Macaca fascicularis*) é reconhecido como um modelo não clínico ou relacionado com asma em humanos (Patterson R, et al. *Trans. Assoc. Am. Physicians* 1980 93: 317-325; Patterson R, et al. *J. Lab. Clin. Med.* 1983 101: 864-872).

Neste modelo, os animais que têm uma sensibilidade pulmonar inata a *A. suum* são apresentados a *A. suum* nebulizado para induzir uma resposta asmática. Esta resposta asmática pode ser caracterizada pela medição de hipersensibilidade e vias respiratórias (AHR), infiltração celular como medido em fluido de lavagem bronco-alveolar (BAL) e níveis de IgE sérica. Os métodos experimentais são semelhantes aos descritos por Mauser

P. et al. em *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 1995 204: 467-472 e por Evanoff H, et al. em *Immunologic Investigation* 1992 21: 39.

Esse estudo utiliza 30 animais, pré-seleccionados para entrada tendo demonstrado uma resposta bronco-constritora positiva a uma dose específica de antigénio de *A. suum*. *A. suum* é administrado numa dose de resposta óptima (ORD) para cada animal. É uma dose pré-determinada de *A. suum* que produz um aumento em R_L (resistência pulmonar) de, pelo menos, 40% e uma diminuição na C_{DYN} (cumprimento de dinâmica) de, pelo menos, 35%, por inalação de aerossol (para uma dose única dando mais de 15 respirações utilizando um nebulizador).

Este estudo ocorre em 2 fases. Durante a fase 1, AHR é avaliada em resposta a desafio de histamina intravenosa (i/v) (isto é, uma dose de histamina suficiente para induzir um aumento em R_L de, pelo menos, 30% acima da linha basal (PC_{30})) tanto antes (a linha basal de avaliação de função pulmonar no dia 1) como após (no dia 11) a administração de antigénio de *A. suum* (nos dias 9 e 10, quando *A. suum* é administrado numa dose óptima pré-determinada para cada animal por inalação de aerossol).

A fase 2 é idêntica à fase 1 excepto que os animais recebem tratamento com anticorpo (ver abaixo), cada anticorpo é dado como 3 doses de aproximadamente 30 mg/kg administradas por infusão i/v nos dias 1, 5 e 9.

Grupo 1 (n = 12): L1+A1 (mAb anti-IL-13 humanizado, SEQ ID N°: 18 e SEQ ID N°: 22)

Grupo 2 (n = 12): L1+A1 (mAb anti-IL-13 humanizado, 30 mg/kg) e Pascolizumab (mAb anti-IL-4 humanizado, 30 mg/kg)

Grupo 3 (n = 6): tratamento de controlo negativo de veículo sozinho

As leituras de AHR das fases 1 e 2 são calculadas tomando as leituras de pressão e fluxo de ar - resistência de pulmão (R_L) e comprimento de dinâmica (C_{DYN}) - em resposta a histamina, utilizando o sistema mecânico pulmonar Buxco. A alteração de percentagem máxima da linha basal comparada a posterior desafio com antigénio de *A. suum* [para resistência de pulmão (R_L) e comprimento de dinâmica (C_{DYN})] é comparada para fases 1 e 2, isto é, com ou sem tratamento de anticorpo e esses dados são utilizados para avaliar o fenótipo de AHR.

Além disso, as amostras BAL são tomadas nos dias 1 e 11 nas fases 1 e 2, para medir a infiltração celular e, em particular, eosinofilia. As amostras séricas também são tomadas para monitorizar níveis de IgE.

Tabela A

Descrição de proteína ou polinucleótido (PN)	Identificador de sequência (SEQ ID N°:)
6A1, CDRH1	1
6A1, CDRH2	2
6A1, CDRH3	3
6A1, CDRL1	4
6A1, CDRL2	5
6A1, CDRL3	6
6A1, VH (murino)	7
6A1, VL (murino)	8
hIL-13	9
hIL-13 (PN)	10
6A1, VH, construção humanizada A1	11
6A1, VH, construção humanizada A2	12
6A1, VH, construção humanizada A3	13
6A1, VH, construção humanizada A4	14
6A1, VL, construção humanizada L1	15
6A1, VL, construção humanizada L2	16
6A1, cadeia pesada, construção humanizada A1	18
6A1, cadeia pesada, construção humanizada A2	19
6A1, cadeia pesada, construção humanizada A3	20
6A1, cadeia pesada, construção humanizada A4	21
6A1, cadeia leve, construção humanizada L1	22

(continuação)

6A1, cadeia leve, construção humanizada L2	23
6A1, PN codificando SEQ ID N°: 7	24
6A1, PN codificando SEQ ID N°: 8	25
6A1, PN codificando SEQ ID N°: 11	26
6A1, PN codificando SEQ ID N°: 12	27
6A1, PN codificando SEQ ID N°: 13	28
6A1, PN codificando SEQ ID N°: 14	29
6A1, PN codificando SEQ ID N°: 15	30
6A1, PN codificando SEQ ID N°: 16	31
6A1, PN codificando SEQ ID N°: 18	32
6A1, PN codificando SEQ ID N°: 19	33
6A1, PN codificando SEQ ID N°: 20	34
6A1, PN codificando SEQ ID N°: 21	35
6A1, PN codificando SEQ ID N°: 22	36
6A1, PN codificando SEQ ID N°: 23	37

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

SEQ ID N°: 1

FYIKDTYMH

SEQ ID N°: 2

TIDPANGNTKYVPKFQG

SEQ ID N°: 3

SIYDDYHYDDYYAMDY

SEQ ID N°: 4

RSSQNIVHINGNTYLE

SEQ ID N°:5

KISDRFS

SEQ ID N°: 6

FQGSHPWT

SEQ ID N°: 7

EIQ LQQSVAELVRPGASVRLSCTASGFYIKDTYMHWVIQRPEQGLEWIGTIDPAN
GNTKYVPKFQ GKATITADTSSNTAYLRLSSLTSED TAIYYCARSYDDYHYDDYY
AMDYWGQGTSTVTVSS.

SEQ ID N°: 8

DVLM TQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQNIVHINGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYK
ISDRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPWTFGGGTKLE
IK.

SEQ ID N°: 9

GPVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALES LINVSG
CSAIEKTQRM LSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLHLKKLFREGR
FN

SEQ ID N°: 10

GGCCCTGTGCCTCCCTCTACAGCCCTCAGGGAGCTCATTGAGGAGCTGGTCAACA
TCACCCAGAACCAGAAGGCTCCGCTCTGCAATGGCAGCATGGTATGGAGCATCAA
CCTGACAGCTGGCATGTACTGTGCAGCCCTGGAATCCCTGATCAACGTGTCAGGC
TGCAGTGCCATCGAGAAGACCCAGAGGATGCTGAGCGGATTCTGCCCGCACAAGG
TCTCAGCTGGGCAGTTTTCCAGCTTGCATGTCCGAGACACCAAAATCGAGGTGGC
CCAGTTTGTAAGGACCTGCTCTTACATTTAAAGAACTTTTTTCGCGAGGGACGG
TTCAACTGA

SEQ ID N°: 11

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWVRQAPGQGLEWMGTIDPAN
GNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARS IYDDYHYDDYY
AMDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID N°: 12

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWVIQAPGQGLEWMGTIDPAN
GNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARS IYDDYHYDDYY
AMDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID N°: 13

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWVIQAPGQGLEWMGTIDPAN
GNTKYVPKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARS IYDDYHYDDYY
AMDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID N°: 14

QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGFYIKDTYMHWVIQAPGQGLEWMGTIDPAN
GNTKYVPKFQGRVTITADTSTSTAYMRLSSLRSED TAVYYCARS IYDDYHYDDYY
AMDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID N°: 15

DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQNIVHINGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYK
ISDRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADDVGIYYCFQGSHVPWTFGQGTKLE
IK

SEQ ID N°: 16

DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQNIVHINGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYK
ISDRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADDVGVYYCFQGSHVPWTFGQGTKLE
IK

SEQ ID N°: 17

MGWSCIIILFLVATATGVHS

SEQ ID N°: 18

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWVRQAPGQGLĚWMGTIDPAN
GNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARS IYDDYHYDDYY
AMDYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISPTAEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID N°: 19

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWVIQAPGQGLEWMGTIDPAN
GNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARS IYDDYHYDDYY
AMDYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKIJTLMTSPTAEVTCWVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID N°: 20

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWVIQAPGQGLEWMGTIDPAN
GNTKYVPKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARS IYDDYHYDDYY
AMDYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKIJTLMTSPTAEVTCWVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK

VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID N°: 21

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWVIQAPGQGLEWMGTIDPAN
GNTKYVPKFQGRVTITADTSTSTAYMRLSSLRSEDTAVYYCARSYDDYHYDDYY
AMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KKVEPKSCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKIJTLMTSPTAEVTCWVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID N°: 22

DIVNTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQNIVHINGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYK
ISDRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADDVGIIYYCFQGSHVPWTFGQGTKLE
IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVADNLQSGNSQ
ESVTEQDSK1JSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID N°: 23

DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQNIVHINGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYK
ISDRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADDVGVIYYCFQGSHVPWTFGQGTKLE
IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVADNLQSGNSQ
ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID N°: 24

GAAATTCAGCTGCAGCAGTCTGTGGCAGAAGTTGTGAGGCCAGGGGCCTCAGTCA
GGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCTACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGT
GATTCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAACGATTGATCCTGCGAAT
GGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAACTGCAGACA
CATCCTCCAACACAGCCTACCTGCGGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGC
CATCTATTACTGTGCTAGAAGCATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTAT
GCTATGGACTACTGGGGTCAAGGA

SEQ ID N°: 25

GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAG
CCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAACATTGTACATATTAATGGAAACACCTA
TTTAGAATGGTACCTTCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAA
ATTTCCGACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGA
CAGATTTACGCTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTA
CTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAA
ATCAAA

SEQ ID N°: 26

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGA
AGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATTCTACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGT
GCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAACGATTGATCCTGCGAAT
GGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACG
AATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGC
CGTGTATTACTGTGCGAGAAGCATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTAT
GCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAGTCTCCTCA

SEQ ID N°: 27

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGA
AGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATTCTACATTAAAGACACCTATATCCACTGGGT
GATACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAACGATTGATCCTGCGAAT
GGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACG

AATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGC
CGTGTATTACTGTGCGAGAAGCATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTAT
GCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAGTCTCCTCA

SEQ ID N°: 28

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGA
AGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATTCTACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGT
GATACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAACGATTGATCCTGCGAAT
GGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACA
CATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGC
CGTGTATTACTGTGCGAGAAGAATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTAT
GCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAGTCTCCTCA

SEQ ID N°: 29

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGA
GGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATTCTACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGT
GATACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAACGATTGATCCTGCGAAT
GGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACA
CATCCACGAGCACAGCCTACATGAGGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGC
CGTGTATTACTGTGCGAGAAGCATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTAT
GCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAGTCTCCTCA

SEQ ID N°: 30

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGG
CCTCCATCTCCTGCAGATCTAGTCAGAACATTGTACATATTAATGGAAACACCTA
TTTAGAATGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACGGCTCTTGATCTATAAA
ATTTCCGACCGATTTTCTGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCA
CAGATTTTACATTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGACGATGTTGGAATTTATTA
CTGCTTTCAAGTTTCACATGTTCCGTGGACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAG
ATCAAG

SEQ ID N°: 31

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGG
CCTCCATCTCCTGCAGATCTAGTCAGAACATTGTACATATTAATGGAAACACCTA
TTTAGAATGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACGGCTCTTGATCTATAAA
ATTTCCGACCGATTTTCTGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCA
CAGATTTTACATTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGACGATGTTGGAGTTTATTA
CTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGTGGACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAG
ATCAAG

SEQ ID N°:32

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGA
AGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATTCTACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGT
GCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAACGATTGATCCTGCGAAT
GGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACG
AATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGC
CGTGTATTACTGTGCGAGAAGCATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTAT
GCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCA
AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCAC
AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTG
TGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGT
CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG
CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC
AAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCAG
CACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCCTTCCCAAGGA
CACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA
ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG
CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG
GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG
GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAC
CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC
GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTC

CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA
GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG
CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

SEQ ID N°: 33

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCTCGGTGA
AGGTCTCTTGCAAGGCTTCTGGATTCTACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGT
GATACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAACGATTGATCCTGCGAAT
GGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACG
AATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGC
CGTGTATTACTGTGCGAGAAGCATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTAT
GCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCA
AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCAC
AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTG
TGGAATCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGT
CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG
CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC
AAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAACTCACACATGCCCACCGTGCCAG
CACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGA
CACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA
ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG
CGTCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG
GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAG
GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAC
CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC
GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTC
CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA
GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG
CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

SEQ ID N°: 34

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGOTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGA
AGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATTCTACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGT
GATACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAACGATTGATCCTGCGAAT
GGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACA
CATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGC
CGTGTATTACTGTGCGAGAAGCATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTAT
GCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCA
AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCAC
AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTG
TGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGT
CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG
CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC
AAGAAAGTTGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACAQATGCCACCGTGCCAG
CACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCCTTCCCAAGGA
CACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA
ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG
CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG
GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG
GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAC
CAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC
GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTC
CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA
GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG
CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

SEQ ID N°: 35

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGA
GGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATTCTACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGT
GATACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAACGATTGATCCTGCGAAT
GGTAATACTAAATATGTCCCGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACA

CATCCACGAGCACAGCCTACATGAGGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGC
CGTGTATTACTGTGCGAGAAGCATCTATGATGATTACCACTACGACGATTACTAT
GCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCA
AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCAC
AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTG
TGGAAGTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGT
CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG
CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC
AAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAACTCACACATGCCCACCGTGCCAG
CACCTGAACTCCTGGGGCGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGA
CACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA
ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG
CGTCTCACCCTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG
GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAPÂG
GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAC
CAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC
GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTC
CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA
GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG
CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

SEQ ID N°: 36

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGG
CCTCCATCTCCTGCAGATCTAGTCAGAACATTGTACATATTAATGGAAACACCTA
TTTAGAATGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACGGCTCTTGATCTATAAA
ATTTCCGACCGATTTTCTGGGGTCCCTGACAGGTTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGCA
CAGATTTTACATTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGACGATGTTGGAATTTATTA
CTGCTTTCAAGTTTACATGTTCCGTGGACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAG
ATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGC
AGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAaCTTCTATCCCAG
AGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAG

GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCC
TGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAC
CCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

SEQ ID N°: 37

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGG
CCTCCATCTCCTGCAGATCTAGTCAGAACATTGTACATATTAATGGAAACACCTA
TTTAGAATGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACGGCTCTTGATCTATAAA
ATTTCCGACCGATTTTCTGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCA
CAGATTTTACATTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGACGATGTTGGAGTTTATTA
CTGCTTTCAAAGGTTACATGTTCCGTGGACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAG
ATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGC
AGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAG
AGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAG
GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCC
TGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAC
CCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

SEQ ID N°: 38

SGSGPSTALRELIEELVNIT

SEQ ID N°: 39

SGSGLRELIEELVNITQNQK

SEQ ID N°: 40

SGSGIEELVNITQNQKAPLC

SEQ ID N°: 41

SGSGVNITQNQKAPLCNGSM

SEQ ID N°: 42

SGSGQNQKAPLCNGSMVWSI

SEQ ID N°:43

SGSGAPLCNGSMVWSINLTA

SEQ ID N°: 44

SGS GNGSMVWS INLTAGMYC

SEQ ID N°:45

SGSGVWSINLTAGMYCJ

SEQ ID N°: 46

SGSGNLTAGMYCAALESLIN

SEQ ID N°: 47

SGSGGMYCAALESLINVSGC

SEQ ID N°: 48

SGSGAALESLINVSGCSAIE

SEQ ID N°:49

SGSGSLINVSGCSAIEKTQR

SEQ ID N°: 50

SGSGVSGCSAIEKTQRMLSG

SEQ ID N°: 51

SGSGSAIEKTQRMLSGFCPH

SEQ ID N°: 52

SGSGKTQRMLSGFCPHKVSA

SEQ ID N°: 53

SGSGMLSGFCPHKVSAGQFS

SEQ ID N°: 54

SGSGFCPHKVSAGQFSSLHV

SEQ ID N°: 55

SGSGKVSAGQFSSLHVRDTK

SEQ ID N°: 56

SGSGGQFSSLHVRDTKIEVA

SEQ ID N°: 57

SGSGSLHVRDTKIEVAQFVK

SEQ ID N°: 58

SGSGRDTKIEVAQFVKDLLL

SEQ ID N°: 59

SGSGIEVAQFVKDLLLHLKK

SEQ ID N°: 60

SGSGQFVKDLLLHLKKLFRE

SEQ ID N°: 61

SGSGDLLLHLKKLFREGRFN

SEQ ID N°: 62

SGSGPSTALKELIEELVNIT

SEQ ID N°: 63

SGSGLKELIEELVNITQNQK

SEQ ID N°: 64

SGSGNGSMVWSINLTAGVYC

SEQ ID N°: 65

SGSGVWSINLTAGVYCAALE

SEQ ID N°: 66

SGSGNLTAGVYCAALESLIN

SEQ ID N°: 67

SGSGGVYCAALESLINVSGC

SEQ ID N°: 68

SGSGVSGCSAIEKTQRMNLNG

SEQ ID N°: 69

SGSGSAIEKTQRMNLNGFCPH

SEQ ID N°: 70

SGSGKTQRMNLNGFCPHK TSA

SEQ ID N°: 71

SGSGMLNGFCPHKVSAGQFS

SEQ ID N°: 72

SGSGFCPHKVSAGQFSSLRV

SEQ ID N°: 73

SGSGKVSAGQFSSLRVRDTK

SEQ ID N°: 74

SGSGGQFSSLRVRDTKIEVA

SEQ ID N°: 75

SGSGSLRVRDTKIEVAQFVK

SEQ ID N°: 76

SGSGRDTKIEVAQFVIDLLV

SEQ ID N°: 77

SGSGIEVAQFVKDLLVHLKK

SEQ ID N°: 78

SGSGQFVKDLLVHLKKLFRE

SEQ ID N°: 79

SGSGDLLVHLKKLFRREGQFN

SEQ ID N°: 80

QFVKDLLLHLKKLFRE

SEQ ID N°: 81

DLLLHLKKLFRREGRFN

SEQ ID N°: 82

QPVKDLLVHLKKLFRE

SEQ ID N°: 83

DLLVMLKKLFREGQFN

SEQ ID N°: 84

DLLLHLKKLFRE

SEQ ID N°: 85

DLLVHLKKLFRE

SEQ ID N°: 86

GATGAAGCTTGCCACCATGAAATGCAGCTGGGTCATC

SEQ ID N°: 87

GATGGACTAGTGTTTCCTTGACCCCAGTA

SEQ ID N°: 88

GATGAAGCTTGCCACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTC

SEQ ID N°: 89

GATGCGTACGTTTGATTTCCAGCTTGGTGCC

SEQ ID N°: 90

SPVPPSTALKELIEELVNITQNQKAPLCN

GSMVWSINLTAGVYCAALESLINVSGCSA

IEKTQRMNGFCPHKVSAGQFSSLRVRDT

KIEVAQFVKDLLVHLKKLFREGQFN

SEQ ID N°: 91

AGCCCTGTGCCTCCCTCTACAGCCCTCAAGGAGCTCATTGAGGAGCTGGTCAACA
TCACCCAGAACCAGAAGGCCCGCTCTGCAATGGCAGCATGGTGTGGAGCATCAA
CCTGACAGCTGGCGTGTACTGTGCAGCCCTGGAATCCCTGATCAACGTGTCAGGC
TGCAGTGCCATCGAGAAGACCCAGAGGATGCTGAACGGATTCTGCCCCGACAAGG
TCTCAGCTGGGCAGTTTTCCAGCTTGCGTGTCCGAGACACCAAAATCGAGGTGGC
CCAGTTTGTAAAGGACCTGCTCGTACATTTAAAGAACTTTTTCGCGAGGGACAG
TTCAACTGA

SEQ ID N°: 92

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFYIKDTYMHWVRQAPGQGLEWMGTIDPAN
GNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSYDDYHYDDYY
AMDYWGQGTLVTVSSG

SEQ ID N°: 93

DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQNIVHINGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYK
ISDRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADDVGIYYCFQGSHVPWTFGQGTKLE
IK

SEQ ID N°: 94

SGSGKDLLLHLKKLFREG

SEQ ID N°: 95

SGSGDLLLHLKKLFREG

SEQ ID N°: 96

SGSGLLLHLKKLJFREG

SEQ ID N°: 97

SGSGLLHLKKLFREG

SEQ ID N°: 98
SGSGLHLKKLFREG

SEQ ID N°: 99
SGSGHLKKLFREG

SEQ ID N°: 100
SGSGLKKLFREG

SEQ ID N°: 101
SGSGKKLFREG

SEQ ID N°: 102
SGSGKLFREG

SEQ ID N°: 103
SGSGLFREG

SEQ ID N°: 104
SGSGFREG

SEQ ID N°: 105
SGSGKDLLLHLKKLFRE

SEQ ID N°: 106
SGSGKDLLLHLKKLFR

SEQ ID N°: 107
SGSGKDLLLHLKKLF

SEQ ID N°: 108

SGSGKDLLLHLKKL

SEQ ID N°: 109

SGSGKDLLLHLKK

SEQ ID N°: 110

SGSGKDLLLHLK

SEQ ID N°: 111

SGSGKDLLLHL

SEQ ID N°: 112

SGSGKDLLH

SEQ ID N°: 113

SGSGKDLLL

SEQ ID N°: 114

SGSGKDLL

SEQ ID N°: 115

SGSGKDLLVHLKKLFREG

SEQ ID N°: 116

SGSGDLLVHLKKLFREG

SEQ ID N°: 117

SGSGLLVHLKKLFREG

SEQ ID N°: 118

SGSGLVHLKKLFREG

SEQ ID N°: 119

SGSGVHLKKLFREG

SEQ ID N°: 120

SGSGKDLLVHLKKLFRE

SEQ ID N°: 121

SGSGKDLLVHLKKLFR

SEQ ID N°: 122

SGSGKDLLVHLKKLF

SEQ ID N°: 123

SGSGKDLLVHLKKL

SEQ ID N°: 124

SGSGKDLLVHLKK

SEQ ID N°: 125

SGSGKDLLVHLK

SEQ ID N°: 126

SGSGKDLLVHL

SEQ ID N°: 127

SGSGKDLLVH

SEQ ID N°: 128

SGBGKDLLV

SEQ ID N°: 129

QFVKDLLLHLKKLFREGRFN

SEQ ID N°: 130

QFVKDLLHAKKLFREGRFN

SEQ ID N°: 131

QFVKDLLLHLAKLFREGRFN

SEQ ID N°: 132

QFVKDLLLHLKALFREGRFN

SEQ ID N°: 133

QFVKDLLLHLKKAFREGRFN

SEQ ID N°: 134

QFVKDLLLHLKKLAREGRFN

SEQ ID N°: 135

QFVKDLLLHLKKLFAEGRFN

SEQ ID N°: 136

QFVKDLLLHLKKLFRAGRFN

Lisboa, 24 de Fevereiro de 2012

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo terapêutico ou seu fragmento de ligação a antígeno que se liga especificamente a hIL-13 e inibe a interação entre hIL-13 e hIL-13R e compreende a seguinte CDRH3:

SEQ ID N°:3.

2. Anticorpo terapêutico ou seu fragmento de ligação a antígeno de acordo com a reivindicação 1, que compreende as seguintes CDR:

CDRH1: SEQ ID N°:1,

CDRH2: SEQ ID N°:2,

CDRH3: SEQ ID N°:3,

CDRL1: SEQ ID N°:4,

CDRL2: SEQ ID N°:5 e

CDRL3: SEQ ID N°:6.

3. Anticorpo terapêutico ou seu fragmento de ligação a antígeno de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, em que o anticorpo é um anticorpo intacto.
4. Anticorpo terapêutico ou seu fragmento de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, em que o anticorpo é um anticorpo de rato, murganho, primata ou humano.

5. Anticorpo de murino da reivindicação 4 compreendendo um domínio VH de SEQ ID N°:7 e um domínio VL de SEQ ID N°:8.
6. Anticorpo terapêutico da reivindicação 4 em que o anticorpo é anticorpo humanizado ou quimérico.
7. Anticorpo humanizado da reivindicação 6 compreendendo um domínio VH de SEQ ID N°:11 e um domínio VL de SEQ ID N°:15.
8. Anticorpo humanizado da reivindicação 6 compreendendo um domínio VH de SEQ ID N°:12 e um domínio VL de SEQ ID N°:15.
9. Anticorpo humanizado da reivindicação 6 compreendendo um domínio VH de SEQ ID N°:13 e um domínio VL de SEQ ID N°:15.
10. Anticorpo humanizado da reivindicação 6 compreendendo um domínio VH de SEQ ID N°:14 e um domínio VL de SEQ ID N°:15.
11. Anticorpo humanizado da reivindicação 6 compreendendo um domínio VH de SEQ ID N°:11 e um domínio VL de SEQ ID N°:16.
12. Anticorpo humanizado da reivindicação 6 compreendendo um domínio VH de SEQ ID N°:12 e um domínio VL de SEQ ID N°:16.
13. Anticorpo humanizado da reivindicação 6 compreendendo um domínio VH de SEQ ID N°:13 e um domínio VL de SEQ ID N°:16.
14. Anticorpo humanizado da reivindicação 6 compreendendo um domínio VH de SEQ ID N°:14 e um domínio VL de SEQ ID N°:16.

15. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 6 a 14, em que o anticorpo compreende uma região constante humana.
16. Anticorpo da reivindicação 15, em que o anticorpo compreende uma região constante de isotipo IgG.
17. Anticorpo da reivindicação 16, em que o anticorpo é IgG1 ou IgG4.
18. Anticorpo humanizado da reivindicação 6 compreendendo uma cadeia pesada de SEQ ID N°:18 e uma cadeia leve de SEQ ID N°:22.
19. Anticorpo humanizado da reivindicação 6 compreendendo uma cadeia pesada de SEQ ID N°:19 e uma cadeia leve de SEQ ID N°:22.
20. Anticorpo humanizado da reivindicação 6 compreendendo uma cadeia pesada de SEQ ID N°:20 e uma cadeia leve de SEQ ID N°:22.
21. Anticorpo humanizado da reivindicação 6 compreendendo uma cadeia pesada de SEQ ID N°:21 e uma cadeia leve de SEQ ID N°:22.
22. Anticorpo humanizado da reivindicação 6 compreendendo uma cadeia pesada de SEQ ID N°:18 e uma cadeia leve de SEQ ID N°:23.

23. Anticorpo humanizado da reivindicação 6 compreendendo uma cadeia pesada de SEQ ID N°:19 e uma cadeia leve de SEQ ID N°:23.
24. Anticorpo humanizado da reivindicação 6 compreendendo uma cadeia pesada de SEQ ID N°:20 e uma cadeia leve de SEQ ID N°:23.
25. Anticorpo humanizado da reivindicação 6 compreendendo uma cadeia pesada de SEQ ID N°:21 e uma cadeia leve de SEQ ID N°:23.
26. Fragmento de ligação a antigénio de qualquer das reivindicações 1-4, em que o fragmento é um Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, diacorpo, triacorpo, tetracorpo, minianticorpo, minicorpo, VH isolado, VL isolado.
27. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 25 compreendendo uma região Fc mutada de modo que o referido anticorpo possui ADCC reduzida e/ou activação do complemento.
28. Célula hospedeira recombinante transformada ou transfectada compreendendo um primeiro e um segundo vector, compreendendo o referido primeiro vector um polinucleótido que codifica uma cadeia pesada de um anticorpo de acordo com qualquer reivindicação anterior e compreendendo o referido segundo vector um polinucleótido que codifica uma cadeia leve de um anticorpo de acordo com qualquer reivindicação anterior.

29. Célula hospedeira da reivindicação 28, em que o primeiro vector compreende um polinucleótido de SEQ ID N°:7 e um segundo vector compreende um polinucleótido de SEQ ID N°:8.
30. Célula hospedeira da reivindicação 29, em que o primeiro vector compreende um polinucleótido seleccionado do grupo consistindo em SEQ ID N°: 26, SEQ ID N°:27. SEQ ID N°:28, SEQ ID N°:29, SEQ ID N°:32, SEQ ID N°:33, SEQ ID N°:34, SEQ ID N°:35 e um segundo vector compreendendo um polinucleótido seleccionado do grupo consistindo em SEQ ID N°:15, SEQ ID N°:16, SEQ ID N°:36, SEQ ID N°:37.
31. Célula hospedeira de qualquer das reivindicações 28 a 30, em que a célula é eucariótica.
32. Célula hospedeira da reivindicação 31, em que a célula é de mamífero.
33. Célula hospedeira da reivindicação 31 em que a célula é CHO ou NS0.
34. Método para a produção de um anticorpo terapêutico de qualquer uma das reivindicações 1 a 27, cujo método compreende o passo de cultivar uma célula hospedeira de qualquer uma das reivindicações 28 a 33 num meio de cultura isento de soro.
35. Método da reivindicação 34, em que referido anticorpo é secretado pela referida célula hospedeira no referido meio de cultura.

36. Método da reivindicação 35, em que o referido anticorpo é ainda purificado em, pelo menos, 95% ou superior no que se refere ao referido anticorpo contendo meio de cultura.
37. Composição farmacêutica compreendendo um anticorpo terapêutico ou seu fragmento de ligação a antigénio de qualquer uma das reivindicações 1 a 27 e um veículo farmaceuticamente aceitável.
38. Anticorpo terapêutico ou seu fragmento de ligação a antigénio de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 27 para utilização no tratamento de uma doença ou distúrbio seleccionada do grupo consistindo em; Asma alérgica, asma grave, asma difícil, asma súbita, asma nocturna, asma pré-menstrual, asma resistente a esteróides, asma dependente de esteróides, asma induzida por aspirina, asma inicial em adulto, asma pediátrica, dermatite atópica, rinite alérgica, doença de Crohn, COPD, doenças fibróticas ou distúrbios, tais como fibrose pulmonar idiopática, esclerose sistémica progressiva, fibrose hepática, granulomas hepáticos, equistossomíase, leishmaniose, doenças de regulação do ciclo celular, tais como doença de Hodgkins, leucemia linfocítica crónica de células B.
39. Utilização de um anticorpo terapêutico ou seu fragmento de ligação a antigénio de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 27 para a preparação de um medicamento para o tratamento de uma doença ou distúrbio seleccionada do grupo consistindo em; Asma alérgica, asma grave, asma difícil, asma súbita, asma nocturna, asma pré-menstrual, asma resistente a esteróides, asma dependente de esteróides,

asma induzida por aspirina, asma inicial em adulto, asma pediátrica, dermatite atópica, rinite alérgica, doença de Crohn, COPD, doenças fibróticas ou distúrbios, tais como fibrose pulmonar idiopática, esclerose sistémica progressiva, fibrose hepática, granulomas hepáticos, equistossomíase, leishmaniose, doenças de regulação do ciclo celular, tais como doença de Hodgkins, leucemia linfocítica crónica de células B.

40. Anticorpo terapêutico de acordo com qualquer reivindicação anterior que especificamente liga-se a hIL-13 e possui uma constante de dissociação k_{off} no intervalo $1,4 \times 10^{-4}$ a $8,22 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$.
41. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 27 e um anticorpo monoclonal anti-IL-4, tal como pascolizumab para utilização no tratamento de uma doença ou distúrbio seleccionada do grupo consistindo em; Asma alérgica, asma grave, asma difícil, asma súbita, asma noturna, asma pré-menstrual, asma resistente a esteróides, asma dependente de esteróides, asma induzida por aspirina, asma inicial em adulto, asma pediátrica, dermatite atópica, rinite alérgica, doença de Crohn, COPD, doenças fibróticas ou distúrbios, tais como fibrose pulmonar idiopática, esclerose sistémica progressiva, fibrose hepática, granulomas hepáticos, equistossomíase, leishmaniose, doenças de regulação do ciclo celular, tal como doença de Hodgkins, leucemia linfocítica crónica de células B.
42. Utilização de um anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 27 e um anticorpo monoclonal anti-IL-4,

tal como pascolizumab para a preparação de um medicamento para o tratamento de uma doença ou distúrbio seleccionada do grupo consistindo em; Asma alérgica, asma grave, asma difícil, asma súbita, asma noturna, asma pré-menstrual, asma resistente a esteróides, asma dependente de esteróides, asma induzida por aspirina, asma inicial em adulto, asma pediátrica, dermatite atópica, rinite alérgica, doença de Crohn, COPD, doenças fibróticas ou distúrbios tais como fibrose pulmonar idiopática, esclerose sistémica progressiva, fibrose hepática, granulomas hepáticos, equistossomíase, leishmaniose, doenças de regulação de ciclo celular, tais como doença de Hodgkins, leucemia linfocítica crónica de células B.

43. Utilização da reivindicação 41 ou 42 em que o anticorpo monoclonal anti-IL-4 é administrado simultaneamente, sequencialmente ou separadamente com o anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 27.
44. Utilização da reivindicação 41 a 43 em que o anticorpo anti-IL-4 é pascolizumab.
45. Composição farmacêutica compreendendo um primeiro anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 27 e um segundo anticorpo em que o referido segundo anticorpo é um anticorpo anti-IL-4, tal como pascolizumab e um veículo farmacêuticamente aceitável.

Lisboa, 24 de Fevereiro de 2012

FIGURA 1

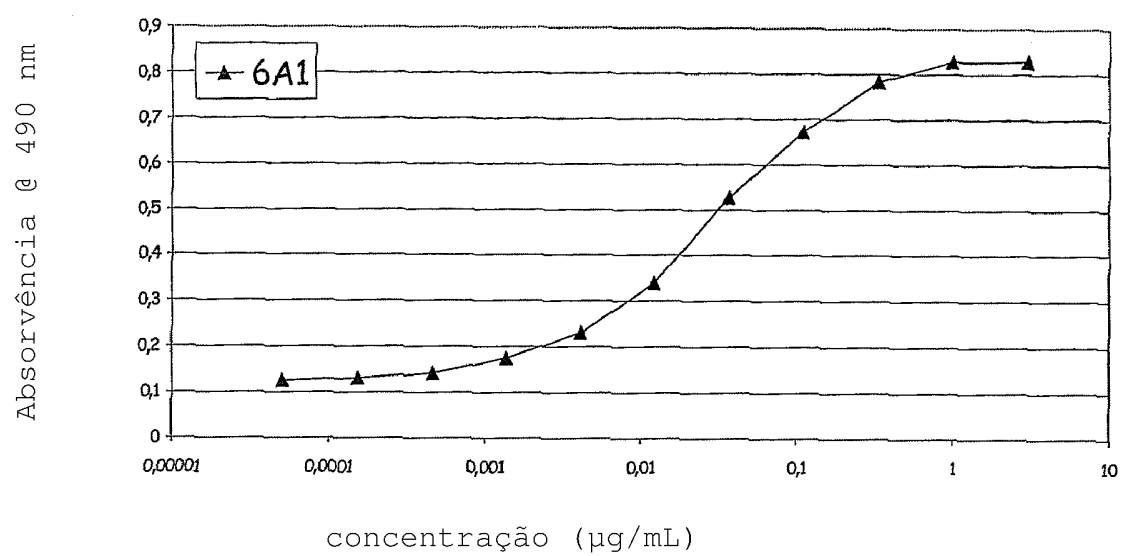


FIGURA 2a

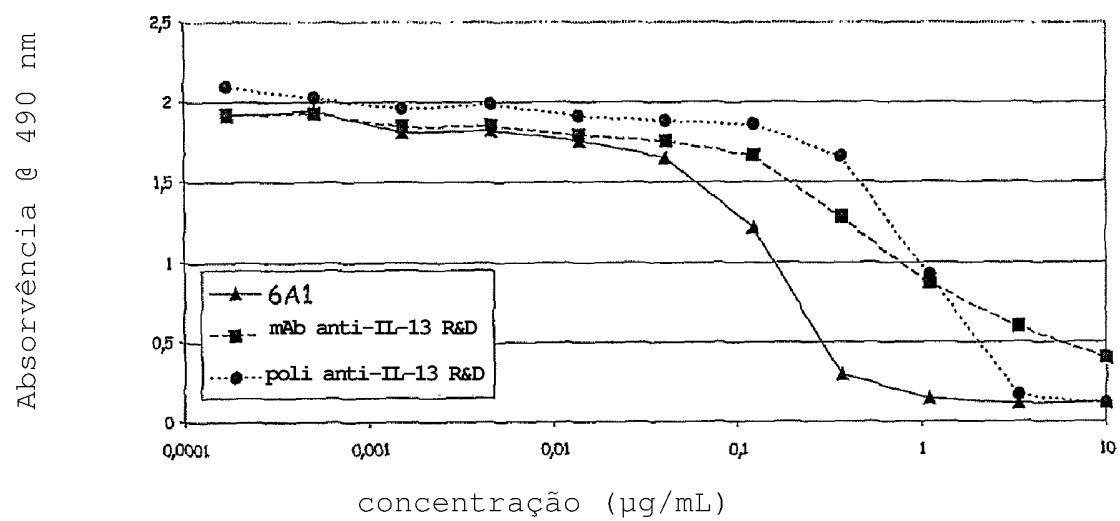


FIGURA 2b

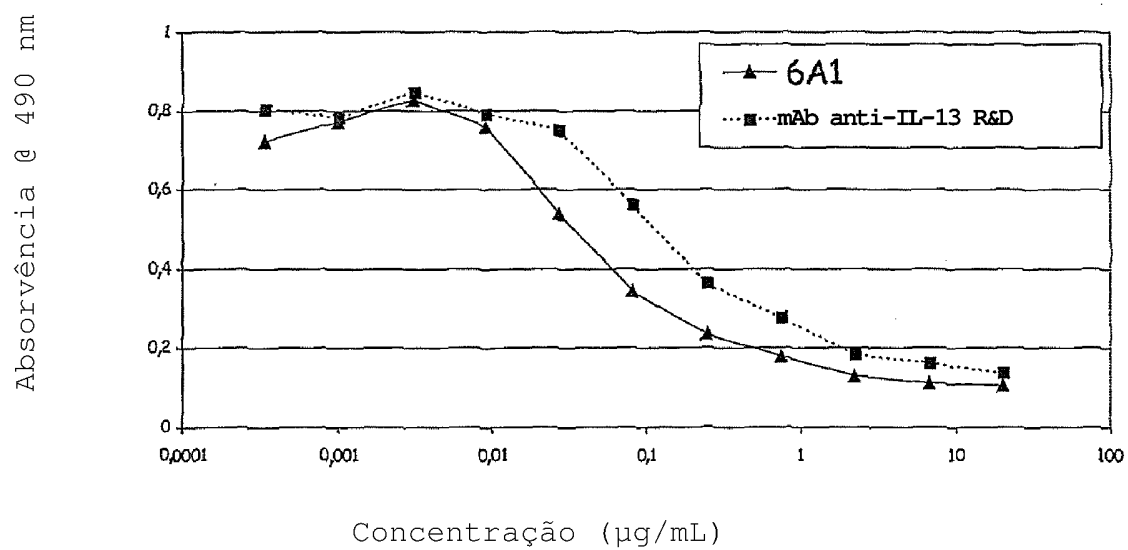


FIGURA 3

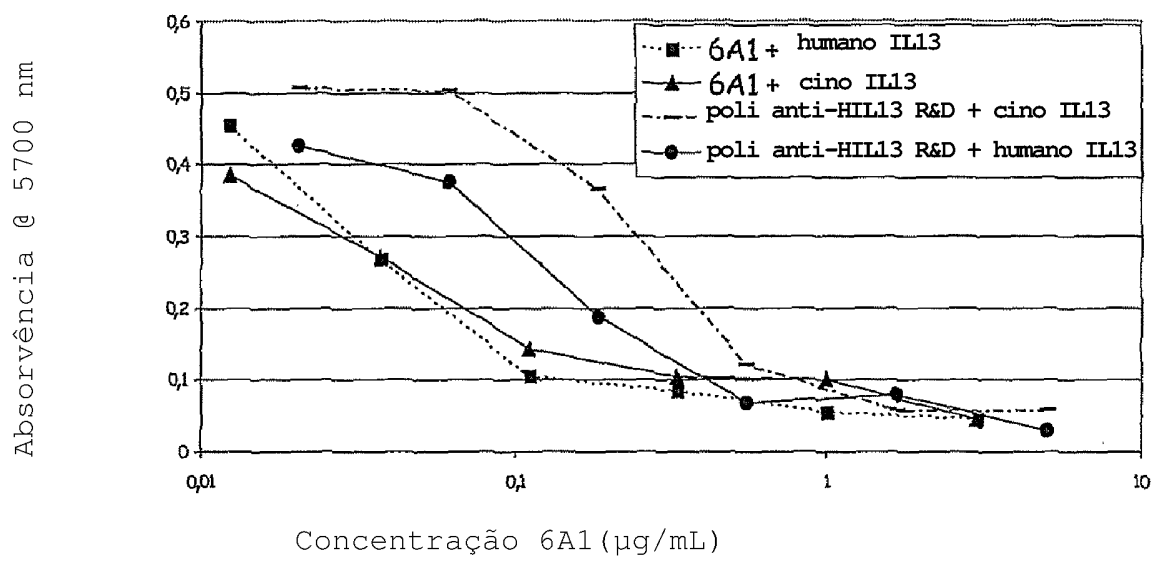


FIGURA 4

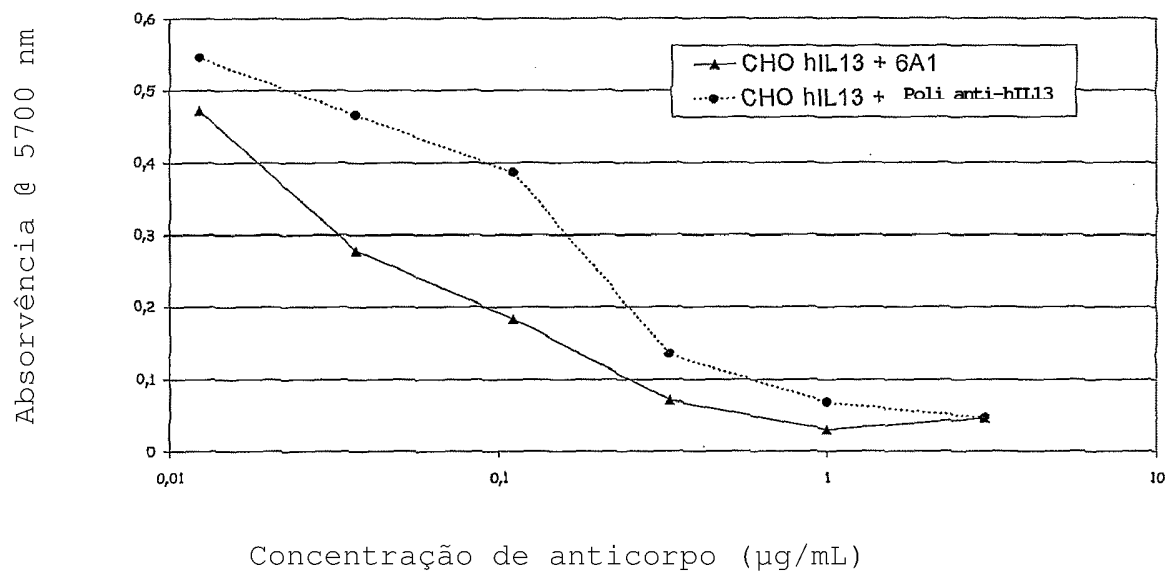


FIGURA 5

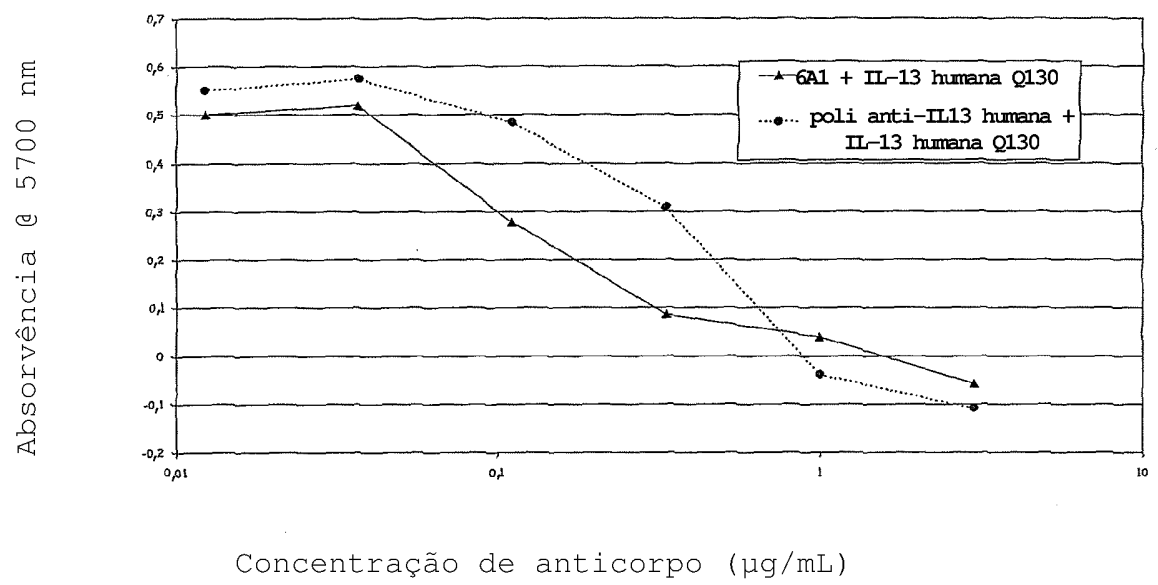


FIGURA 6

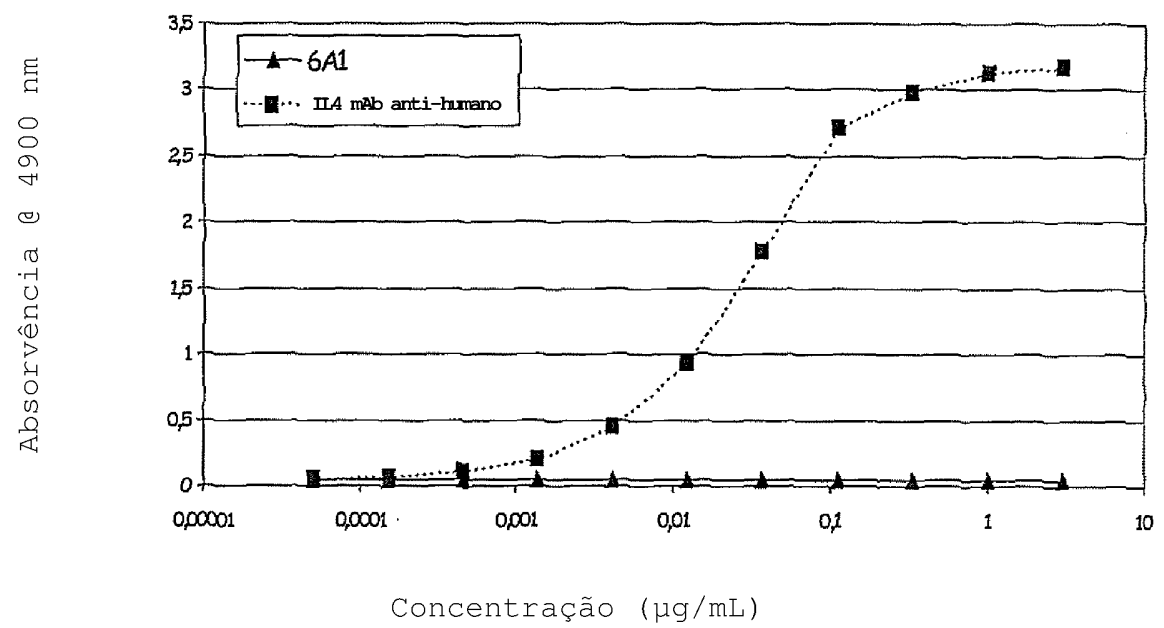


FIGURA 7

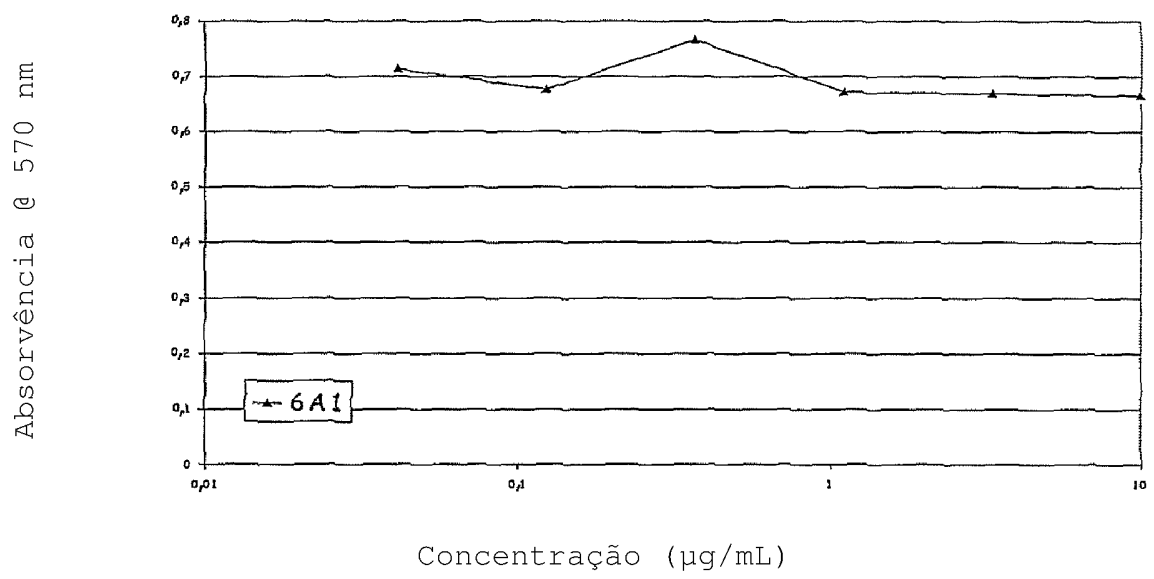


FIGURA 8

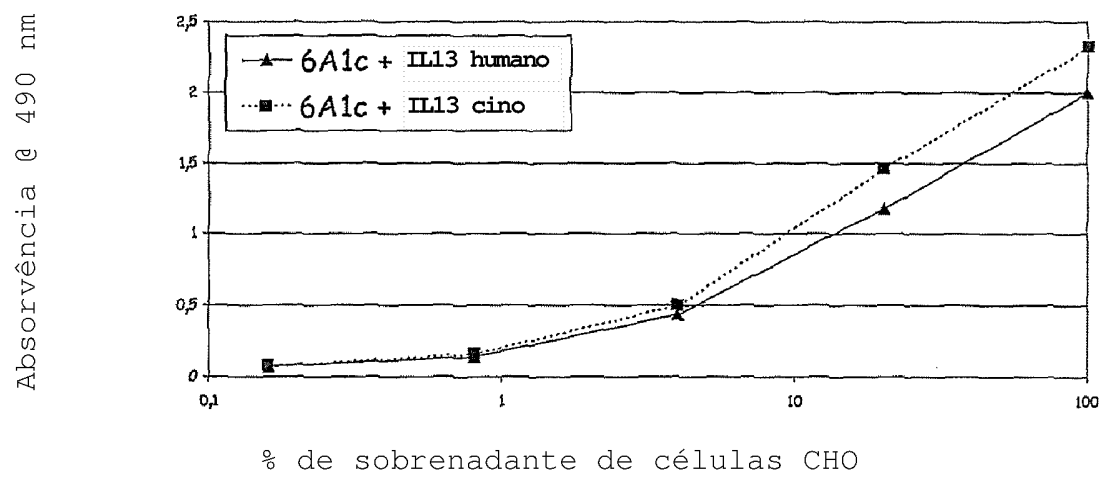


FIGURA 9

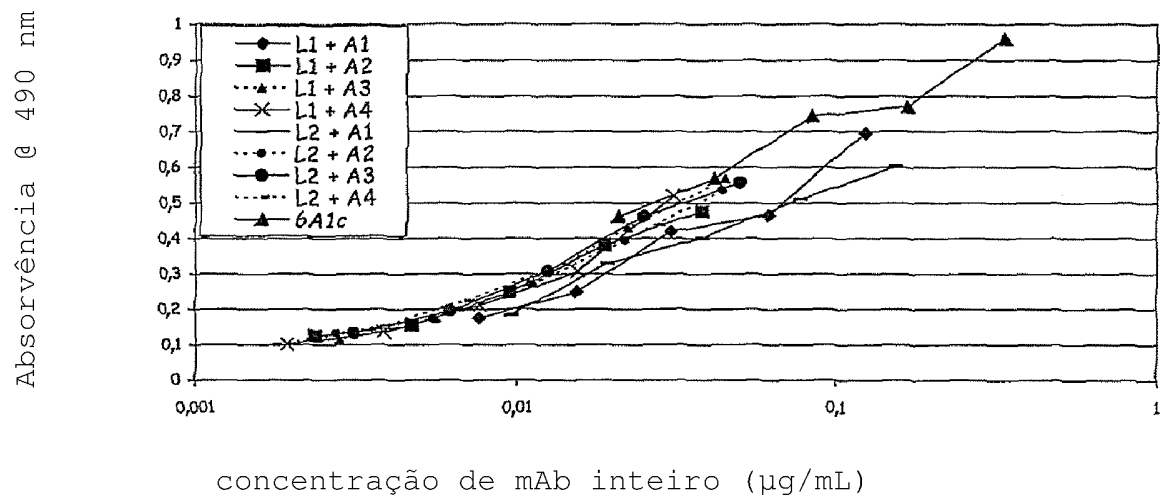


FIGURA 10a

Absorvência @ 490 nm

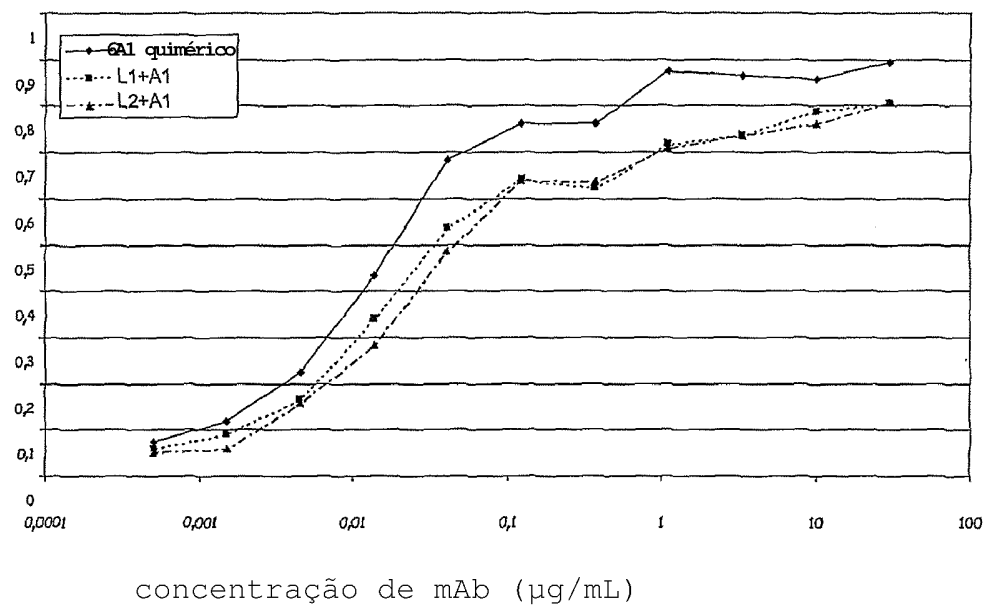


FIGURA 10b

Absorvência @ 490 nm

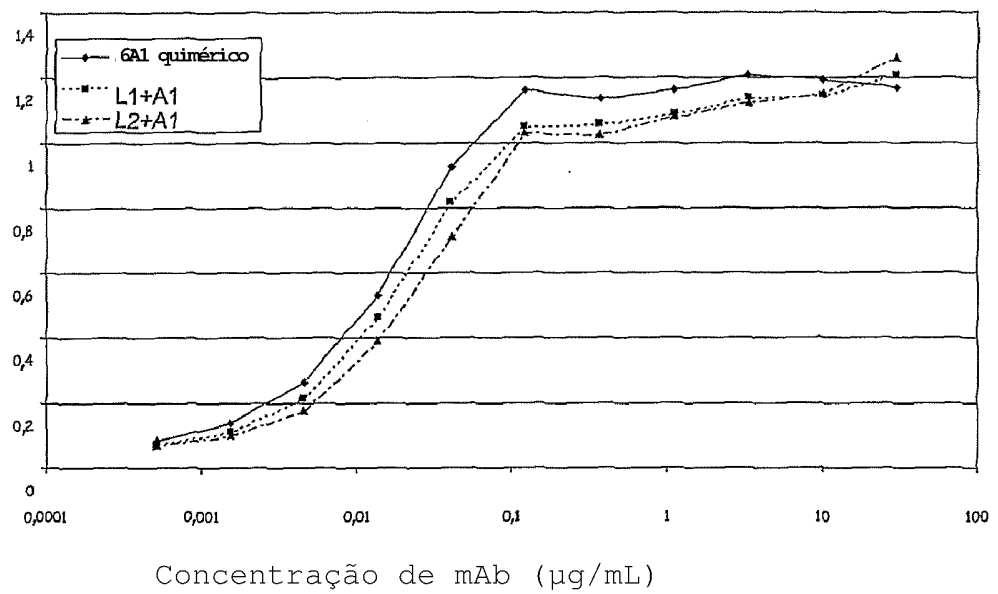


FIGURA 11

Absorvência @ 490 nm

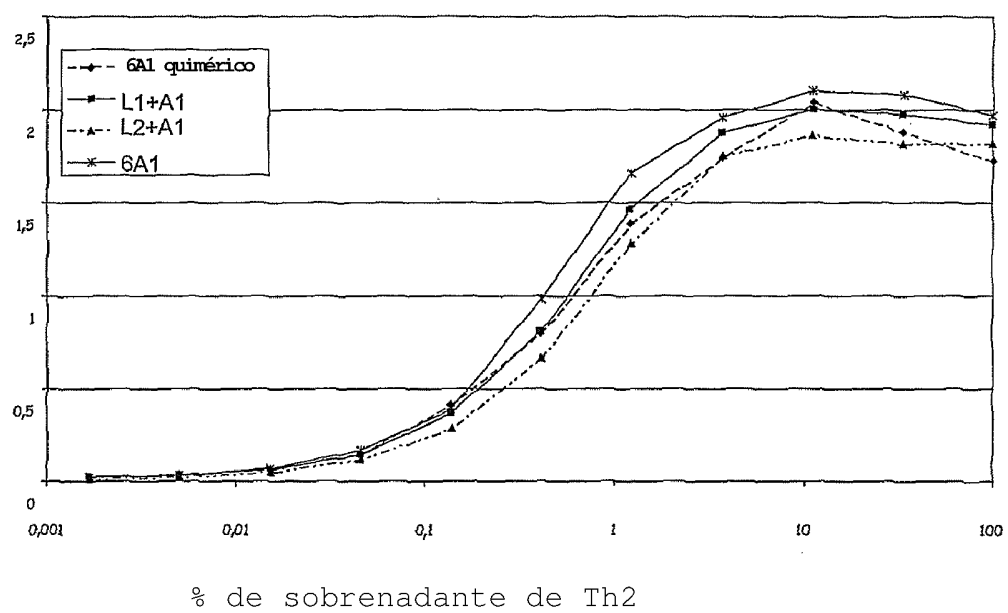


FIGURA 12a

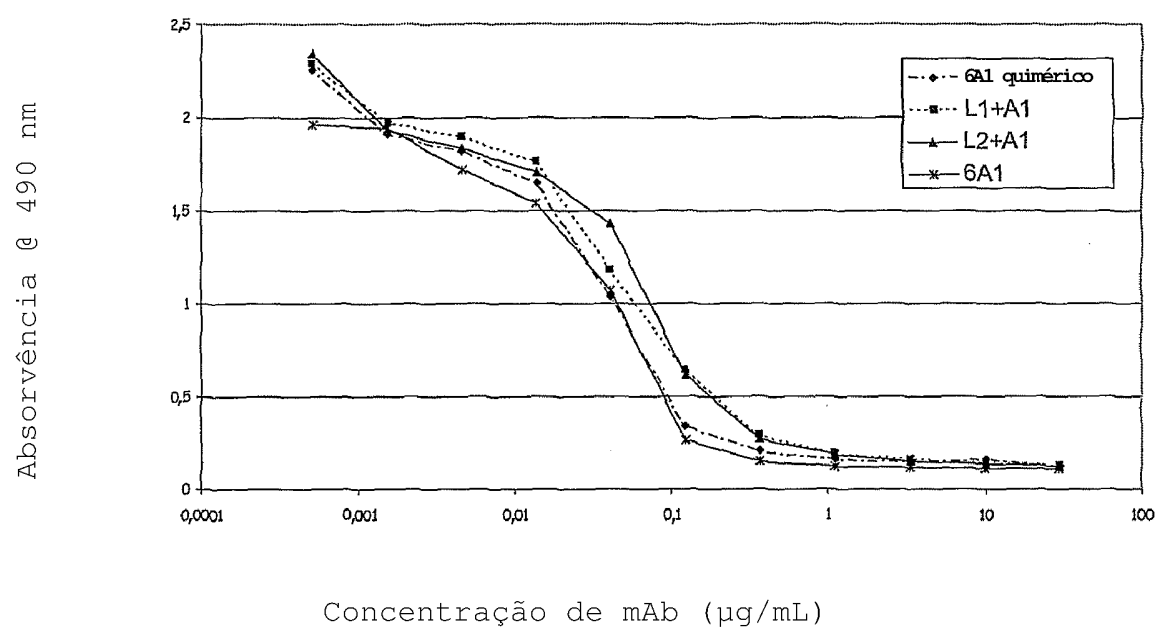


FIGURA 12b

Absorvência @ 490 nm

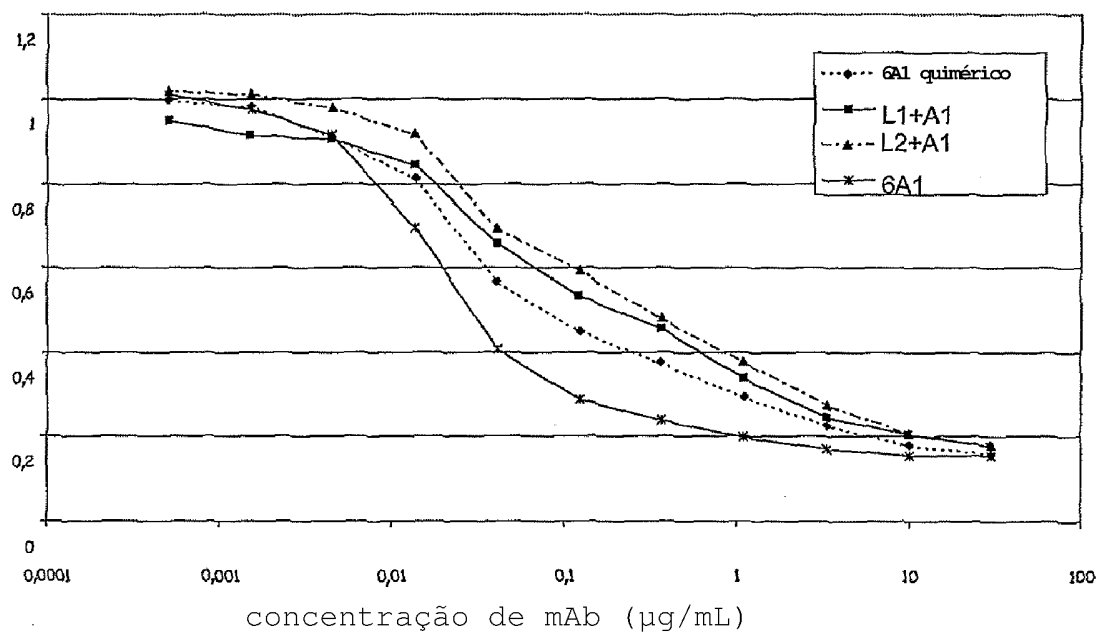


FIGURA 13a

Absorvência @ 570 nm

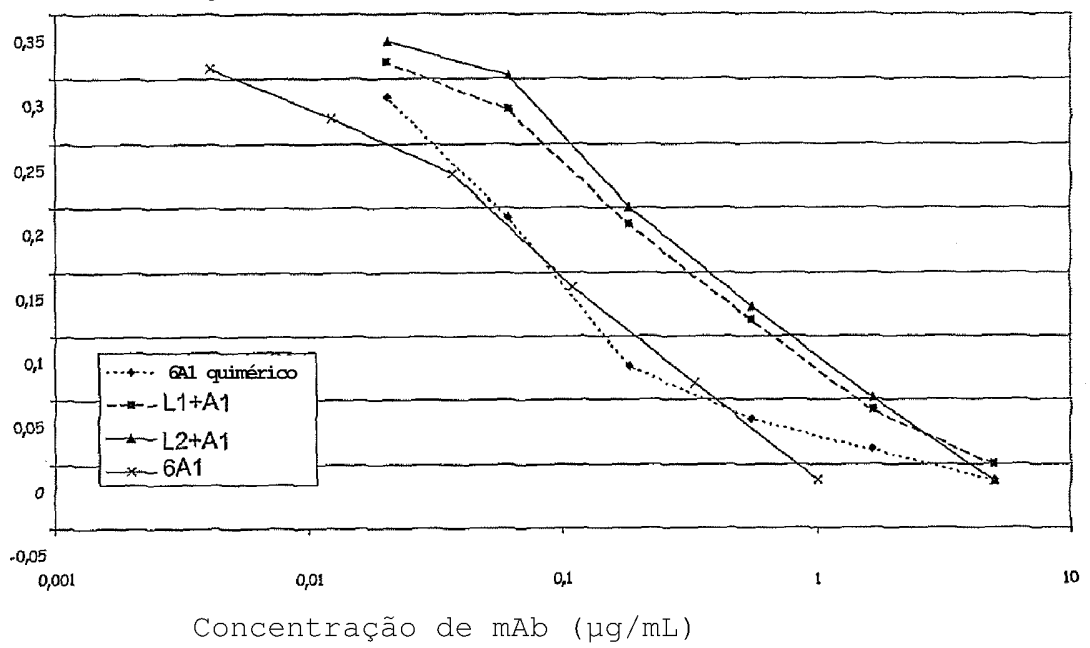


FIGURA 13b

Absorvência @ 570 nm

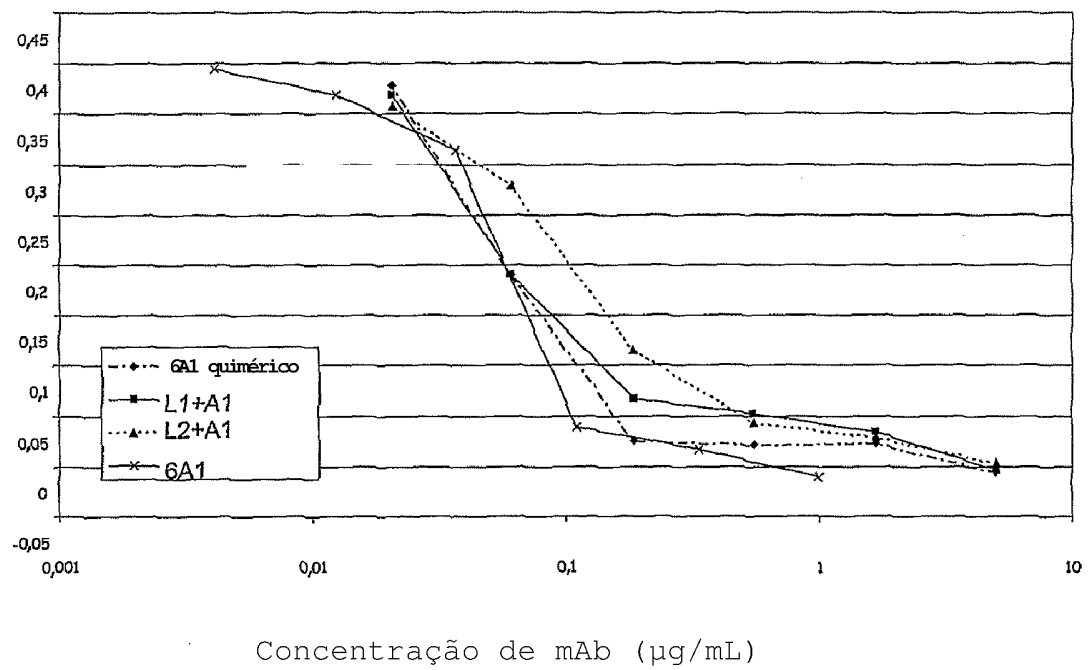


FIGURA 13c
Absorvência @ 570 nm

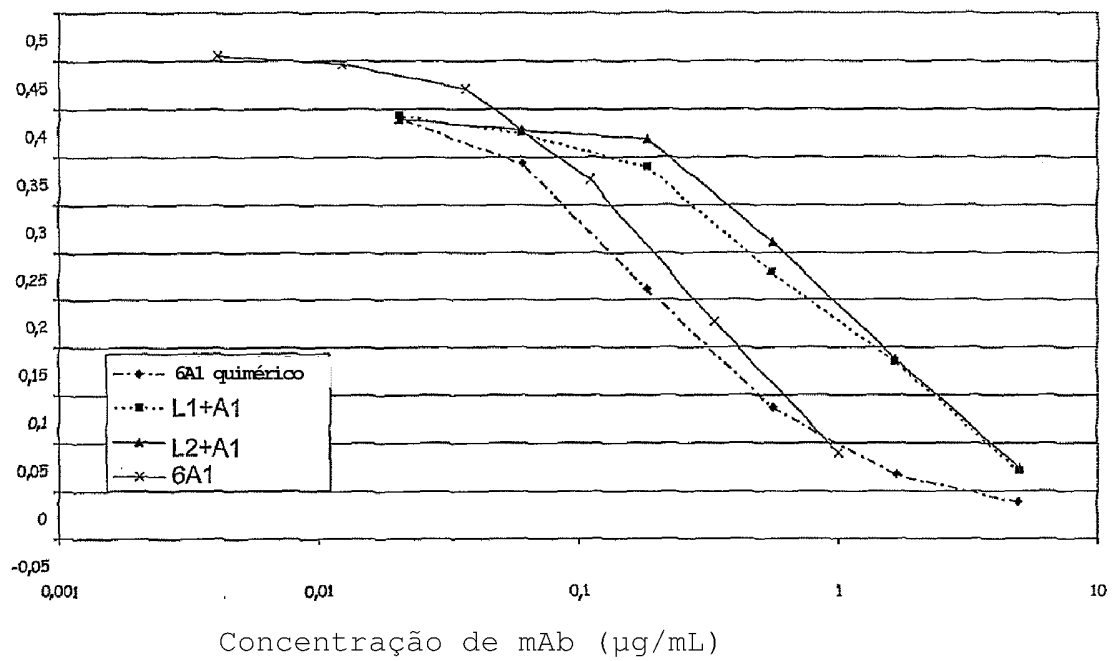


FIGURA 13d
Absorvência @ 570 nm

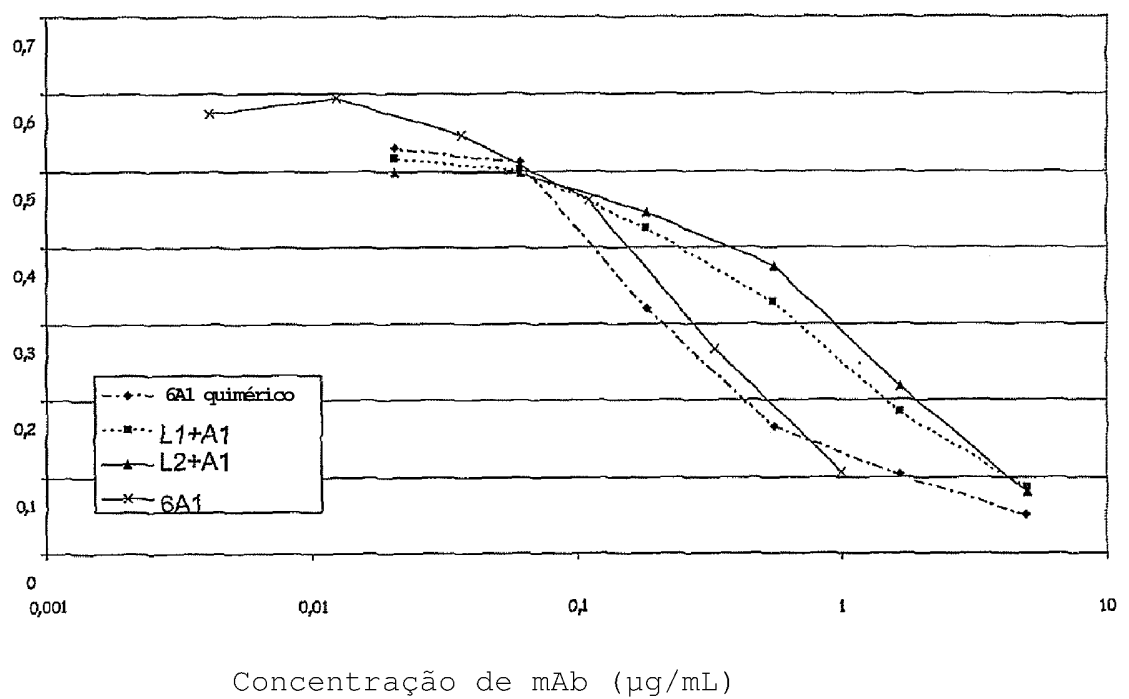


FIGURA 14a

Absorvência @ 490 nm

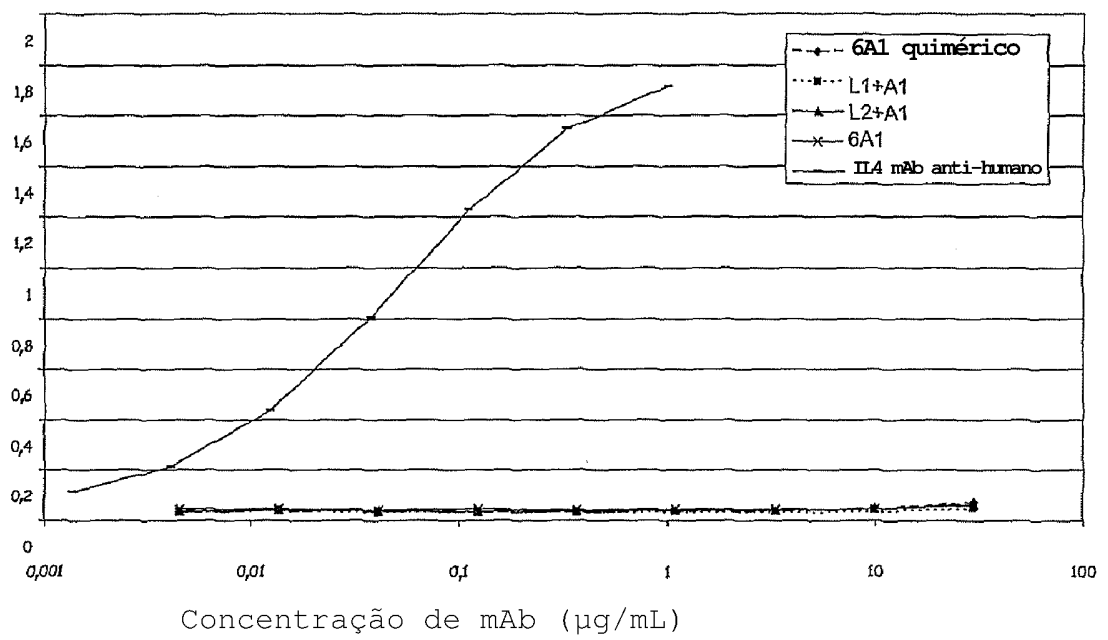


FIGURA 14b
Absorvência @ 490 nm

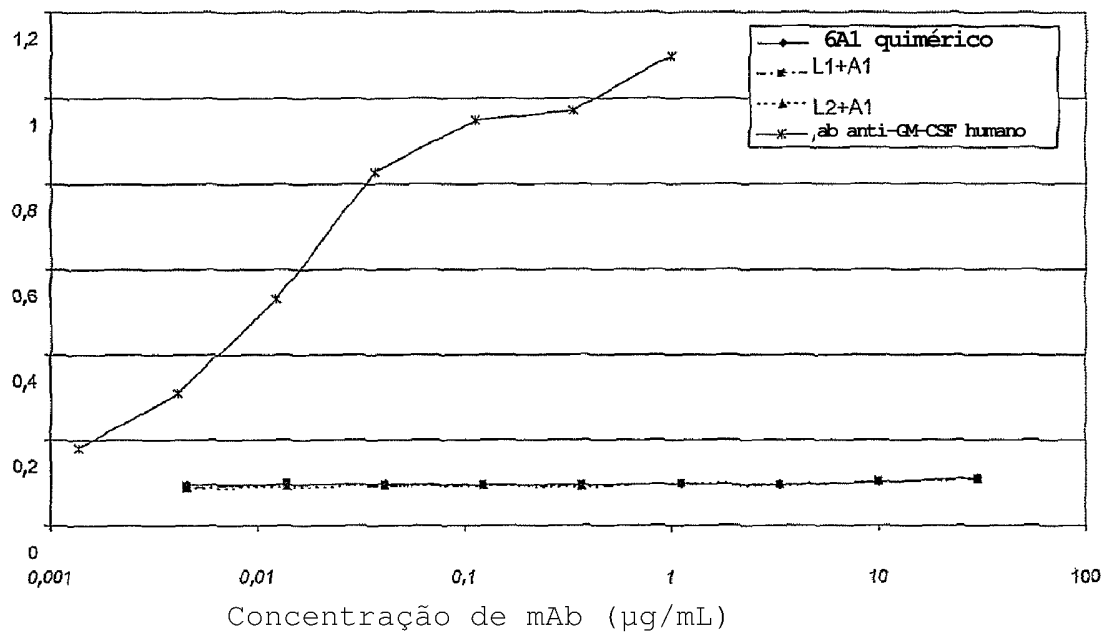


FIGURA 14c
Absorvência @ 570 nm

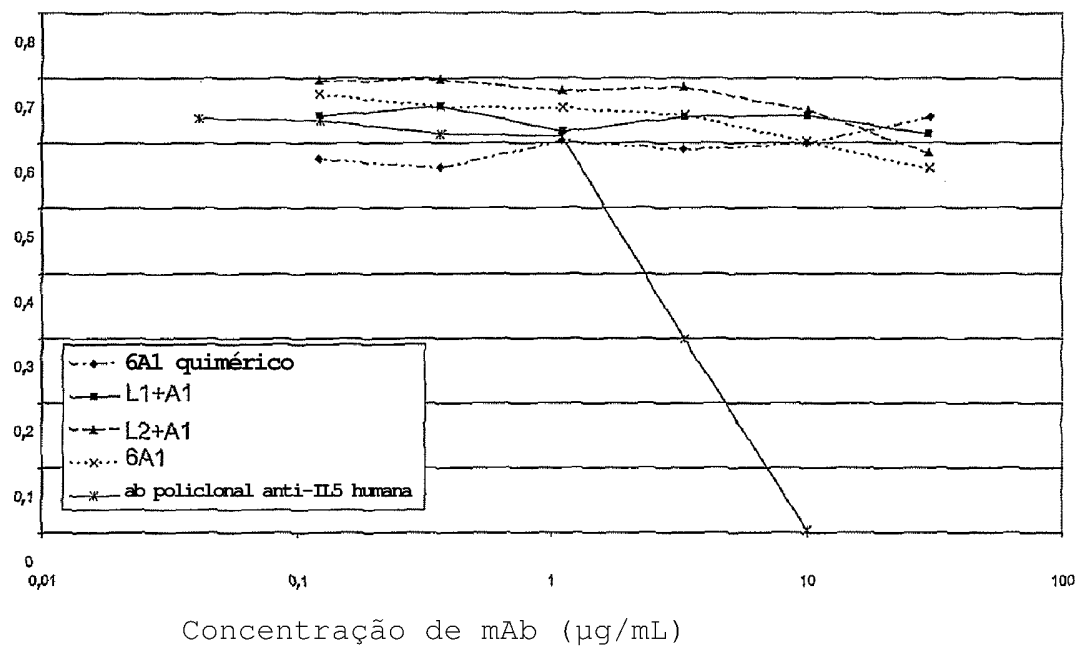


FIGURA 15

Absorvência média a 490 nm

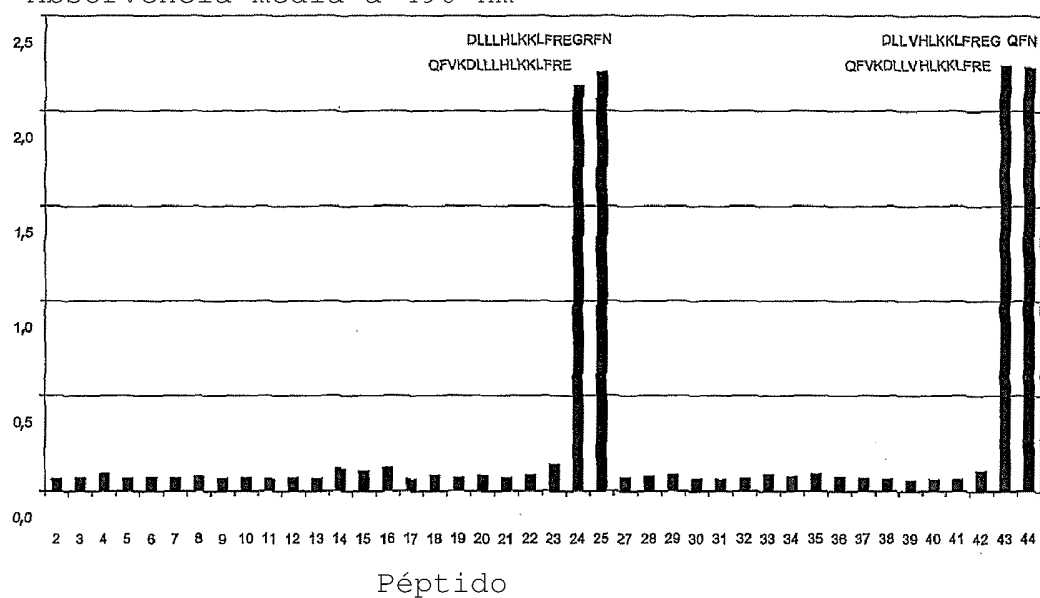


FIGURA 16a

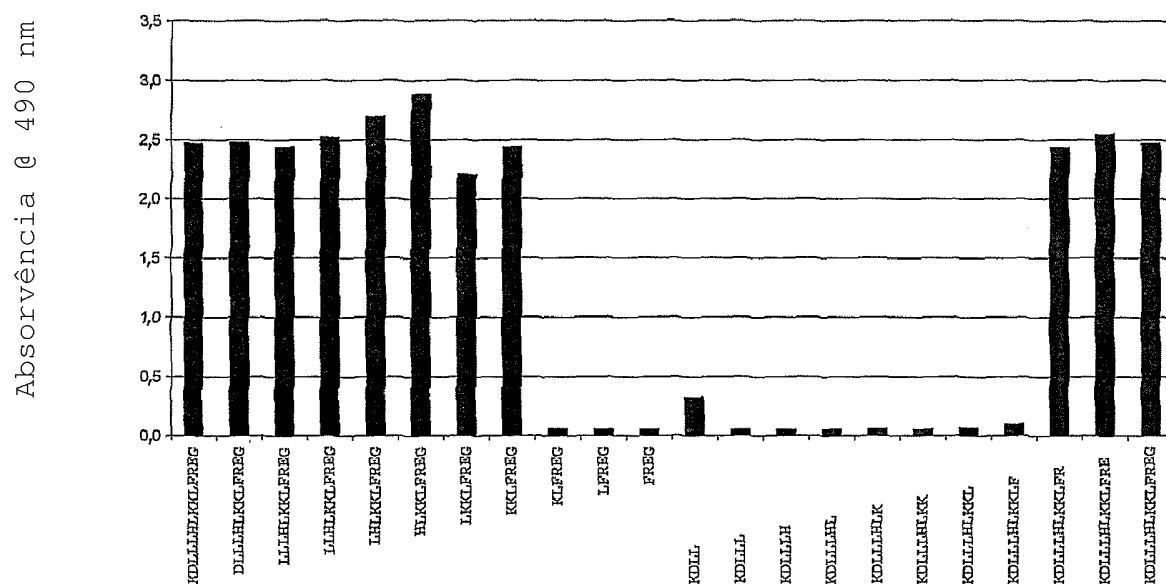


FIGURA 16b

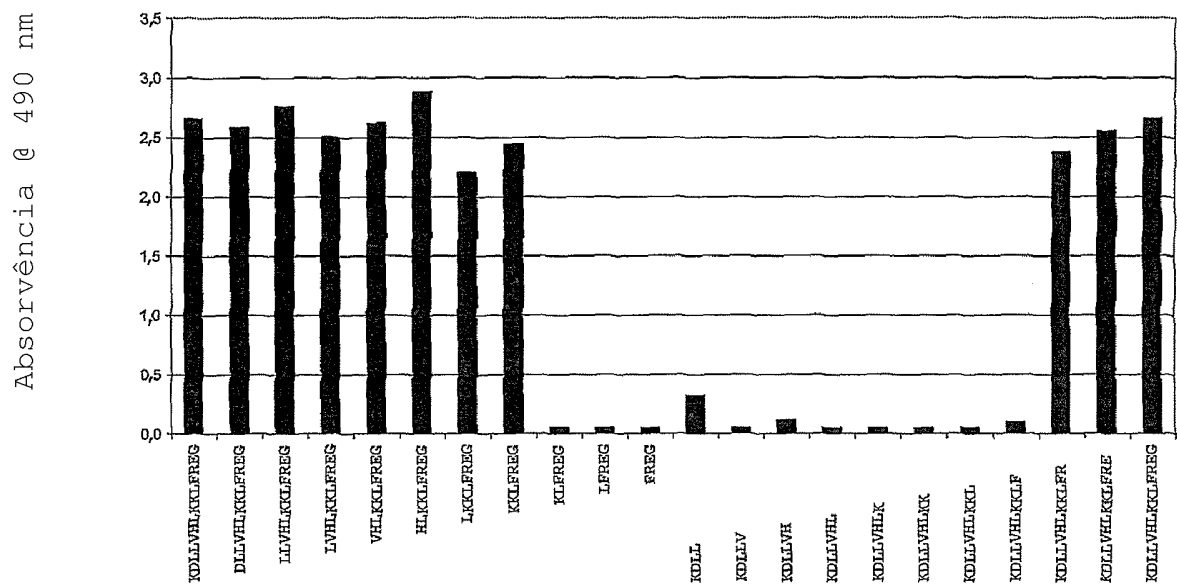


FIGURA 17a

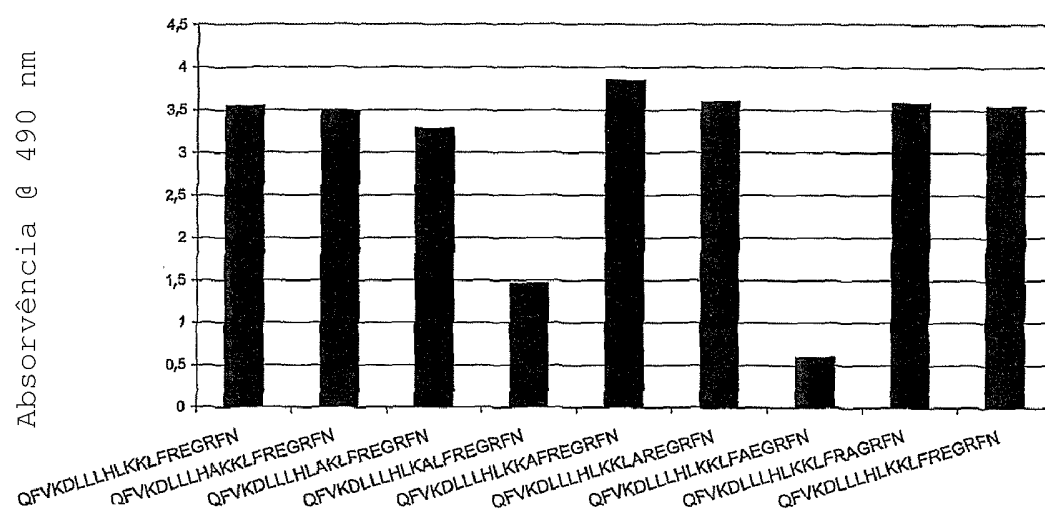


FIGURA 17b

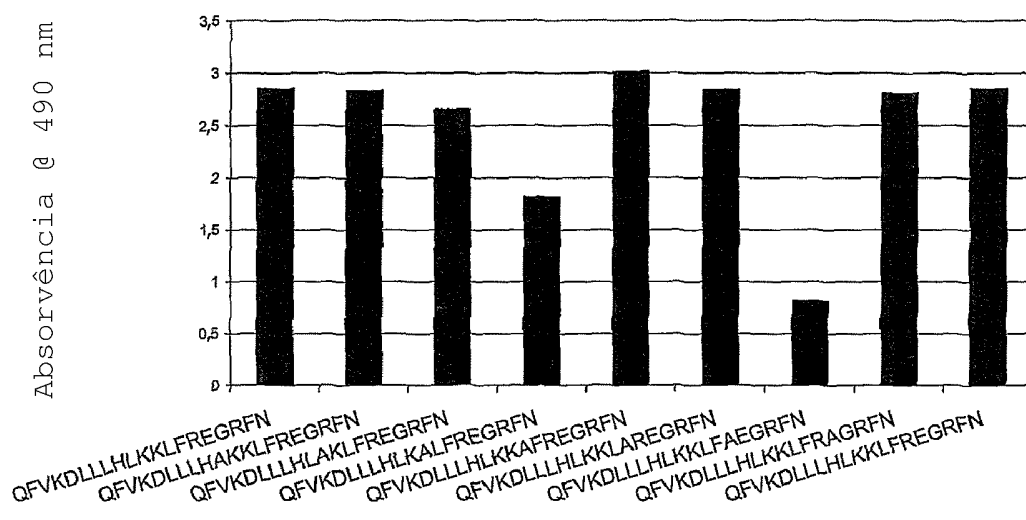


FIGURA 17c

Absorvência @ 490 nm

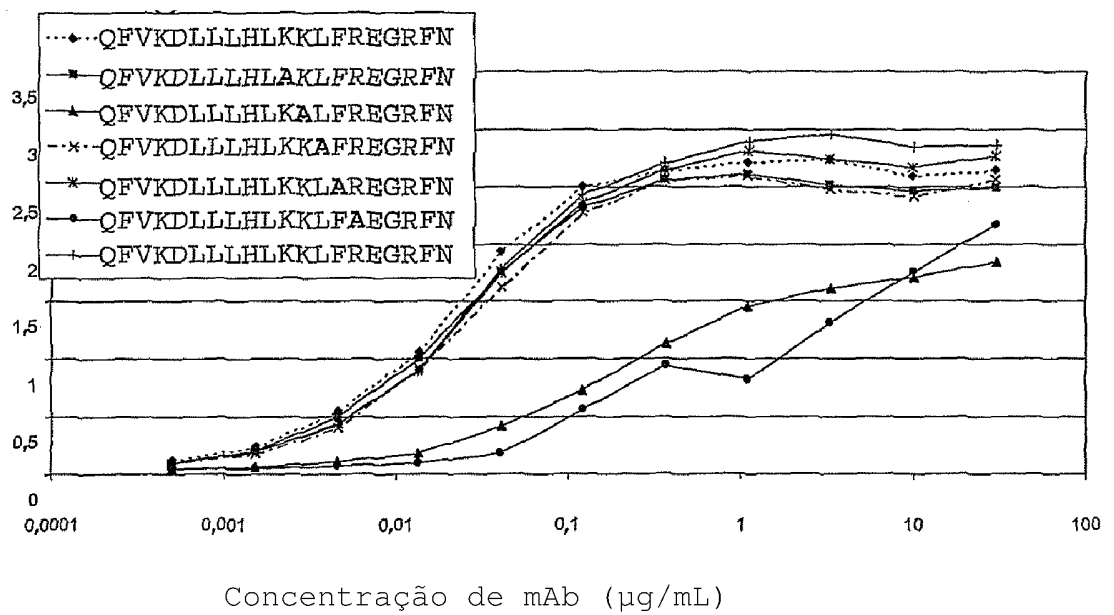


FIGURA 17d

