

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 404 058**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2007 E 07722882 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012 EP 1991583**

54 Título: **Anticuerpos para la linfopoyetina estromal tímica (TSLP) y usos de la misma**

30 Prioridad:

23.02.2006 GB 0603683

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

23.05.2013

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
LICHTSTRASSE 35
4056 BASEL, CH**

72 Inventor/es:

**BARDROFF, MICHAEL;
EDWARDS, MATTHEW;
TUR, MEHMET y
RATSCH, OLAF**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 404 058 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos para la linfopoyetina estromal tímica (TSLP) y usos de la misma

Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona con los anticuerpos para la linfopoyetina estromal tímica humana (hTSLP) y especialmente con aquéllos que neutralizan la actividad de la hTSLP. Además, se refiere a los métodos para usar las moléculas de los anticuerpos anti-hTSLP para el diagnóstico o tratamiento de las enfermedades relacionadas con la hTSLP como el asma, la dermatitis atópica, la rinitis alérgica, la fibrosis, la enfermedad inflamatoria del intestino y el linfoma de Hodgkin.

Antecedentes de la invención

10 La linfopoyetina estromal tímica humana (hTSLP) (Número de acceso Genbank: NM_033035), una citoquina parecida a la interleucina (IL-7), que es producida por las células cebadas y el estroma epitelial humano, inicia la respuesta antialérgica mediante la estimulación de las células dendríticas (DC)¹. La proteína de 159 aminoácidos deducida es 43 por ciento idéntica a la TSLP de ratón, contiene una secuencia de señales de 28 residuos, 6
15 cisteínas y 2 sitios de N-glicosilación supuesta. El análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio original, (SDS-PAGE) mostró la expresión de una proteína de 23 kilo-dáltones (kDa), mientras que la masa molecular calculada de la proteína madura es de 14,9 kDa, sugiriendo que la hTSLP es glucosilada. La hTSLP contiene 7 aminoácidos (aa) terminados en C básicos N-Lisina-Lisina-Arginina-Arginina-Lisina-Arginina-Lisina-C (KKRRKRK) y 6 cisteínas probablemente participantes en la formación del enlace de disulfuro.

20 La hTSLP es altamente expresada por las células epiteliales de las amígdalas inflamadas y los queratinocitos de la dermatitis atópica y su expresión se asocia con la migración y la activación de las células de Langerhans².

El complejo receptor de la TSLP es un heterodímero compuesto del receptor de la TSLP (TSLPR) y la cadena alfa del receptor IL-7 (IL-7 Ra). El receptor se expresa principalmente en los monocitos y en las células dendríticas derivadas de mieloides, así como sobre los linfocitos B³.

25 La alergia es el resultado de una cascada inmune compleja que conduce a la producción desreglada del subconjunto tipo 2 de las células ayudantes derivadas del Timo (Th2) de las citoquinas del linfocito, la generación de linfocitos B que producen las IgE específicas del alérgeno y la posterior activación y desgranulación de las células cebadas después del estímulo alérgico.

30 Las células dendríticas representan un papel importante en distintos modelos de alergia durante los cuales las células dendríticas humanas activadas por la TSLP producen la quimiocina que atrae a las Th2 pero no a la IL-12 e inducen la diferenciación del linfocito T positivo para el antígeno de CD4 y CD8 natural en las células efectoras con un fenotipo proalérgico típico.

35 La dermatitis atópica (AD) representa una enfermedad inflamatoria de la piel, recurrente, crónica con aspectos clínicos característicos⁴. Los antecedentes genéticos, las exposiciones ambientales, tales como los alérgenos de los alimentos, a los aeroalérgenos, a los antígenos microbianos, o al estrés y distintas predisposiciones inmunológicas contribuyen al desarrollo de las lesiones de la piel eczematosas con prurito, periódicas, en los pacientes afectados. Se han mostrado varios factores solubles aumentados en la sangre periférica de los pacientes con dermatitis atópica. Estas citoquinas y quimiocinas representan un papel importante para regular la diferenciación, la activación y la migración de las células dendríticas y son importantes para coordinar el tráfico de las células inmunes. La
40 hTSLP que se produce mediante el estroma epitelial humano y las células cebadas, inicia la respuesta alérgica mediante la estimulación de las células dendríticas. Las células dendríticas cultivadas con la TSLP producen las quimiocinas CC que inducen la quimotaxis y la polarización de los linfocitos efectores específicos del alérgeno. La TSLP derivada de las células estromales y epiteliales representan uno de los factores que inician las respuestas alérgicas y podría ser un objetivo para un enfoque terapéutico curativo para la alergia.

45 En estudios recientes, se describió un anticuerpo policlonal anti-TSLP de humano (R&D Systems, AF1398). Este anticuerpo se produjo en ovejas inmunizadas con TSLP recombinante derivada de *E. Coli* purificada. La IgG de oveja específica para la TSLP humana se purificó mediante cromatografía por afinidad con la hTSLP. Se seleccionó este anticuerpo policlonal por su capacidad para neutralizar la actividad biológica de la hTSLP y mostró menos de 1 por ciento de reactividad cruzada con la TSLP murina recombinante. La dosis de neutralización₅₀ (ND₅₀) para este anticuerpo se define como la concentración de anticuerpos requerida para producir la mitad de la inhibición máxima de la actividad de la hTSLP recombinante sobre las células BaF/3 de ratón de la línea celular responsiva co-transfectadas con cadenas de IL-7Ra y hTSLPR, como una prueba. Se determinó que la ND₅₀ era de 0.05 a 0.25 microgramos/mililitro en la presencia de 0.5 nanogramos/mililitro de hTSLP recombinante. La desventaja de los
50

5 anticuerpos policlonales es que están en un suministro limitado ya que hay un suministro restringido de suero del mismo animal tratado. En adición, los anticuerpos policlonales reconocen múltiples epitopos sobre el mismo antígeno y pueden tener reactividad cruzada no deseada. Aunque el suero policlonal contiene una mezcla de enlazantes de afinidad tanto alta como baja, alcanzando también una variedad de epitopos, un enfoque de anticuerpo monoclonal asegura seleccionar el candidato más útil para un uso terapéutico.

10 Los anticuerpos policlonales derivados de animales cuando se inyectan en humanos constituyen una proteína extraña en un anfitrión humano, frecuentemente provocan una respuesta de antiglobulina debido a su inmunogenicidad en humanos. Esta respuesta de antiglobulina, que predominantemente se dirige contra los dominios constantes de los anticuerpos de animal, usualmente dificulta el tratamiento después de la administración repetida.

Soumelis y colaboradores enseñan el posible papel de TSLP en inflamación alérgica (asma, dermatitis atópica y rinitis alérgica) en la que la TSLP se bloqueó mediante los mAbs de rata neutralizantes anti-TSLP de humano 5E5 y 12F3 comercialmente disponibles.

15 Finalmente, el documento WO03065985 da a conocer antagonistas, tales como un anticuerpo o un fragmento del mismo, contra TSLP (denominado en el mismo ILB50) para el tratamiento de inflamaciones alérgicas como asma, dermatitis atópica. El documento WO03065985, que se refiere a Soumelis y colaboradores y los anticuerpos dados a conocer en el mismo, describe qué regiones de TSLP podrían proporcionar un aumento de antigenicidad para generar un anticuerpo.

Sumario de la invención

20 La invención proporciona un anticuerpo humano o humanizado aislado o un fragmento funcional del mismo de acuerdo con la reivindicación 1.

En una modalidad, el anticuerpo aislado es una IgG1, IgG2 o una IgG4.

25 En otra modalidad, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende anticuerpos o fragmentos funcionales tal como se describe en el presente documento y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable para los mismos.

En una modalidad de la presente invención, el anticuerpo es una IgG1 que tiene una secuencia lambda de cadena ligera seleccionada de SEQ ID NO: 99 o SEQ ID NO: 101, y una secuencia de cadena pesada seleccionada de SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111 y SEQ ID NO: 113.

30 En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un polinucleótido recombinante o aislado que codifica un polipéptido que comprende una región de enlace con antígeno de un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo descrito anteriormente.

En una modalidad el polinucleótido es un ADN.

35 En otro aspecto de la presente invención se proporciona una célula huésped que comprende un primer y un segundo segmento de ADN recombinante que codifican una cadena pesada y una cadena ligera, respectivamente, del anticuerpo descrito anteriormente; en donde los segmentos de ADN están respectivamente de manera operativa enlazados a un primer y un segundo promotor y son capaces de expresarse en dicha célula huésped.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 describe el vector de expresión pMORPH[®]X9_Fab_FH de HuCAL[®] Fab (transportando el Fab MOR04494 anti-TSLP) F.

Descripción detallada de la invención

45 La presente invención se relaciona con los anticuerpos aislados, particularmente los anticuerpos humanos, que se enlazan específicamente a la hTSLP y que inhiben las propiedades funcionales de la hTSLP. En ciertas modalidades, los anticuerpos de la invención se derivan de las secuencias de cadenas pesadas y ligeras particulares y/o comprenden características estructurales particulares tales como las regiones CDR que comprenden secuencias de aminoácidos particulares. La invención proporciona los anticuerpos aislados, los métodos para hacer estos anticuerpos, los inmunoconjugados y las moléculas biespecíficas que comprenden estos anticuerpos y las composiciones farmacéuticas que contienen a los anticuerpos, los inmunoconjugados o las moléculas biespecíficas de la invención. La invención también se relaciona con los métodos para usar los anticuerpos para inhibir una

enfermedad o condición asociada con la presencia de la hTSLP objetiva receptora de las células, por ejemplo, en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria o alérgica, particularmente una condición inflamatoria u obstructiva de las vías respiratorias.

5 Con el fin de que la presente invención se entienda más fácilmente, se definen ciertos términos. Durante toda la descripción detallada se presentan definiciones adicionales.

10 El término "hTSLP" es una referencia a la TSLP humana. La presente invención proporciona los anticuerpos para la TSLP humana, especialmente anticuerpos humanos, que tienen reactividad cruzada con la TSLP de primate no humano, incluyendo la TSLP del cinomolgus y del mono resus. Los anticuerpos de acuerdo con algunas modalidades de la presente invención pueden reconocer una isoforma truncada variante de la TSLP en la cual la proteína termina en la alanina en el residuo 99 dando como resultado que los últimos 60 aminoácidos del término C se supriman y también un solo polimorfismo del nucleótido (SNP) de la TSLP en la cual el residuo cisteína de la posición del aminoácido 90 es reemplazado por tirosina. El término "respuesta inmune" se refiere a la acción de, por ejemplo, los linfocitos, las células que presentan antígeno, las células fagocíticas, los granulocitos, y las macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o el hígado (incluyendo los anticuerpos, las citoquinas y los complementos) que den como resultado un daño selectivo, la destrucción de, o la eliminación desde el cuerpo humano de los patógenos invasores, las células o los tejidos infectados con patógenos, las células cancerosas, o, en los casos de autoinmunidad o inflamación patológica, las células o tejidos humanos normales.

20 Una "senda de transducción de señales" se refiere a la relación bioquímica entre una variedad de moléculas de transducción de señales que representan un papel en la transmisión de una señal desde una porción de una célula a otra porción de una célula. Como se usa en la presente, la frase "receptor de la superficie celular" incluye, por ejemplo, las moléculas y los complejos de moléculas capaces de recibir una señal y capaces de la transmisión de esta señal a través de la membrana del plasma de una célula. Un ejemplo de un "receptor de la superficie celular" de la presente invención es el receptor hTSLP al cual se enlaza la molécula de la proteína hTSLP.

25 El término "anticuerpo" al que se hace referencia en la presente incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de enlace de antígeno (es decir, "porción de enlace de antígeno") o cadenas simples del mismo. Un "anticuerpo" que se presenta naturalmente es una glicoproteína que comprende cuando menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta de una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente como V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta de un dominio, C_L. Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones de determinación de la complementariedad (CDR), intercaladas con las regiones que son más conservadas llamadas regiones de entramado (FR). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR acomodadas desde el término amino hasta el término carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de enlace que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar el enlace de la inmunoglobulina para hospedar tejidos o factores, incluyendo distintas células del sistema inmune (por ejemplo, las células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complementos clásico.

40 El término "porción de enlace de antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de antígeno"), como se usa en la presente, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retiene la capacidad de enlazarse específicamente a un antígeno (por ejemplo, a la hTSLP). Se ha demostrado que la función de enlace de antígeno de un anticuerpo se puede realizar por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de los fragmentos de enlace abarcados dentro del término "porción de enlace antígeno" de un anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_H, V_L, C_I y CH1; un fragmento F(ab)₂, un fragmento bivalente que contiene dos fragmentos Fab enlazados por un puente bisulfuro en la región de la articulación; un fragmento Fd que consiste en los dominios de V_H y CH1; un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo; un fragmento dAb (Ward y colaboradores, 1989 Nature 341: 544-546), el cual consiste en un dominio V_H; y una región de determinación de complementariedad (CDR).

50 Además aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H se codifican para genes separados, se pueden unir usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite hacerse como una sola cadena de proteína en la cual las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple (scFv); véase, por ejemplo, Bird y colaboradores, 1988 Science 242: 423-426; y Huston y colaboradores, 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883). Estos anticuerpos de cadena simple también pretenden estar abarcados dentro del término "porción de enlace de antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos son analizados para determinar su utilidad de la misma manera como se hace para los anticuerpos intactos.

Un "anticuerpo aislado", como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de

otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que específicamente enlaza la hTSLP está sustancialmente libre de anticuerpos que específicamente enlazan antígenos distintos de la hTSLP). Sin embargo, un anticuerpo aislado que específicamente enlaza la hTSLP puede tener reactividad cruzada con otros antígenos tales como las moléculas de TSLP de otras especies. Más aún, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos. “Anticuerpo aislado” también se refiere a un anticuerpo para el objetivo que reacciona de manera cruzada con los homólogos/ortólogos conocidos, así como con los anticuerpos para el objetivo que no hacen reacción cruzada con los homólogos/ortólogos conocidos.

Los términos “anticuerpo monoclonal” o “composición de anticuerpos monoclonales” que se usan en la presente, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpos de una sola composición molecular. Una composición de anticuerpos monoclonales exhibe una sola especificidad y afinidad de enlace para un epitopo particular.

El término “anticuerpo humano”, como se usa en la presente, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables en las cuales tanto la región de entramado como las regiones de CDR se derivan de las secuencias de origen humano. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de estas secuencias humanas, por ejemplo, las secuencias de la línea germinal humana, o las versiones mutadas de las secuencias de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir los residuos de los aminoácidos no codificados por las secuencias humanas (por ejemplo, las mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término “anticuerpo humano”, como se usa en la presente, no pretende incluir a los anticuerpos en los cuales las secuencias de las regiones CDR derivadas de la línea germinal de otras especies de mamíferos, tales como un ratón, han sido injertadas sobre las secuencias de entramado humano. Los anticuerpos injertados en CDR, o la tecnología alternativa diseñada para minimizar la respuesta del Anticuerpo Anti-murino Humano (tecnología de humaningeniería de Kalobios, o tecnología de humanización de PDL). Xoma también tiene tecnología de “ingeniería humana”; véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5766886.

El término “anticuerpo monoclonal humano” se refiere a un anticuerpo obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos que reconoce y se enlaza a un determinante (o epitopo) sobre el antígeno. Los anticuerpos monoclonales que exhiben una sola especificidad de enlace que tienen regiones variables en las cuales tanto las regiones de entramado como las regiones CDR se derivan de secuencias humanas. En una modalidad, los anticuerpos monoclonales humanos, se producen mediante un hibridoma el cual incluye una célula B obtenida a partir de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera fusionados a una célula inmortalizada.

El término “anticuerpo humano recombinante”, como se usa en la presente, incluye todos los anticuerpos humanos que son preparados, expresados, creados o aislados mediante medios recombinantes, tales como los anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para los genes de la inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir del mismo, los anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, a partir de un transfectoma, los anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatorios, recombinantes y los anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que implique separar de todo o una porción de un gen de inmunoglobulina humana, secuencias para otra secuencia de ADN. Estos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las cuales la región de entramado y las regiones CDR se derivan de las secuencias de la inmunoglobulina de la línea germinal humana. Sin embargo, en ciertas modalidades, estos anticuerpos humanos recombinantes se pueden someter a una mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para las secuencias de la Ig humana, la mutagénesis somática *in vivo*) y de este modo la secuencia de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se derivan de y se relacionan con las secuencias V_H y V_L de la línea germinal humana, no pueden existir naturalmente dentro del repertorio de la línea germinal de los anticuerpos humanos en vivo.

Como se usa en la presente “isotipo” se refiere a la clase de anticuerpos (por ejemplo, IgM, IgE, IgG tales como IgG1, IgG2 o IgG4) que es codificada por los genes de la región constante de cadena pesada.

Las frases “un anticuerpo que reconoce a un antígeno” y “un anticuerpo específico para un antígeno” se usan de manera intercambiable en la presente con el término “un anticuerpo que se enlaza específicamente a un antígeno”.

Como se usa en la presente, un anticuerpo que “se enlaza específicamente a una hTSLP” pretende referirse a un anticuerpo que se enlaza a la TSLP humana con una K_D de 1x 10⁻⁹ M o menos. Un anticuerpo que “tiene una reacción cruzada con un antígeno distinto de la hTSLP” pretende referirse a un anticuerpo que se enlaza a un antígeno con una K_D de 1 x 10⁻⁹ M o menos. “Un anticuerpo que no tiene reacción cruzada con un antígeno en particular” pretende referirse a un anticuerpo que se enlaza con un antígeno, con una K_D de 1.5 x 10⁻⁸ M o mayor, o una K_D de 5-10 x 10⁻⁷ M o mayor. En ciertas modalidades, estos anticuerpos que no tienen reacción cruzada con el antígeno exhiben esencialmente enlaces indetectables contra estas proteínas en los ensayos de enlace estándares.

Como se usa en la presente, un anticuerpo que "inhibe el enlace de la hTSLP con el receptor de la hTSLP" se refiere a un anticuerpo que inhibe el enlace de la hTSLP con el receptor con una K_D de 5 nM o menos.

5 Como se usa en la presente, un anticuerpo que "inhibe la liberación de mediador inflamatorio" pretende referirse a un anticuerpo que inhibe la expresión de la luciferasa inducida por la hTSLP a partir de una línea celular de Baf-3 transfectada con el receptor TSLP y un sistema reportero de la luciferasa y la secreción de TARC inducida por la hTSLP a partir de monocitos primarios humanos aislados a partir de PBMC con una IC_{50} menor de 1.0 nM.

10 El término " K_{asoc} " o " K_a ", como se usa en la presente, pretende referirse a la tasa de asociación de una interacción particular de anticuerpo-antígeno, mientras que el término " K_{dis} " o " K_D ", como se usa en la presente, pretende referirse a la tasa de disociación de una interacción particular de anticuerpo-antígeno. El término " K_D ", como se usa en la presente, pretende referirse a la constante de disociación, la cual se obtiene a partir de la proporción de K_d contra K_a (es decir, K_d/K_a) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores K_D de los anticuerpos se pueden determinar usando métodos muy bien establecidos en la técnica. Un método para determinar la K_D de un anticuerpo es usando resonancia de plasmón superficial, o usando un sistema biosensor tal como un sistema Biacore®.

15 Como se usa en la presente, el término "alta afinidad" para un anticuerpo IgG se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10^{-9} M o menos para un antígeno objetivo.

Como se usa en la presente, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano.

20 El término "animal no humano" incluye a todos los vertebrados, por ejemplo, a los mamíferos y no mamíferos, tales como los primates no humanos, las ovejas, los perros, los gatos, los caballos, las vacas, los pollos, los anfibios, los reptiles, etcétera.

En las siguientes subsecciones se describen con mayor detalle distintos aspectos de la invención.

25 En la técnica se conocen pruebas estándares para evaluar la habilidad de enlace de los anticuerpos hacia la hTSLP de distintas especies, incluyendo por ejemplo, los ELISA, los western blots y los RIA. Los ensayos convenientes se describen en detalle en los Ejemplos. La cinética del enlace (por ejemplo, la afinidad del enlace) de los anticuerpos también se puede valorar mediante pruebas estándares conocidas en la técnica, tales como el análisis Biacore. Los ensayos para evaluar los efectos de los anticuerpos sobre las propiedades funcionales de la hTSLP se describen en mayor detalle en los Ejemplos.

30 De conformidad con lo anterior, un anticuerpo que "inhibe" una o más de estas propiedades funcionales de la hTSLP (por ejemplo, bioquímica, inmunológica, celular, fisiológica u otras actividades biológicas o similares) como se determina de acuerdo con las metodologías conocidas en la técnica y descritas en la presente, se entenderá que se relaciona con una disminución estadísticamente significativa en la actividad particular relativa a la observada en ausencia del anticuerpo (por ejemplo, o cuando un anticuerpo de control de especificidad irrelevante está presente). Un anticuerpo que inhibe la actividad de la hTSLP efectúa esta disminución estadísticamente significativa por cuando menos el 10 por ciento del parámetro medido, por cuando menos del 50 por ciento, 80 por ciento o 90 por ciento, y en ciertas modalidades un anticuerpo de la invención puede inhibir más del 95 por ciento, 98 por ciento o 99 por ciento de la actividad funcional de la hTSLP.

Anticuerpos monoclonales

40 Los anticuerpos de la invención son los anticuerpos monoclonales humanos, aislados y estructuralmente caracterizados como se describe en los Ejemplos 1-5. La secuencia de aminoácidos de la V_H de los anticuerpos se muestra en las SEQ ID NOs: 84-86 respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de la V_L de los anticuerpos se muestra en la SEQ ID NO: 88.

45 Ya que cada uno de estos anticuerpos se puede enlazar a la hTSLP, las secuencias de las V_H y V_L se pueden "mezclar y empatar" para crear otras moléculas de enlace anti-hTSLP de la invención. El enlace de la hTSLP de estos anticuerpos "mezclados y empatados" se puede probar usando los ensayos de enlace descritos anteriormente y en los Ejemplos (por ejemplo, los ELISA). Cuando se mezcla y empatan las cadenas de las V_H y V_L , una secuencia de la V_H de una pareja particular de V_H/V_L deberá reemplazarse con una secuencia V_H estructuralmente similar. De igual manera una secuencia de la V_L de una pareja particular de V_H/V_L deberá reemplazarse con una secuencia V_L estructuralmente similar. Las secuencias de las V_H y V_L de los anticuerpos de la presente invención son particularmente dóciles para mezclarse y empatarse, ya que estos anticuerpos usan secuencias de V_H y V_L derivadas de las mismas secuencias de líneas germinales y de este modo exhiben similitud estructural.

En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos que comprenden la cadena pesada y la cadena ligera CDR1s, CDR2s y CDR3s de los anticuerpos o combinaciones de las mismas. La secuencia de aminoácidos de la V_H CDR1

de los anticuerpos se muestran en la SEQ ID NO: 3. La secuencia de aminoácidos de las V_H CDR2s de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 18-20 25. La secuencia de aminoácidos de la V_H CDR3 de los anticuerpos se muestra en la SEQ ID NO: 28. La secuencia de aminoácidos de la V_L CDR1 de los anticuerpos se muestra en la SEQ ID NO: 38. La secuencia de aminoácidos de la V_L CDR2 de los anticuerpos se muestra en la SEQ ID NO: 47. Las secuencias de aminoácidos de las V_L CDR3s de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 60-61. Las regiones CDR se delimitan usando el sistema Kabat (Kabat, E. A., y colaboradores, 1991 Sequence of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).

Dado que cada uno de estos anticuerpos se puede enlazar a la hTSLP y que la especificidad del enlace con el antígeno se proporciona principalmente mediante las regiones CDR1, 2 y 3, las secuencias V_H CDR1, 2 y 3 y las secuencias V_L CDR1, 2 y 3 se pueden "mezclar y empatar" (es decir, las CDR de distintos anticuerpos se pueden mezclar y empatar, aunque cada anticuerpo debe contener una V_H CDR1, 2 y 3 y una V_L CDR1, 2 y 3) para crear otras moléculas de enlace anti-hTSLP de la invención. Se puede probar el enlace de hTSLP de los anticuerpos "mezclados y empatados" usando los ensayos de enlaces descritos anteriormente en los Ejemplos (por ejemplo, los ELISA). Cuando las secuencias de la V_H CDR se mezclan y empatan, la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 a partir de una secuencia particular de V_H deberá reemplazarse con una secuencia (o secuencias) de CDR estructuralmente similar. Igualmente, cuando las secuencias V_L CDR se mezclan y empatan, la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 a partir de una secuencia V_L deberá reemplazarse con una secuencia (o secuencias) de CDR estructuralmente similar. Será fácilmente aparente para un experto que se pueden crear las secuencias de V_H y V_L novedosas sustituyendo una o más secuencias de las regiones V_H y/o V_L CDR con unas secuencias estructuralmente similares a partir de las secuencias de las CDR mostradas en la presente para los anticuerpos monoclonales de la presente invención.

En una modalidad, el anticuerpo consiste en: una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 3; una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 18; una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 28; una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 38; una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 47; y una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 60..

En otra modalidad, el anticuerpo consiste en: una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 3; una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 19; una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 28; una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 38; una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 47; y una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 60.

En otra modalidad, el anticuerpo consiste en: una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 3; una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 20; una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 28; una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 38; una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 47; y una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 60.

Como se usa en la presente, un anticuerpo humano comprende regiones variables de cadena pesada o ligera, que es "el producto de" o "derivado de" la secuencia de una línea germinal particular si las regiones variables del anticuerpo se obtienen de un sistema que usa genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Estos sistemas incluyen inmunizar a un ratón transgénico que lleva genes de inmunoglobulina humana con el antígeno de interés o analizar una biblioteca de genes de inmunoglobulina humana desplegada sobre el fago con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "derivado de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana se puede identificar como éste comparando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácidos de las inmunoglobulinas de la línea germinal humana y seleccionando la secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana que sea más cercana en secuencia (es decir, con la identidad porcentual más grande) a la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que sea "el producto de" o "se derive de" una secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana particular puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de la línea germinal, debido, por ejemplo, a unas mutaciones somáticas que se presentan naturalmente o la introducción intencional de las mutaciones dirigidas al sitio. Sin embargo, un anticuerpo humano seleccionado, típicamente es cuando menos 90 por ciento idéntico en la secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana y contiene residuos de aminoácidos que identifican el anticuerpo humano como que es humano cuando se compara con las secuencias de aminoácidos de la inmunoglobulina de la línea germinal de otras especies (por ejemplo, las secuencias de la línea germinal murina). En ciertos casos, un anticuerpo humano puede ser 60 por ciento, 70 por ciento, 80 por ciento, 90 por ciento o cuando menos 95 por ciento, o hasta cuando menos 96 por ciento, 97 por ciento, 98 por ciento o 99 por ciento idéntico en la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de la inmunoglobulina de la línea germinal. Típicamente, un anticuerpo humano derivado de una secuencia de línea germinal humana particular exhibirá no más de 10 diferencias de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En ciertos

casos, el anticuerpo humano puede exhibir no más de 5, o hasta no más de 4, 3, 2 o 1 diferencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal. Los anticuerpos de la invención se pueden diseñar genéticamente para incluir modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como la vida media del suero, la fijación del complemento, el enlace al receptor Fc, y/o la citotoxicidad celular dependiente del antígeno. Además, un anticuerpo de la invención se puede modificar químicamente (por ejemplo, una o más fracciones químicas se pueden unir al anticuerpo) o se puede modificar para alterar su glicosilación, de nuevo para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas modalidades se describe en mayor detalle más adelante. La numeración de los residuos en la región Fc es la del índice EU de Kabat.

En una modalidad, la región de la articulación de la CH1 se modifica de manera que se altere, por ejemplo, se aumente o se disminuya, el número de residuos de cisteína en la región de la articulación. Este enfoque se describe de manera adicional en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número: 5,677,425 por Bodmer y colaboradores. El número de residuos de cisteína en la región de la CH1 se altera, por ejemplo, para facilitar el ensamble de las cadenas ligeras y pesadas o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

En otra modalidad, la región de articulación Fc de un anticuerpo se muta para disminuir la vida biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introduce una o más mutaciones de aminoácido en la región de interfase del dominio CH2-CH3 del fragmento de articulación Fc de manera que el anticuerpo tenga un enlace de proteína estafilococcílica A (SpA) en relación con el enlace SpA del dominio de la articulación Fc original. Este enfoque se describe en mayor detalle en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 6,165,745 por Ward y colaboradores.

En otra modalidad, el anticuerpo se modifica para aumentar su vida media biológica. Son posibles varios enfoques. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número: 6,277,375 para Ward. De modo alternativo, para aumentar la vida media biológica, se puede alterar el anticuerpo dentro de la región CH1 o CL para contener un epitopo salvaje de enlace del receptor tomado de dos ciclos de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5,869,046 y 6,121,022 por Presta y colaboradores. La región constante Fc de un anticuerpo es crítica para determinar la vida media del suero y las funciones efectoras, es decir, la citotoxicidad de la célula dependiente del anticuerpo (ADCC) o las actividades de citotoxicidad dependientes del complemento (CDC). Se pueden diseñar genéticamente mutantes específicos del fragmento Fc para alterar la función efectora y/o la vida media del suero (véase la tecnología Xencor por ejemplo) (véase por ejemplo la Publicación Internacional WO 2004029207).

Un método para alterar la función efectora y la vida media del suero de un anticuerpo es injertar la región variable de un fragmento de anticuerpo con un fragmento Fc que tenga la función efectora adecuada. Se pueden seleccionar los isotipos IgG1 o IgG4 mediante actividad eliminadora de células, mientras que se puede usar el isotipo IgG2 para anticuerpos silenciosos (sin actividad de eliminación de células).

Se pueden obtener anticuerpos silenciosos con larga vida media de suero haciendo la fusión quimérica de las regiones variables de un anticuerpo con una proteína de suero tal como la HSA o una proteína que se enlaza con esta proteína de suero tal como la proteína que se enlaza con la HSA.

En todavía otras modalidades, la región Fc se altera reemplazando cuando menos un residuo de aminoácidos con un residuo de aminoácidos diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden reemplazar uno o más aminoácidos con un residuo de aminoácidos diferente de manera que el anticuerpo tenga una afinidad alterada para un ligando efector pero retenga la capacidad de enlace de antígeno del anticuerpo progenitor. El ligando efector al cual se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el componente C1 del complemento. Este enfoque se describe con mayor detalle en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números: 5,624,821 y 5,648,260, ambas por Winter y colaboradores.

En otra modalidad, uno o más aminoácidos seleccionados entre los residuos de aminoácidos se puede reemplazar con un residuo de aminoácidos diferente de manera que el anticuerpo tenga enlace C1q alterado y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida o abolida. Este enfoque se describe con mayor detalle en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 6,194,551 por Idusogie y colaboradores.

En otra modalidad, uno o más residuos de aminoácidos se alteran para mediante esto alterar la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Este enfoque se describe adicionalmente en la Publicación Internacional PCT WO 94/29351 por Bodmer y colaboradores.

En todavía otra modalidad, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) y/o aumentar la afinidad del anticuerpo para un receptor Fc_γ modificando uno o más aminoácidos. Este enfoque se describe adicionalmente en la Publicación Internacional PCT

WO 00/42072 por Presta. Más aún, se han mapeado los sitios de enlace sobre la IgG1 humana para Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII y FcRn y se han descrito variantes con enlace mejorado (véase Shields, R. L. y colaboradores, 2001 J. Biol. Chem. 276:6591-6604).

5 En todavía otra modalidad, se modifica la glicosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, se puede hacer un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación se puede alterar, por ejemplo, para aumentar la afinidad del anticuerpo por el "antígeno". Se pueden llevar a cabo estas modificaciones de carbohidrato alterando uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden hacer una o más sustituciones de aminoácidos que den como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación del entramado de la región variable para mediante esto eliminar la glicosilación en ese sitio. Esta aglicosilación puede
10 aumentar la afinidad del anticuerpo para el antígeno. Este enfoque se describe en mayor detalle en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números: 5,714,350 y 6,350,861 por Co y colaboradores.

En adición o de manera alternativa, se puede hacer que un anticuerpo tenga un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tenga cantidades reducidas de residuos de fucosilo o un anticuerpo que tenga estructuras de GlcNac aumentadas bisectantes. Se ha demostrado que estos patrones de glicosilación alterada aumentan la capacidad de la ADCC de los anticuerpos. Estas modificaciones de carbohidratos se pueden llevar a cabo mediante, por ejemplo, la expresión del anticuerpo en una célula huésped con la maquinaria de glicosilación alterada. Se han descrito en la técnica las células con la maquinaria de glicosilación alterada y se pueden usar como células huéspedes en las cuales expresar los anticuerpos recombinantes de la invención para mediante esto producir un anticuerpo con glicosilación alterada. Por ejemplo, la Patente Europea EP 1,176,195 por
15 Hang y colaboradores describe una línea celular con una funcionalidad del gen FUT8 interrumpida, que codifica una fucosil-transferasa, de manera que los anticuerpos expresados en esta línea celular exhiben una hipofucosilación. La Publicación Internacional PCT WO 03/035835 por Presta describe una línea celular de CHO variante, las células Lecl3, con capacidad reducida para unir la fucosa con los carbohidratos enlazados al Asn(297), dando como resultado también la hipofucosilación de los anticuerpos expresados en la célula huésped (véase también Shields, R. L. y colaboradores, 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740). La Publicación Internacional PCT WO 99/54342 por Umana y colaboradores describe líneas celulares diseñadas genéticamente para expresar la transferasa de glicosilo que modifica la glicoproteína (por ejemplo, beta(1,4)-N-acetil-glucos-aminil-transferasa III (GnTIII)) de manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares diseñadas genéticamente exhiben estructuras GlcNac de bisección aumentada lo cual da como resultado una actividad de ADCC aumentada de los anticuerpos (véase también Umana y colaboradores, 1999 Nat. Biotech. 17: 176-180).
20
25
30

Otra modificación de los anticuerpos en la presente que se contempla por la invención es la "pegilación". Un anticuerpo puede ser pegilado, por ejemplo, para aumentar la vida media biológica (por ejemplo, del suero) del anticuerpo. Para pegilar un anticuerpo, el anticuerpo o el fragmento del mismo, típicamente se hace reaccionar con polietilen-glicol (PEG), tal como un éster reactivo o aldehído derivado del PEG en condiciones en las cuales, uno o más grupos del PEG quedan unidos al anticuerpo o al fragmento del anticuerpo. La pegilación se puede llevar a cabo por una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula PEG reactiva (o un polímero soluble al agua reactivo análogo). Como se usa en la presente, el término "polietilen-glicol" pretende abarcar cualquiera de las formas de PEG que se han usado para derivar otras proteínas tales como mono-alcoxi (con de 1 a 10 átomos de carbono) o ariloxi-polietilen-glicol o polietilen-glicol-maleimida. En ciertas modalidades, el anticuerpo que se va a pegar es un anticuerpo aglicosilado. Los métodos para pegilar proteínas son conocidos en la técnica y se pueden aplicar a los anticuerpos de la invención. Véase por ejemplo, la Patente Europea 0 154 316 por Nishimura y colaboradores, y la Patente Europea 0 401 384 por Ishikawa y colaboradores.
35
40

También se pueden alterar las funciones de efector modulando el patrón de la glicosilación del anticuerpo. Glycart (por ejemplo, Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 6,602,684), Biowa (por ejemplo, Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 6,946,292) y Genentech (por ejemplo, la Publicación Internacional WO 03/035835) han diseñado genéticamente líneas celulares de mamífero para producir anticuerpos con función efectora aumentada o disminuida. Especialmente, los anticuerpos no fucosilados tendrán actividades de ADCC aumentadas. Glycofi también ha desarrollado líneas celulares de levadura capaces de producir glicoformas específicas de anticuerpos. También la tecnología Kyowa Hakka/Biowa para reducir la fucosa. Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional WO 03/085102.
45
50

Se puede emplear una amplia variedad de entramados o entarimados de anticuerpo/inmunoglobulina en tanto el polipéptido resultante incluya una o más regiones de enlace que sea específica para la proteína de la hTSLP. Estos entramados o entarimados incluyen 5 idiotipos principales de las inmunoglobulinas humanas, o de los fragmentos de las mismas (tales como las descritas en otras partes en la presente), e incluyen a las inmunoglobulinas de otras especies animales que, de preferencia, tengan aspectos humanizados. Los anticuerpos de cadena pesada simple tales como los identificados en los camélidos son de particular interés respecto a esto. Los expertos en la técnica continúan descubriendo y desarrollando los entramados, los entarimados y los fragmentos novedosos.
55

De manera alternativa, se pueden emplear los entramados y entarimados de no inmunoglobulina conocidos o futuros, en tanto comprendan una región de enlace específica para la proteína de la hTSLP. Estos compuestos se

conocen en la presente como "polipéptidos que comprenden una región de enlace específica para cMAC". Los entramados o entarimados que no son de inmunoglobulina conocidos incluyen las Adnectinas (fibronectinas) (Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA), la anquirina (Molecular Partners AG, Zurich, Suiza), los anticuerpos de dominio (Domantis, Ltd, Cambridge, MA) y el Ablynx nv (Zwijnaarde, Bélgica), la lipocalina (Anticalin) (Pieris Proteolab AG, Freising, Alemania), los productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA), los maxicuerpos (Avidia, Inc. (Mountain View, CA)), la Proteína A (Affibody AG, Sweden) y la afilina (gamma-cristalina o ubiquitina) (Scil Proteins GmbH, Halle, Alemania).

De acuerdo con la presente invención, el anticuerpo anti-hTSLP o el fragmento del mismo, o el polipéptido que comprende una región de enlace específico de la hTSLP, independientemente del entramado o entarimado empleado, puede estar enlazado, ya sea covalentemente o no covalentemente, a una fracción adicional. La fracción adicional puede ser un polipéptido, un polímero inerte tal como PEG, una molécula pequeña, un radioisótopo, metal, ión, ácido nucleico u otro tipo de moléculas relevante biológicamente. Una construcción así, que puede ser conocida como un inmunocombinado, inmunotoxina, o similar, también se incluye en el significado de anticuerpo, fragmento de anticuerpo o polipéptido que comprende una región de enlace específica para hTSLP, como se usa en la presente.

15 Métodos para diseñar genéticamente los anticuerpos

Como se discutió anteriormente, se pueden usar los anticuerpos anti-hTSLP que tienen secuencias V_H y V_L mostradas en la presente para crear nuevos anticuerpos anti-hTSLP modificando las secuencias de las V_H y/o V_L , o de la región o las regiones constantes unidas a las mismas. De este modo, en otro aspecto de la invención, se usan los aspectos estructurales de un anticuerpo anti-hTSLP de la invención para crear anticuerpos anti-hTSLP relacionados estructuralmente que retengan cuando menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tales como el enlace a la hTSLP y también inhiban una o más propiedades funcionales de la hTSLP (por ejemplo, el enlace al receptor, la inhibición de la liberación del mediador).

Por ejemplo, se pueden combinar recombinantemente una o más regiones CDR de los anticuerpos de la presente invención, o mutaciones de las mismas, con regiones de entramado conocido y/u otras CDR para crear los anticuerpos anti-hTSLP recombinantemente-diseñados adicionales de la invención, como se mencionó anteriormente. Otros tipos de modificaciones incluyen las descritas en la sección anterior. El material inicial para el método de diseño es una o más de las secuencias V_H y/o V_L proporcionadas en la presente, o una o más regiones CDR de las mismas. Para crear el anticuerpo genéticamente diseñado, no es necesario realmente preparar (es decir, expresar como una proteína) un anticuerpo que tenga una o más de las secuencias V_H y/o V_L , proporcionadas en la presente, o una o más regiones CDR de las mismas. En vez de eso, la información contenida en la o las secuencias se usa como el material inicial para crear una secuencia o secuencias de la "segunda generación" derivadas de la o las secuencias originales y entonces la o las secuencias de "segunda generación" se preparan y se expresan como una proteína.

De conformidad con lo anterior, en otra modalidad, la invención proporciona un método para preparar un anticuerpo anti-hTSLP que consiste en: una secuencia de anticuerpo de región variable de cadena pesada que tiene una secuencia CDR1 seleccionada de la SEQ ID NO: 3, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 18-20 y una secuencia CDR3 seleccionada de la SEQ ID NO: 28 y una secuencia de anticuerpo de región variable de cadena ligera que tiene una secuencia CDR1 seleccionada de la SEQ ID NO: 8, una secuencia CDR2 seleccionada de la SEQ ID NO: 47 y una secuencia CDR3 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 60-61; alterando cuando menos un residuo de aminoácidos dentro de la secuencia del anticuerpo de región variable de cadena pesada y/o la secuencia del anticuerpo de región variable de cadena ligera para crear cuando menos una secuencia de anticuerpo alterada; y expresar la secuencia de anticuerpo alterada como una proteína.

Se pueden usar técnicas estándares de la biología molecular para preparar y expresar la secuencia de anticuerpos alterada. El anticuerpo codificado por la o las secuencias alteradas de anticuerpo, es una que retiene una, algunas o todas las propiedades funcionales de los anticuerpos anti-hTSLP descritos en la presente, estas propiedades funcionales incluyen, pero no se limitan a, enlazar específicamente al hTSLP y el anticuerpo exhibe cuando menos una de las propiedades funcionales siguientes: el anticuerpo inhibe el enlace de la proteína de hTSLP con el receptor de hTSLP, o el anticuerpo inhibe el enlace del receptor hTSLP evitando o aminorando una condición inflamatoria, fibrótica o alérgica, particularmente una enfermedad inflamatoria u obstructiva de las vías respiratorias, o el anticuerpo inhibe el enlace del receptor hTSLP mediante lo cual evita o aminora el asma.

El anticuerpo alterado puede exhibir uno o más, dos o más, o tres o más de las propiedades funcionales mencionadas anteriormente.

Las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados se pueden valorar usando las pruebas estándares disponibles en la técnica y/o descritas en la presente, tales como las presentadas en los Ejemplos (por ejemplo, los ELISA).

En ciertas modalidades de los métodos para diseñar genéticamente los anticuerpos de la invención, se pueden introducir de manera aleatoria o por selección mutaciones a lo largo de toda o parte de la secuencia de codificación del anticuerpo anti-hTSLP, y se pueden analizar los anticuerpos anti-hTSLP modificados resultantes para determinar la actividad de enlace y/u otras propiedades funcionales, como se describe en la presente. Se han descrito en la técnica métodos mutacionales. Por ejemplo, la Publicación Internacional WO 02/092780 por Short describe métodos para crear y analizar las mutaciones de los anticuerpos usando la mutagénesis por saturación, el ensamble de ligación sintética, o una combinación de los mismos. Alternativamente, la Publicación Internacional WO 03/074679 por Lazar y colaboradores describe métodos para usar métodos de análisis computacionales para optimizar las propiedades fisicoquímicas de los anticuerpos.

10 Moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención

Otro aspecto de la invención pertenece a las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en las células enteras, en un lisado celular, o pueden ser ácidos nucleicos en una forma sustancialmente pura o parcialmente purificada. Un ácido nucleico que es "aislado" o "se vuelve sustancialmente puro" cuando se purifica lejos de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas, mediante técnicas estándares, incluyendo el tratamiento alcalino/SDS, la formación de bandas CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa, y otras muy conocidas en la técnica. Véase F. Ausubel, y colaboradoras, ed. 1987 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Un ácido nucleico de la invención puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede o no contener secuencias intrónicas. En una modalidad, el ácido nucleico es una molécula ADNc. El ácido nucleico puede estar presente en un vector tal como un vector de despliegue de fago, o en un vector de plásmido recombinante.

Se pueden obtener los ácidos nucleicos de la invención usando técnicas estándares de biología molecular. Para los anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, los hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos que lleven genes de inmunoglobulina humana como se describe adicionalmente más adelante), se pueden obtener los ADNc que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo hechas por el hibridoma mediante amplificación de reacción en cadena de la polimerasa estándar o técnicas de clonación de ADNc. Para los anticuerpos obtenidos en una biblioteca de gen de inmunoglobulina (por ejemplo, usando las técnicas de despliegue de fago), se puede recuperar el ácido nucleico que codifica al anticuerpo a partir de varias clonas del fago que son miembros de la biblioteca.

En cuanto se obtienen los fragmentos de ADN que codifican los segmentos V_H y V_L , se pueden manipular estos fragmentos de ADN adicionalmente mediante técnicas estándares de ADN recombinante, por ejemplo, para convertir los genes de región variable en genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, en genes de fragmento Fab o en un gen scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica V_H o V_L , se enlaza operativamente a otra molécula de ADN, o a un fragmento que codifica a otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible. El término "enlazado operativamente", como se usa en este contexto, pretende significar que dos fragmentos de ADN están unidos de una manera funcional, por ejemplo, de manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en cuadro, o de manera que la proteína se expresa bajo el control de un promotor deseado.

El ADN aislado que codifica la región V_H se puede convertir en un gen de cadena pesada de longitud completa enlazando operativamente el ADN que codifican la V_H en otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de los genes de región constante de cadena pesada humana se conocen en la técnica (véase por ejemplo, Kabat, E. A., y colaboradores, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante amplificación de reacción en cadena de polimerasa estándar. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD. Para un gen de cadena pesada de fragmento Fab, el ADN que codifica la V_H se puede enlazar operativamente a otra molécula de ADN que codifica solamente la región constante CH1 de cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región V_L se puede convertir en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como en un gen de cadena ligera Fab) enlazando operativamente el ADN que codifica la V_L a otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena ligera, CL. Se conocen en la técnica las secuencias de los genes de región constante de cadena ligera humana (véase por ejemplo, Kabat E. A., y colaboradores, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa estándar. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda.

Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican las V_H y V_L , se enlazan operativamente a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, por ejemplo que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly4-Ser)₃, de

manera que se pueden expresar las secuencias V_H y V_L , como una proteína de cadena simple contigua, con las regiones V_H y V_L unidas por el enlazador flexible (véase, por ejemplo, Bird y colaboradores, 1988 Science 242:423-426; Huston y colaboradores, 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty y colaboradores, 1990 Nature 348:552-554).

5 Producción de los anticuerpos monoclonales de la invención

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) se pueden producir mediante una variedad de técnicas, incluyendo la metodologías convencionales de los anticuerpos monoclonales por ejemplo, la técnica de hibridación de célula somática estándar de Kohler y Milstein, 1975 Nature 256: 495. Se pueden emplear muchas técnicas para producir anticuerpos monoclonales por ejemplo, la transformación viral u oncogénica de los linfocitos B.

10 Un sistema animal para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento bien establecido. Los protocolos de inmunización y las técnicas para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para la fusión se conocen en la técnica. También se conocen los compañeros de la fusión (por ejemplo, las células de mieloma murino) y los procedimientos de fusión. También se pueden producir anticuerpos monoclonales usando un hibridoma específico, el cual se ha depositado en una colección de cepas.

15 Los anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente invención se pueden preparar basándose en la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado como se describió anteriormente. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera se pueden obtener a partir del hibridoma murino de interés y se diseñan genéticamente para que contengan secuencias de inmunoglobulinas no murinas (por ejemplo, humanas) usando técnicas de biología molecular estándares. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones
20 variables murinas se pueden enlazar con las regiones constantes humanas usando métodos conocidos en la técnica (véase por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,816,567 para Cabilly y colaboradores). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones CDR murinas se pueden insertar en un entramado humano usando métodos conocidos en la técnica (véase por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,225,539 para Winter, y las patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números
25 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370 para Queen y colaboradores).

En cierta modalidad, los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales humanos. Estos anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra la hTSLP se pueden generar usando ratones transgénicos o transcromosómicos que llevan parte del sistema inmune humano en vez del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones conocidos en la presente como ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y colectivamente se hace referencia a ellos en la presente como "ratones con la Ig humana".
30

Los ratones HuMAb[®] (Medarex, Inc.) contienen mini lugares de genes de inmunoglobulina humana que codifica secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada (μ y γ) y ligera κ desarreglada, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los lugares de cadena endógenos μ y κ (véase, por ejemplo, Lonberg, y colaboradores, 1994 Nature 368(6474): 856-859). De conformidad con lo anterior, los ratones exhiben la expresión reducida de la IgM de ratón o
35 κ , y como respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humana introducidos sufren cambio de clase y mutación somática para generar alta afinidad monoclonal con la IgG κ humana (Lonberg, N. y colaboradores, 1994 *supra*; revisado en Lonberg, N., 1994 Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. y Huszar, D., 1995 Intern. Rev. Immunol. 13:65-93, y Harding, F. y Lonberg, N., 1995 Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:536-546). La preparación y uso de los ratones HuMAb y las modificaciones genómicas transportadas por
40 estos ratones, se describe adicionalmente en Taylor, L., y colaboradores, 1992 Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. y colaboradores, 1993 International Immunology 5:647-656; Tuailon y colaboradores, 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3720-3724; Choi y colaboradores, 1993 Nature Genetics 4:117-123; Chen, J. y colaboradores, 1993 EMBO J. 12:821-830; Tuailon y colaboradores, 1994 J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor L. y colaboradores, 1994 International Immunology 579-591; y Fishwild D. y colaboradores, 1996 Nature Biotechnology 14:845-851. Véanse además, las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; y 5,770,429; todas para Lonberg y Kay; la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,545,807 para Surani y colaboradores; las Publicaciones Internacionales números WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 y
45 WO 99/45962, todas para Lonberg y Kay; y la Publicación Internacional PCT número WO 01/14424 para Korman y
50 colaboradores.

En otra modalidad, los anticuerpos humanos de la invención se pueden cultivar usando un ratón que lleva secuencias de inmunoglobulina humana sobre los transgenes y los transcromosomas tales como un ratón que lleva un transgén de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena ligera humana. Estos ratones, conocidos en la presente como "ratones KM", se describen en detalle en la Publicación Internacional PCT WO 02/43478 para
55 Ishida y colaboradores.

Todavía más, están disponibles en la técnica sistemas de animales transgénicos alternativos que expresan genes de

inmunoglobulina humana y se pueden usar para cultivar los anticuerpos anti-hTSLP de la invención. Por ejemplo, se puede usar un sistema transgénico alternativo referido como el Xenomouse (Abgenix, Inc.); estos ratones se describen, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584 y 6,162,963 para Kucherlapati y colaboradores.

- 5 Más aún, los genes de inmunoglobulina humana que expresan sistemas de animales transcromosómicos alternativos están disponibles en la técnica y se pueden usar para cultivar los anticuerpos anti-hTSLP de la invención. Por ejemplo, se pueden usar ratones que llevan tanto un transcromosoma de cadena pesada humana como un transcromosoma de cadena ligera humana, conocidos como los "ratones TC"; estos ratones se describen en Tomizuka y colaboradores, 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727. Más aún, se han descrito en la técnica
 10 vacas que llevan transcromosomas de cadena pesada y ligera humanas (Kuroiwa y colaboradores, 2002, Nature Biotechnology 20:889-894) y se pueden usar para cultivar los anticuerpos anti-hTSLP de la invención.

- Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también se pueden preparar usando métodos de despliegue de fagos para analizar las bibliotecas de los genes de inmunoglobulina humana. Estos métodos de despliegue de fagos para aislar anticuerpos humanos están establecidos en la técnica. Por ejemplo véanse las patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5,223,409; 5,403,484; y 5,571,698 para Ladner y colaboradores, las
 15 patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5,427,908 y 5,580,717 para Doler y colaboradores; las patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5,969,108 y 6,172,197 para McCafferty y colaboradores; y las patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 y 6,593,081 para Griffiths y colaboradores.

- 20 Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también se pueden preparar usando ratones SCID en los cuales se han reconstituido células inmunes humanas de manera que se puede generar una respuesta de los anticuerpos humanos después de la inmunización. Estos ratones se describen en, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5,476,996 y 5,698,767 para Wilson y colaboradores.

- También se pueden usar los anticuerpos obtenidos de analizar las bibliotecas humanas de anticuerpos (por ejemplo, despliegue de fagos con Morfosis), a partir de las bibliotecas tales como la biblioteca HuCal de Morfosis, la tecnología de maduración por afinidad y las tecnologías de secuencias de optimización de codones adicionales. La maduración por afinidad también se puede usar en los anticuerpos hechos de otras maneras (por ejemplo, los
 25 hibridomas).

Generación de transfectomas que producen anticuerpos monoclonales

- 30 También se pueden producir anticuerpos de la invención en un transfectoma de célula huésped usando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección de genes como es muy conocido en la técnica (por ejemplo, Morrison, S. (1985) Science 229:1202).

- Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o los fragmentos de anticuerpo de los mismos, se pueden obtener los ADNs que codifican las cadenas ligeras y pesadas de longitud completa o parcial, mediante las técnicas estándares de la biología molecular (por ejemplo, la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa o la clonación de
 35 ADNc usando un hibridoma que expresa el anticuerpo de interés) y los ADNs se pueden insertar en los vectores de expresión de manera que los genes se enlacen operativamente con las secuencias de control de la transcripción y de la traducción. En este contexto, el término "operativamente enlazado" pretende significar que un gen del anticuerpo está ligado en un vector de tal manera que las secuencias de control de transcripción y de traducción dentro del vector sirven para su función pretendida de regular la transcripción y la traducción del gen del anticuerpo. Se eligen el vector de expresión y las secuencias del control de expresión para que sean compatibles con la célula huésped de expresión usada. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo se pueden insertar en vectores separados o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de
 40 expresión. Los genes de los anticuerpos se insertan en el vector de expresión mediante métodos estándares (por ejemplo, ligación de los sitios de restricción complementarios sobre el fragmento del gen del anticuerpo y el vector, o ligación de extremo romo si no están presentes los sitios de restricción). Se pueden usar las regiones variables de cadena ligera expresadas de los anticuerpos descritos en la presente para crear genes de anticuerpo de longitud completa de cualquier isotipo del anticuerpo insertándolos en los vectores de expresión que ya codifican las regiones constantes de cadena pesada y las regiones constantes de cadena ligera del isotipo deseado de manera que el segmento V_H esté operativamente enlazado con el o los segmentos CH dentro del vector y el segmento V_L esté operativamente enlazado al segmento CL dentro del vector. De manera adicional o alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido de señal que facilita la secreción de una cadena de anticuerpos a partir de una célula huésped. El gen de la cadena del anticuerpo se puede clonar en el vector de manera que el péptido de señal se enlace en entramado con el término amino del gen de la cadena del anticuerpo. El péptido de
 45 señal puede ser un péptido de señal de inmunoglobulina o un péptido de señal heterólogo (es decir, un péptido de señal a partir de una proteína que no es inmunoglobulina).

En adición a los genes de cadena de los anticuerpos, los vectores de expresión recombinante de la invención llevan

secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula huésped. El término "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, mejoradores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o la traducción de los genes de cadenas de anticuerpos. Estas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA 1990). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de las secuencias reguladoras, pueden depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se va a transformar, el nivel de la expresión de la proteína deseado, etc. Las secuencias reguladoras para la expresión de células huéspedes de mamíferos incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de la expresión de la proteína en las células de mamíferos, tales como los promotores y/o los mejoradores derivados del citomegalovirus (CMV), virus de simio 40 (SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor final mayor de adenovirus (AdMLP)), y la polioma. De manera alternativa, se pueden usar secuencias reguladoras no virales, tales como el promotor de ubiquitina o el promotor de P-globina. Todavía más, los elementos reguladores compuestos de secuencias de diferentes fuentes, tales como el sistema promotor SRa, que contiene secuencias a partir del promotor temprano SV40 y la repetición de terminal larga del virus de leucemia de células T humanas tipo 1 (Takebe, Y, y colaboradores, 1998 Mol. Cell. Biol. 8:466-472).

En adición a los genes de la cadena de anticuerpos y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden llevar secuencias adicionales, tales como las secuencias que regulan la réplica del vector en las células huéspedes (por ejemplo, los orígenes de la replicación) y los genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de las células huéspedes en las cuales se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 4,399,216; 4,634,665 y 5,179,017, todas por Axel y colaboradores). Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a los fármacos tales como el G418, la higromicina o el metotrexato, sobre una célula huésped en la cual se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables incluyen el gen dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en las células huéspedes dhfr con selección/amplificación de metotrexato) y el neo gen (para la selección del G418).

Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, el o los vectores de expresión que codifican las cadenas ligera y pesada se transfectan en una célula huésped mediante técnicas estándares. Las distintas formas del término "transfección" pretenden abarcar una amplia variedad de técnicas comúnmente usadas para la introducción de ADN exógeno en la célula huésped procariótica o eucariótica, por ejemplo, la electroincorporación, la precipitación de calcio-fosfato, la transfección de DEAE-dextrano y similares. Teóricamente es posible expresar los anticuerpos de la invención tanto en las células huéspedes procarióticas como en las eucarióticas. La expresión de los anticuerpos en las células eucarióticas, en particular en las células huéspedes de mamíferos, se comenta debido a que estas células eucarióticas, y en particular las células de mamíferos, tienen más probabilidad que las células procarióticas de ensamblar y secretar un anticuerpo apropiadamente plegado e inmunológicamente activo. Se ha reportado como ineficaz la expresión procariótica de los genes de los anticuerpos para la producción de altos rendimientos de anticuerpos activos (Boss, M. A. y Word, C. R., 1985 Immunology Today 6:12-13).

Las células huéspedes de mamíferos para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen el ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo las células dhfr-CHO, descritas por Urlaub y Chasin, 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:44216-4220 usadas con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo, como se describe en R.J. Kaufman y P.A. Sharp, 1982 Mol. Biol. 159:601-621, las células de mieloma NSO, las células COS y las células SP2. Cuando se introducen los vectores de expresión recombinante que codifican los genes de anticuerpos en las células huéspedes de mamíferos, se producen los anticuerpos cultivando las células huéspedes durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huéspedes o la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el cual crecen las células huéspedes. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo usando métodos estándares de purificación de proteínas.

Las secuencias que codifican cadenas ligeras y pesadas de longitud parcial o completa son expresadas mediante la transfección del o los vectores de expresión que llevan estas secuencias en una célula huésped mediante las técnicas de transfección estándares. Típicamente, se usan las células huéspedes eucarióticas para expresar los anticuerpos, ya que los anticuerpos generalmente son glicoproteínas y las células procarióticas, por lo tanto, no son apropiadas. Las células huéspedes de mamífero que se pueden usar para expresar los anticuerpos recombinantes incluyen el ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo las células dhfr-CHO), las células de mieloma NSO, las células COS y las células SP2. Alternativamente, se puede usar una célula huésped diseñada genéticamente para producir glicoproteínas con patrones de glicosilación parecidos a mamífero, incluyendo las líneas celulares de las levaduras, los hongos, o los vegetales. Los anticuerpos se pueden producir por ejemplo en las líneas celulares de levadura glicodiseñadas genéticamente, incluyendo *Phichia*, *Saccharomyces* o especies *Kluyveromyces*, y de preferencia, *Pichia pastoris* o *Saccharomyces cerevisiae* o *Kluyveromyces lactis*, véase por ejemplo la Patente Europea EP1297172B1 (Glycofi). Los anticuerpos también se pueden producir en las líneas celulares vegetales glicodiseñadas genéticamente, y preferiblemente las líneas celulares de briofito como se describe en la Publicación Internacional WO 2004/057002 (Greenovation). Los anticuerpos se producen cultivando las células huéspedes durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huéspedes o la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo. Los anticuerpos se recuperan del medio de cultivo usando métodos

de purificación de proteínas estándares.

Inmunconjugados

En otro aspecto, la presente invención presenta un anticuerpo anti-hTSLP, o un fragmento del mismo, conjugado a una fracción terapéutica, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina. Estos conjugados se conocen en la presente como "inmunconjugados". Los inmunconjugados que incluyen una o más citotoxinas se conocen como "inmunotoxinas". Una citotoxina o un agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para las células (por ejemplo, las elimina). Los ejemplos incluyen taxon, citocalasin B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etoposida, tenoposida, vincristina, vinglastina, t. colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi-antracina-diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptapurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil descabazina), agentes disgregantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa cloraxnbucil, meifalan, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatina, antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramycin (AMC)), y agentes antimicóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Otros ejemplos de citotoxinas terapéuticas que se pueden conjugar como un anticuerpo de la invención incluyen las duocarmicinas, caliqueamicinas, maytansinas y auristatinas, y los derivados de las mismas. Un ejemplo de un conjugado de anticuerpo de caliqueamicina está comercialmente disponible (Mylotarg™; Wyeth-Ayerst).

Las citotoxinas se pueden conjugar con anticuerpos de la invención usando la tecnología enlazante disponible en la técnica. Los ejemplos de tipos de enlazadores que se han usado para conjugar una citotoxina con un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, las hidrazonas, los tioéteres, los ésteres, los disulfuros y los enlazadores que contienen péptidos. Se puede elegir un enlazador que, por ejemplo, sea susceptible a la disociación mediante pH bajo dentro del compartimiento lisosomal o que sea susceptible a la disociación por proteasas, tales como las proteasas de preferencia expresadas en el tejido de tumores tales como las catepsinas (por ejemplo, las catepsinas B, C, D).

Para una discusión adicional sobre los tipos de citotoxinas, de enlazadores y de los métodos para conjugar los agentes terapéuticos con los anticuerpos, véanse también Saito, G. y colaboradores, 2003 *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P.A. y colaboradores, 2003 *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne G., 2003 *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M., 2002 *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. y Kreitman, R. J., 2002 *Curr. Opin. Investig. Drug* 3:1089-1091; Senter, P.D. y Springer, C.J. 2001 *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264.

Los anticuerpos de la presente invención también se pueden conjugar a un isótopo radioactivo para generar sustancias radiofarmacéuticas citotóxicas, también conocidas como radioinmunconjugados. Los ejemplos de los isótopos radioactivos que se pueden conjugar con los anticuerpos para su uso para el diagnóstico o su uso terapéutico incluyen, pero no se limitan a, yodo¹³¹, indio¹¹¹, itrio⁹⁰, y lutecio¹⁷⁷. El método para preparar radioinmunconjugados está establecido en la técnica. Los ejemplos de los radioinmunconjugados que están comercialmente disponibles, incluyen Zevalin^{MR} (DEC Pharmaceuticals) y Bexxar^{MR} (Corixa Pharmaceuticals), y se pueden usar métodos similares para preparar radioinmunconjugados usando los anticuerpos de la invención.

Los conjugados de los anticuerpos de la invención se pueden usar para modificar una respuesta biológica dada, y la fracción del fármaco no se considera limitada para los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la fracción del fármaco puede ser una proteína o un polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Estas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o un fragmento de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxinas de pseudomonas, o toxina de la difteria; una proteína tal como el factor de necrosis de tumor o el interferón- γ , o, modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de las colonias de los macrófagos de los granulocitos ("GM-CSF"), factor estimulante de las colonias de los granulocitos ("G-CSF"), u otros factores de crecimiento.

Las técnicas para conjugar estas fracciones terapéuticas a los anticuerpos son muy conocidas, véase, por ejemplo, Amon y colaboradores, "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Reisfeld y colaboradores, (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom y colaboradores, "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson y colaboradores (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*, Pinchera y colaboradores (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin y colaboradores (eds.), pp. 303-16

(Academia Press 1985), y Thorpe y colaboradores, "The Preparation and Cytotoxic Properties of Antibody-Toxin Conjugates", *Inmunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

Moléculas biespecíficas

5 En otro aspecto, la presente invención presenta moléculas biespecíficas que comprenden un anticuerpo anti-hTSLP, o un fragmento del mismo, de la invención. Un anticuerpo de la invención, o porciones de enlace de antígeno del mismo, se puede derivar o enlazar con otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, otro anticuerpo o ligando para un receptor) para generar una molécula biespecífica que se enlaza a cuando menos dos diferentes sitios de enlace o moléculas objetivas. El anticuerpo de la invención de hecho se puede derivar o enlazar a más de una otra molécula funcional para generar moléculas multiespecíficas que se enlazan a más de dos diferentes sitios de enlace y/o moléculas objetivas; estas moléculas multiespecíficas también pretenden ser abarcadas por el término "molécula biespecífica" como se usa en la presente. Para crear una molécula biespecífica de la invención, un anticuerpo de la invención se puede enlazar funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más moléculas de enlace, tales como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o mimético de enlace, de manera que resulte una molécula biespecífica.

De conformidad con lo anterior, la presente invención incluye moléculas biespecíficas que comprenden cuando menos una primera especificidad de enlace para la hTSLP y una segunda especificidad de enlace para un segundo epitopo objetivo. Por ejemplo, el segundo epitopo objetivo es un receptor Fc, por ejemplo, Fc γ R1 (CD64) de un receptor Fc α humana (CD89). Por lo tanto, la invención incluye moléculas biespecíficas que son capaces de enlazarse tanto a las células efectoras que expresan los Fc γ R, Fc α R, o Fc ϵ R (por ejemplo, los monocitos, los macrófagos o las células polimorfonucleares (PMN), y a las células objetivas que expresan la hTSLP. Estas moléculas biespecíficas dirigen a las células que expresan hTSLP hacia la célula efectora y disparan las actividades de las células efectoras mediadas por el receptor Fc tales como la fagocitosis de las células que expresan una hTSLP, la citotoxicidad mediada por las células dependientes del anticuerpo (ADCC), la liberación de la citosina, o la generación de un anión superóxido.

De manera adicional, para la invención en la cual la molécula biespecífica es multiespecífica, la molécula además puede incluir una tercera especificidad de enlace, en adición a la especificidad de enlace anti-Fc y la especificidad de enlace anti-hTSLP. Por ejemplo, la tercera especificidad de enlace podría ser una porción de factor de anti-resaltamiento (EF), por ejemplo, una molécula que se enlaza a una proteína de superficie involucrada en la actividad citotóxica y mediante esto aumenta la respuesta inmune contra la célula objetiva. La "porción del factor anti-resaltamiento" podría ser un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo funcional o un ligando que se enlaza a una molécula dada, por ejemplo, un antígeno o un receptor, y mediante esto da como resultado un resaltamiento del efecto de los determinantes de enlace para el receptor Fc o para el antígeno de la célula objetiva.

La "porción del factor de anti-resaltamiento" puede enlazarse a un receptor Fc o un antígeno de célula objetiva. De manera alternativa, la porción del factor de anti-resaltamiento podría enlazarse a una entidad que es diferente de la entidad a la cual se enlazan la primera y la segunda especificidades de enlace. Por ejemplo, la porción del factor de anti-resaltamiento se puede enlazar a una célula T citotóxica (por ejemplo mediante CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD44, ICAM-1 u otras células inmunes que resultan en una respuesta inmune aumentada contra la célula objetiva).

En una modalidad, las moléculas biespecíficas de la invención comprenden como una especificidad de enlace cuando menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, incluyendo, por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv o un Fv de cadena simple. El anticuerpo también puede ser un dímero de cadena ligera o cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo tal como un Fv o una construcción de cadena simple como se describe en Ladner y colaboradores, Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,946,778.

En una modalidad, la especificidad de enlace para un receptor Fc γ es proporcionada por un anticuerpo monoclonal, el enlace del cual no está bloqueado por la inmunoglobulina G humana (IgG). Como se usa en la presente, el término "receptor de IgG2" se refiere a cualquiera de los ocho genes de cadena γ localizado en el cromosoma 1. Estos genes codifican un total de doce isoformas de transmembranas o isoformas de receptor soluble que se agrupan en tres clases de receptores F γ : Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32), y Fc γ RIII (CD16). En otra modalidad, el receptor Fc γ es un Fc γ RI humano de alta afinidad. El Fc γ RI humano es una molécula de 72 kDa, la cual muestra alta afinidad para la IgG monomérica ($10^8 - 10^9 M^{-1}$).

La producción y caracterización de ciertos anticuerpos monoclonales anti-Fc γ la describen Fanger y colaboradores en la Publicación Internacional WO 88/00052 y en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,954,617. Estos anticuerpos se enlazan a un epitopo de Fc γ RI, Fc γ RII, o Fc γ RIII en un sitio que es distinto del sitio de enlace Fc γ del receptor y, de este modo, su enlace no está sustancialmente bloqueado por niveles fisiológicos de la IgG. Los anticuerpos específicos anti-Fc γ RI útiles en esta invención son mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 y mAb 197. El hibridoma que produce el mAb 32 está disponible en la Colección Americana de Cultivos Tipo, ATCC número

de acceso HB9469. En otras modalidades, el anticuerpo receptor anti-Fc γ es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal 22 (H22). La producción y caracterización del anticuerpo H22 se describe en Graciano, R.F. y colaboradores, 1995 J. Immunol 155 (10): 4996-5002 y la Publicación Internacional PCT WO 94/10332. La línea celular que produce el anticuerpo 1122 fue depositada en la Colección Americana de Cultivos Tipo bajo la designación HA022CL1 y tiene el número de acceso CRL 11177.

En todavía otras modalidades, la especificidad de enlace para un receptor Fc se proporciona mediante un anticuerpo que se enlaza a un receptor de la IgA humana, por ejemplo, un receptor Fc-alfa (Fc α RI (CD89), el enlace de la cual no tiene que estar bloqueado por la inmunoglobulina A humana (IgA). El término "receptor de IgA" pretende incluir el producto del gen de un gen (Fc α RI) localizado en el cromosoma 19. Este gen se sabe que codifica varias isoformas de transmembrana divididas alternativamente de 55 a 110 kDa. El Fc α RI (CD89) se expresa constitutivamente en los monocitos/macrófagos, los granulocitos eosinófilos y neutrófilos, pero no sobre poblaciones de células no efectoras. El Fc α RI tiene afinidad del medio ($5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) tanto para la IgA1 como para la IgA2, que aumenta después de la exposición a las citoquinas tales como la G-CSF o la GM-CSF (Morton, H.C. y colaboradores, 1996 Critical Reviews in Immunology 116:423-440). Cuatro anticuerpos monoclonales específicos para Fc α RI, identificados como A3, A59, A62 y A77, que enlazan el Fc α RI fuera del dominio del enlace del ligando IgA, han sido descritos (Monteiro, R.C. y colaboradores, 1992 J. Immunol. 148:1764).

Fc α RI y Fc γ RI son receptores disparadores para su uso en las moléculas biespecíficas de la invención debido a que se expresan principalmente sobre las células efectoras inmunes, por ejemplo, los monocitos, PMN, los macrófagos y las células dendríticas; expresados a altos niveles (por ejemplo, 5,000-100,000 por célula); los mediadores de las actividades citotóxicas (por ejemplo, ADCC, fagocitosis); median la presentación aumentada de antígeno de los antígenos, incluyendo a los autoantígenos, dirigidos hacia ellos.

Otros anticuerpos que se pueden emplear en las moléculas biespecíficas de la invención son los anticuerpos monoclonales murinos, quiméricos y humanizados.

Las moléculas biespecíficas de la presente invención se pueden preparar conjugando las especificidades de enlace de los constituyentes, por ejemplo, las especificidades de enlace anti-FcR y anti-hTSLP, usando los métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de enlace de la molécula biespecífica se puede generar por separado y luego conjugar entre sí. Cuando las especificidades de enlace son proteínas o péptidos, se puede usar una variedad de agentes de acoplamiento o de reticulación para la conjugación covalente. Los ejemplos de los agentes de reticulación incluyen la Proteína A, la carbodiimida, el tio-acetato de N-succinimidil-2-acetilo (SATA), el 5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzoico) (DTNB), la o-fenilendimaleimida (oPDM), el 3-(2-piridiltio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), y el 4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (sulfa-SMCC) (véanse por ejemplo, Karpovsky y colaboradores, 1984 J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA y colaboradores, 1985 Proc. Natl. Acad. Sci USA 82:8648). Otros métodos incluyen los descritos en Paulus, 1985 Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan y colaboradores, 1985 Science 229:81-83), y Glennie y colaboradores, 1987 J. Immunol. 139: 2367-2375). Los agentes de conjugación son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles en Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Cuando las especificidades de enlace son anticuerpos, se pueden conjugar mediante enlaces sulfhidrilo de la regiones de la articulación del término C de las dos cadenas pesadas. En una modalidad particular, la región articulada se modifica para contener un número impar de residuos sulfhidrilo, por ejemplo uno, antes de la conjugación.

De manera alternativa, ambas especificidades de enlace se pueden codificar en el mismo vector y expresar y ensamblar en la misma célula huésped. Este método es particularmente útil cuando la molécula biespecífica es una proteína de fusión mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ o un ligando x proteína de fusión Fab.

Una molécula biespecífica de la invención puede ser una molécula de cadena simple que comprende un anticuerpo de cadena simple y un determinante de enlace, o una molécula biespecífica de cadena simple que comprende dos determinantes de enlace. Las moléculas biespecíficas pueden comprender cuando menos dos moléculas de cadena simple. Los métodos para preparar las moléculas biespecíficas se describen por ejemplo en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números: 5,260,203; 5,455,030; 4,881,175; 5,132,405; 5,091,513; 5,476,786; 5,013,653; 5,258,498; y 5,482,858.

El enlace de las moléculas biespecíficas a sus objetivos específicos se puede confirmar mediante, por ejemplo, el ensayo inmunsorbente de enzima enlazada (ELISA), el radioinmunoensayo (REA), el análisis FACS, el bioensayo (por ejemplo, la inhibición del crecimiento), o el ensayo Western Blot. Cada uno de estos ensayos generalmente detecta la presencia de complejos de proteína-anticuerpo de interés particular empleando un reactivo etiquetado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés. Por ejemplo, los complejos FcR-anticuerpo se pueden detectar usando por ejemplo un anticuerpo enlazado a una enzima o a un fragmento de anticuerpo que reconoce y específicamente se enlaza a los complejos anticuerpo-FcR. De manera alternativa, los complejos se pueden detectar usando cualquiera de una variedad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, el anticuerpo se puede

etiquetar 4 radioactivamente y usar un radioinmunoensayo (RIA) (véase por ejemplo, Weintraub; B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, Marzo, 1986). El isótopo radioactivo se puede detectar por medios tales como el uso de un contador γ o un contador de escintilación o mediante autorradiografía.

5 Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene una o una combinación de anticuerpos monoclonales, o porción o porciones de enlace a antígeno de los mismos, de la presente invención, formulada junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones pueden incluir una o una combinación de (por ejemplo dos o más diferentes) anticuerpos, o
10 inmuoconjugados o moléculas biespecíficas de la invención. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención puede comprender una combinación de anticuerpos (o inmuoconjugados o biespecíficos) que se enlazan a diferentes epitopos sobre el antígeno objetivo o que tienen actividades complementarias.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden administrar en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo anti-hTSLP de la presente invención combinado con cuando menos algún otro agente anti-inflamatorio. Los ejemplos de los
15 agentes terapéuticos que se pueden usar en terapia de combinación se describen en mayor detalle más adelante en la sección sobre los usos de los anticuerpos de la invención.

Como se usa en la presente, "un vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y los similares que sean fisiológicamente compatibles. El vehículo deberá ser conveniente para la
20 administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, el anticuerpo, inmuoconjugado, o molécula biespecífica, se puede recubrir con un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y de otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Los compuestos farmacéuticos de la invención pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto progenitor y no imparte ningún efecto toxicológico no deseado (véase por ejemplo, Berge, S.M., y colaboradores, 1977 J. Pharm. Sci. 66:1-19). Los ejemplos de estas sales incluyen a las sales de adición ácida y a las sales de adición básica. Las sales de adición ácida incluyen las derivadas de los ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como el
30 clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como los ácidos orgánicos no tóxicos tales como los ácidos alifáticos mono- y di-carboxílicos, los ácidos alcanóicos sustituidos por fenilo, los ácidos hidroxialcanóicos, los ácidos aromáticos, los ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición básica incluyen las derivadas de los metales alcalinotérreos, tales como el sodio, el potasio, el magnesio, el calcio y similares, así como las aminas orgánicas no tóxicas, tales como la N,N'-dibenciletilendiamina, la N-metilglucamina, la cloroprocaina, la colina, la dietanolamina, la etilendiamina, la procaina y similares.

Una composición farmacéutica de la invención también puede incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; los antioxidantes solubles en aceite, tales como el palmitato de ascorbilo, el hidroxianisol butilado (BHA), el
40 hidroxitolueno butilado (BHT), la lecitina, el galato de propilo, el alfa-tocoferol, y similares; y los agentes quelantes de metales, tales como el ácido cítrico, el ácido etilendiamino tetraacético (EDTA), el sorbitol, el ácido tartárico, el ácido fosfórico, y similares.

Los ejemplos de vehículos convenientes acuosos y no acuosos que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y las mezclas convenientes de los mismos, los aceites vegetales tales como el aceite de olivo, y los ésteres orgánicos inyectables, tales como el oleato de etilo. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de las partículas requerido en el caso de las dispersiones, y mediante el uso de tensoactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como preservativos, agentes humectantes, agentes emulsificantes y agentes dispersantes. Se puede asegurar la prevención de la presencia de microorganismos tanto mediante procedimientos de esterilización, supra, como mediante la inclusión de varios agentes antibacterianos y antihongos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenol sórbico, y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares en las composiciones. En adición, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede llevar a la inclusión
55 de agentes que retrasan la absorción tales como el monoestearato de aluminio y la gelatina.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas estériles o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de las soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de estos medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. Se contempla el uso de cualquier medio convencional o agente en las composiciones farmacéuticas de la invención, con excepción de los que sean incompatibles con el compuesto activo. También se pueden incorporar en las composiciones los compuestos activos suplementarios.

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma, u otras estructuras ordenadas convenientes para la alta concentración del fármaco. El vehículo puede ser un solvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y las mezclas convenientes de los mismos. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensoactivos. En muchos casos, se pueden incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. Se puede lograr la absorción prolongada de las composiciones inyectables al incluir en la composición un agente que retrasa la absorción por ejemplo, las sales de monoestearato y la gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por la microfiltración para la esterilización. En general, se preparan las dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos a partir de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son el secado al vacío y el secado por congelación (liofilización) que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución filtrada previamente esterilizada de los mismos.

La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una forma de dosis única variará dependiendo del sujeto que se está tratando, y del modo particular de administración. La cantidad del ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una forma de dosis única generalmente será la cantidad de la composición que produzca un efecto terapéutico. Generalmente, partiendo del cien por ciento, esta cantidad variará desde aproximadamente 0.01 por ciento hasta aproximadamente noventa y nueve por ciento de ingrediente activo, desde aproximadamente 0.1 por ciento hasta aproximadamente 70 por ciento, o desde aproximadamente 1 por ciento hasta aproximadamente 30 por ciento del ingrediente activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se ajustan los regímenes de dosificación para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas durante el tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente como lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en forma de unidad de dosis para la facilidad de administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosis como se usa en la presente se refiere a unidades discretas físicamente adaptadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que se van a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de unidad de dosis de la invención son dictadas por y directamente dependen de las características exclusivas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular que se va a lograr, y las limitaciones inherentes en la técnica de hacer compuestos de este compuesto activo para el tratamiento de la sensibilización en los individuos.

Para la administración del anticuerpo, la dosificación varía de entre aproximadamente 0.0001 a 100 miligramos/kilogramo, y más usualmente de 0.01 a 5 miligramos/kilogramo, del peso corporal del anfitrión. Por ejemplo las dosis pueden ser de 0.3 miligramos/kilogramo de peso corporal, 1 miligramo/kilogramo de peso corporal, 3 miligramos/kilogramo de peso corporal, 5 miligramos/kilogramo de peso corporal ó 10 miligramos/kilogramo de peso corporal o dentro del rango de 1-10 miligramos/kilogramo. Un régimen de tratamiento de ejemplo conlleva la administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez cada tres a 6 meses. Los regímenes de dosificación para un anticuerpo anti-hTSLP de la invención incluyen 1 miligramo/kilogramo de peso corporal o 3 miligramos/kilogramo de peso corporal mediante la administración intravenosa, con el anticuerpo dado usando una de los siguientes programas de dosificación: cada cuatro semanas para seis dosis, luego cada tres meses; cada tres semanas; 3 miligramos/kilogramo de peso corporal una vez seguido por 1 miligramo/kilogramo de peso corporal cada tres semanas.

En algunos métodos, se administran simultáneamente dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de enlace, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado cae dentro de los intervalos indicados. El anticuerpo usualmente se administra en múltiples ocasiones. Los intervalos entre las dosis solas

pueden ser, por ejemplo, semanales, mensuales, cada tres meses o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indica midiendo los niveles en la sangre del anticuerpo para el antígeno objetivo del paciente. En algunos métodos, se ajusta la dosificación para lograr una concentración de anticuerpos en plasma de aproximadamente de 1 a 1000 microgramos/mililitro y en algunos métodos de aproximadamente de 25 a 300 microgramos/mililitro.

Alternativamente, el anticuerpo se puede administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia varían dependiendo de la vida media del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la vida media más larga, seguida por los anticuerpos humanizados, los anticuerpos quiméricos, y los anticuerpos no humanos. La dosificación y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosis relativamente baja a intervalos relativamente poco frecuentes durante un largo periodo de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo el tratamiento por el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, algunas veces se requiere una dosificación relativamente alta en intervalos relativamente cortos hasta que el avance de la enfermedad se reduzca o termine o hasta que el paciente muestre un mejoramiento parcial o completo de los síntomas de la enfermedad. Después de eso, se le puede administrar al paciente un régimen profiláctico.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden variar de manera que se obtenga una cantidad de ingrediente activo el cual sea efectivo para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, una composición, y un modo de administración particulares, sin ser tóxica para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticas incluyendo la actividad de las composiciones particulares empleadas de la presente invención, o del éster, la sal o la amida de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la condición, la salud general y la historia médica anterior del paciente que se está tratando, y factores similares muy conocidos en las técnicas médicas.

Una "dosificación terapéuticamente efectiva" de un anticuerpo anti-hTSLP de la invención puede dar como resultado una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los periodos sin síntomas de la enfermedad, o una prevención de la discapacidad o inhabilitación debida a la aflicción de la enfermedad.

Una composición de la presente invención se puede administrar por una o más vías de administración usando uno o más de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como lo apreciarán los expertos en la técnica, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Las vías de administración para los anticuerpos de la invención incluyen la vía intravenosa, la intramuscular, la intradérmica, la intraperitoneal, la subcutánea, la espinal u otras rutas parenterales de administración, por ejemplo mediante inyección o infusión. La frase "administración parenteral" como se usa en la presente significa modos de administración distintos de la administración enteral o tópica, usualmente mediante inyección e incluye, sin limitación, la intravenosa, la intramuscular, la intra-arterial, la intratecal, la intracapsular, la intraorbital, la intracardiaca, la intradérmica, la intraperitoneal, la transtraqueal, la subcutánea, la subcuticular, la intra-articular, la subcapsular, la subaracnoide, la intraespinal, la epidural y la inyección e infusión intrastemal.

Alternativamente, un anticuerpo de la invención se puede administrar por una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica, o mucosal, por ejemplo, por la vía intranasal, la vía oral, la vía vaginal, la vía rectal, la vía sublingual o tópicamente.

Los compuestos activos se pueden preparar con vehículos que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tales como la formulación de liberación controlada, incluyendo los implantes, los parches transdérmicos y los sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como el acetato de etilenvinilo, los polianhídridos, el ácido poliglicólico, el colágeno, los poliortoésteres, y el ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de estas formulaciones están patentados o son conocidos generalmente por los expertos en la técnica. Véase por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Las composiciones terapéuticas se pueden administrar con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una modalidad, una composición terapéutica de la invención se puede administrar con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos mostrados en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824 ó 4,596,556. Los ejemplos de implantes y módulos muy conocidos útiles en la presente invención incluyen: la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,487,603, que muestra una bomba de microinfusión implantable para administrar medicamento a una tasa controlada; la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,486,194, que muestra un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; la Patente de los Estados

Unidos de Norteamérica Número 4,447,233, que muestra una bomba de infusión de medicación para administrar el medicamento a una tasa de infusión precisa; la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,447,224, que muestra un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármacos; la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,439,196, que muestra un sistema de administración de fármaco osmótico que tiene compartimientos de múltiples cámaras; y la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,475,196, que muestra un sistema de administración osmótica de fármacos. Los expertos en la técnica conocen muchos otros implantes, sistemas de administración y módulos.

En ciertas modalidades, los anticuerpos monoclonales humanos de la invención se pueden formular para asegurar la distribución apropiada en vivo. Por ejemplo, la barrera de sangre-cerebro (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrofílicos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la invención crucen la barrera sangre-cerebro (si se desea), se pueden formular, por ejemplo, en liposomas. Para los métodos de fabricar los liposomas, véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 4,522,811; 5,374,548; y 5,399,331. Los liposomas pueden comprender una o más fracciones que sean selectivamente transportadas hacia las células o los órganos específicos, de este modo mejoran la administración dirigida del fármaco (véase, por ejemplo, V.V. Ranade, 1989 J. Cline Pharmacol. 29:685). Las fracciones objetivas de ejemplo incluyen el folato o la biotina (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,416,016 para Low y colaboradores); las manosidas (Umezawa y colaboradores, 1988 Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); los anticuerpos (P.G. Bloeman y colaboradores, 1995 FEBS Lett. 357:140; M. Owais y colaboradores, 1995 Antimicrob. Agents Chemother. 39:180; receptor de proteína A tensoactiva (Briscoe y colaboradores, 1995 Am. J. Physiol. 1233:134); pág. 120 (Schreier y colaboradores, 1994 J. Biol. Chem. 269:9090); véase también K. Keinanen; M.L. Laukkanen, 1994 FEBS Lett. 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler, 1994 Immunomethods 4:273.

Usos y métodos de la invención

Los anticuerpos (y los inmunoconjugados y las moléculas biespecíficas) de la presente invención tienen utilidades de diagnóstico y terapéutico in vitro y en vivo. Por ejemplo, estas moléculas se pueden administrar en células en cultivo, por ejemplo in vitro o en vivo, o en un sujeto, por ejemplo en vivo, para tratar, prevenir o diagnosticar una variedad de desórdenes. El término "sujeto" como se usa en la presente pretende incluir animales humanos y no humanos. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como los primates no humanos, las ovejas, los perros, los gatos, las vacas, los caballos, los pollos, los anfibios, y los reptiles. Los métodos son particularmente convenientes para tratar pacientes humanos que tienen un desorden asociado con una expresión aberrante de la hTSLP. Cuando los anticuerpos para la hTSLP se administran junto con otro agente, los dos se pueden administrar ya sea por orden o simultáneamente.

En una modalidad, los anticuerpos (y los inmunoconjugados y moléculas biespecíficas) de la invención se pueden usar para detectar los niveles de la hTSLP, o los niveles de las células que contienen la hTSLP. Esto se puede lograr, por ejemplo, poniendo en contacto una muestra (tal como una muestra in vitro) y una muestra de control con el anticuerpo anti-hTSLP bajo las condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo y la hTSLP. Los complejos formados entre el anticuerpo y la hTSLP se detectan y se comparan en la muestra y en el control. Por ejemplo, los métodos de detección estándares, muy conocidos en la técnica, tales como el ELISA y los ensayos citométricos de flujo, se pueden realizar usando las composiciones de la invención.

De conformidad con lo anterior, en un aspecto, la invención además proporciona métodos para detectar la presencia de la hTSLP (por ejemplo, el antígeno de la hTSLP) en una muestra, o para medir la cantidad de hTSLP, que comprenden poner en contacto la muestra, y la muestra de control, con un anticuerpo de la invención, o una porción de enlace de antígeno del mismo, que específicamente se enlace con la hTSLP, bajo condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo o la porción del mismo y la hTSLP. Se detecta la formación de un complejo entonces, en donde una diferencia en la formación de complejo entre la muestra comparada con la muestra de control es indicadora de la presencia de la hTSLP en la muestra.

También dentro del alcance de la invención están los kits que consisten en las composiciones (por ejemplo, los anticuerpos, los anticuerpos humanos, los inmunoconjugados y las moléculas biespecíficas) de la invención y las instrucciones para su uso. El kit además puede contener por lo menos un aditivo adicional, o uno o más anticuerpos adicionales de la invención (por ejemplo, un anticuerpo que tenga una actividad complementaria que se enlaza a un epitopo sobre un antígeno objetivo distinto del primer anticuerpo). Los kits típicamente incluyen una etiqueta indicando el uso pretendido del contenido del kit. El término etiqueta incluye cualquier material escrito, o grabado suministrado sobre o con el kit, o el cual de otro modo acompaña al kit.

Habiendo descrito por completo la invención, se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos y reivindicaciones, los cuales son ilustrativos y no pretenden ser limitantes. Los expertos en la técnica reconocerán o serán capaces de constatar usando nada más que la experimentación de rutina, numerosos equivalentes a los procedimientos específicos descritos en la presente. Estos equivalentes están dentro del alcance de la presente invención y de las reivindicaciones.

Los siguientes ejemplos describen el anticuerpo anti-humano TSLP monoclonal, en particular monoclonal humano, que específicamente se enlaza a la TSLP humana y neutraliza su actividad biológica en diferentes ensayos basados en células, incluyendo ensayos en células humanas primarias. Los anticuerpos desarrollados mostraron una afinidad extremadamente alta en el intervalo pM bajo.

5 Ejemplos

Para la generación de los anticuerpos terapéuticos contra la proteína TSLP humana, se llevaron a cabo selecciones con la biblioteca de despliegue de fagos MorphoSys HuCAL GOLD®. HuCAL GOLD® es una biblioteca de Fab basada en el concepto HuCAL^{®6-8,9}, en el cual las seis CDR se diversifican, y que emplea la tecnología de CysDisplay^{MR} para enlazar los fragmentos Fab a la superficie del fago¹⁰.

10 **Ejemplo 1:** Generación de los anticuerpos específicos para la TSLP humana a partir de la biblioteca HuCAL GOLD®

Rescate de fagémidos, amplificación de fagos, y purificación

15 La biblioteca HuCAL GOLD® se amplificó en un medio 2xYT que contenía 34 microgramos/mililitro de cloranfenicol y 1 por ciento de glucosa (2xYT-CG). Después de la infección con fagos ayudantes VCSM13 a una OD_{600nm} de 0.5 (30 minutos a 37°C sin agitación; 30 minutos a 37°C con agitación a 250 rpm), las células se centrifugaron (4120g; 5 minutos; 4°C), se resuspendieron en 2xYT/34 microgramos/mililitro de cloranfenicol/50 microgramos/mililitro de canamicina/0.25 mM de IPTG y se cultivaron durante la noche a 22°C. Los fagos fueron precipitados con PEG dos veces a partir del sobrenadante, se resuspendieron en PBS/20 por ciento de glicerol y se almacenaron a -80°C.

20 La amplificación de fagos entre dos rondas de lavado en batea se llevó a cabo como sigue: las células TG1 de *E. coli* de fase mid-log se infectaron con fagos eluidos y se plaquearon sobre LB-agar suplementado con 1 por ciento de glucosa y 34 microgramos/mililitro de cloranfenicol (placas de LB-CG). Después de la incubación durante la noche a 30°C, las colonias de TG1 se rascaron de las placas de agar y se usaron para inocular 2xYT-CG hasta que se alcanzó una OD_{600nm} de 0.5 y se añadieron fagos ayudantes VCSM13 para la infección como se describió anteriormente.

Lavados con batea con HuCAL GOLD®

25 Para la selección de los anticuerpos que reconocen la TSLP humana se aplicaron dos estrategias diferentes de lavados con batea. En resumen, los fagos-anticuerpos HuCAL GOLD® se dividieron en cuatro depósitos que comprendían diferentes combinaciones de genes maestros de VH (depósito 1: VH1/T λκ, depósito 2: VH3 λκ, depósito 3: VH2/4/6 λκ, depósito 4: VH1-6 λκ). Estos depósitos se sometieron individualmente a tres rondas de lavado con batea de fase sólida sobre la TSLP humana directamente recubierta para las placas Maxisorp y en adición tres de los lavados con batea de la solución sobre la TSLP biotinilada.

El primer variante del lavado con batea fue el lavado con batea en fase sólida contra la TSLP humana:

35 Dos pozos sobre una placa Maxisorp (F96 Nunc-Immunoplate) se recubrieron con 300 microlitros de 50 microgramos/mililitro de TSLP- cada uno durante la noche a 4°C. Los pozos recubiertos se lavaron dos veces con 350 microlitros de PBS y se bloquearon con 350 microlitros de 5 por ciento de MPS durante 2 horas a temperatura ambiente sobre un agitador de placas de microtitulación. Para cada lavado con batea se bloquearon aproximadamente 10¹³ fagos-anticuerpos HuCAL GOLD® con igual volumen de PBST/5 por ciento MP durante 2 horas a temperatura ambiente. Los pozos recubiertos se lavaron dos veces con 350 microlitros de PBS después del bloqueo. 300 microlitros de los fagos-anticuerpos HuCAL GOLD® pre-bloqueo se añadieron a cada pozo recubierto y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador. El lavado se realizó añadiendo cinco veces

40 350 microlitros de PBS/0.05 por ciento de Tween seguido por lavado otras cuatro veces con PBS. La elución del fago de la placa se realizó con 300 microlitros de 20 mM DTT en 10 mM de Tris/HCl pH 8 por pozo durante 10 minutos. El eluido del fago DTT se añadió a 14 mililitros de TG1 de *E. coli*, los cuales se cultivaron hasta una OD₆₀₀ de 0.6-0.8 a 37°C en un medio de 2YT y se incubaron en tubos plásticos de 50 mililitros durante 45 minutos a 37°C sin agitación para la infección por fago. Después de la centrifugación durante 10 minutos a 5000 rpm, los

45 aglomerados de bacterias se resuspendieron cada uno en 500 microlitros de medio 2xYT, se plaquearon sobre placas de agar de 2xYT-CG y se incubaron durante la noche a 30°C. Las colonias se rasparon de las placas y los fagos se rescataron y se amplificaron como se describe anteriormente. La segunda y tercera rondas del lavado con batea de la fase sólida sobre la TSLP directamente recubierta se realizó de acuerdo con el protocolo de la primera ronda excepto porque se aumentó lo estricto del procedimiento de lavado.

50 La segunda variante del lavado con batea fue lavar con batea la solución contra la TSLP humana biotinilada:

Para el lavado con batea de la solución, usando la TSLP biotinilada acoplada con cuentas Dynabeads M-280 (Dyna), se aplicó el siguiente protocolo: tubos Eppendorf de 1.5 mililitros se bloquearon con 1.5 mililitros de

2xChemiblocker diluido 1:1 con PBS durante la noche a 4°C. 200 microlitros de estreptavidina recubierta con cuentas magnéticas Dynabeads M-280 (Dyna) se lavaron una vez con 200 microlitros de PBS y se resuspendieron en 200 microlitros 1xChemiblocker (diluido en 1x PBS). El bloqueo de las cuentas se realizó en tubos previamente bloqueados durante la noche a 4°C. Los fagos diluidos en 500 microlitros de PBS para cada condición de lavado con 5 10 15 20 25

batea se mezclaron con 500 microlitros 2xChemiblocker/0.1 por ciento de Tween 1 hora a temperatura ambiente (rotador). Se realizó la pre-adsorción de los fagos dos veces: 50 microlitros de cuentas magnéticas de estreptavidina bloqueadas se añadieron a los fagos bloqueados y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en un rotador. Después de la separación de las cuentas vía un dispositivo magnético (Dyna MPC-E) el sobrenadante de los fagos (aproximadamente 1 mililitro) se transfirió a un nuevo tubo bloqueado y se repitió la preadsorción sobre las cuentas bloqueadas de 50 microlitros durante 30 minutos. Luego, se añadieron 200 nM de hTSLP biotinilada a los fagos bloqueados en un nuevo tubo bloqueado de 1.5 mililitros y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en un rotador. 100 microlitros de cuentas magnéticas de estreptavidina bloqueada se añadieron a cada depósito de fago de lavado con batea y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente en un rotador. Los fagos enlazados a la TSLP biotinilada se inmovilizaron para las cuentas magnéticas que se recolectaron con un separador de partículas magnéticas (Dyna MPC-E). Las cuentas se lavaron 7 veces en PBS/0.05 por ciento de Tween usando un rotador, seguido por lavado otras tres veces con PBS. La elución de los fagos de las cuentas Dynabeads se realizó añadiendo 300 microlitros 20 mM de DTT en 10 mM de Tris/HCl con pH 8 para cada tubo durante 10 minutos. Las Dynabeads se removieron mediante un separador de partículas magnéticas y el sobrenadante se añadió a 14 mililitros de un cultivo de TG-1 de *E. coli* cultivado hasta una OD_{600nm} de 0.6-0.8. Las cuentas se lavaron una vez con 200 microlitros de PBS y juntas con los fagos adicionalmente removidos se añadió el PBS a los 14 mililitros de cultivo de TG-1 de *E. coli*. Para la infección de los fagos, el cultivo se incubó en tubos plásticos de 50 mililitros durante 45 minutos a 37°C sin agitación. Después de la centrifugación durante 10 minutos a 5000 rpm, los aglomerados bacterianos se resuspendieron cada uno en 500 microlitros del medio 2xYT, se plaquearon sobre placas de agar de 2xYT-CG y se incubaron durante la noche a 30°C. Las colonias se rasparon de las placas y los fagos se rescataron y se amplificaron como se describió anteriormente.

La segunda y tercera rondas del lavado con batea de la solución sobre la TSLP biotinilada se realizó de acuerdo con el protocolo de la primera ronda excepto que aumentó lo estricto del procedimiento de lavado.

Subclonación y expresión de fragmentos Fab solubles

30 Los insertos de codificación Fab de los fagémidos HuCAL GOLD[®] seleccionados fueron subclonados en el vector de expresión pMORPH[®]X9_Fab_FH (Figura 1) con el fin de facilitar la rápida y eficiente expresión de los Fabs solubles. Con este fin, el ADN del plásmido de las clonas seleccionadas fue digerido con *Xba*I y *Eco*RI, mediante lo cual se divide el inserto de codificación de Fab (*ompA*-VLCL y *phoA*-Fd), y se clona en el vector de expresión pMORPH[®]X9_Fab_FH digerido con *Xba*I/*Eco*RI. Los Fabs expresados a partir de este vector llevan dos etiquetas terminales C (FLAG^{MR} y 6xHis, respectivamente) tanto para la detección como para la purificación.

35 Microexpresión de los anticuerpos Fab HuCAL GOLD[®] en *E. coli*

40 Se usaron colonias simples resistentes al cloranfenicol obtenidas después de subclonar los Fabs seleccionados en el vector de expresión pMORPH[®]X9_Fab_FH para inocular los pozos de una charola de microtitulación de 96 pozos estéril que contenía 100 microlitros de medio 2xYT-CG por pozo y se cultivó durante la noche a 37°C. 5 microlitros de cada cultivo de TG-1 de *E. Coli* se transfirieron a una charola de microtitulación de 96 pozos estéril nueva previamente llenada con 100 microlitros de medio 2xYT suplementado con 34 microgramos/mililitro de cloranfenicol y 0.1 por ciento de glucosa por pozo. Las placas de microtitulación se incubaron a 30°C agitándolas a 400 rpm sobre un agitador de microplacas hasta que los cultivos quedaron ligeramente turbios (aproximadamente de 2 a 4 horas) con una OD_{600nm} de aproximadamente 0.5.

45 A estas placas de expresión, se añadieron 20 microlitros de medio 2xYT suplementado con 34 microgramos/mililitro de cloranfenicol y 3 mM de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosida) por pozo (concentración final 0.5 mM de IPTG), las placas de microtitulación se sellaron con una cinta permeable al gas, y se incubaron durante la noche a 30°C agitándolas a 400 rpm.

50 Generación de los lisados de las células enteras (extractos BEL): a cada pozo de las placas de expresión, se añadieron 40 microlitros de regulador BEL (2xBBS/EDTA: 24.7 gramos/litro de ácido bórico, 18.7 gramos de NaCl/litro, 1.49 gramos de EDTA/litro, pH 8.0) que contenía 2.5 miligramos/mililitro de lisozima y se incubó durante 1 hora a 22°C sobre un agitador con placa de microtitulación (400 rpm). Los extractos BEL se usaron para el análisis de enlace mediante el ELISA o un analizador Bio Veris M-series[®] 384 (véase el Ejemplo 2).

Técnicas del ensayo inmunsorbente de enzima enlazada (ELISA)

55 5 microgramos/mililitro de TSLP recombinante humana (R&D Systems) en PBS se recubrió sobre placas Maxisorp de 384 pozos (Nunc-Immuplate) durante la noche a 4°C. Después de recubrir los pozos se lavaron una vez con

PBS/0.05 por ciento Tween (PBS-T) y 2 veces con PBS. Luego los pozos se bloquearon con PBS-T con 2 por ciento de BSA durante 2 horas a temperatura ambiente. En paralelo 15 microlitros de extracto de BEL y 15 microlitros de PBS-T con 2 por ciento de BSA se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas Maxisorp bloqueadas se lavaron 3 veces con PBS-T antes de que se añadieran 10 microlitros de los extractos BEL bloqueados a los pozos y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Para la detección de los anticuerpos Fab primarios, se aplicaron los siguientes anticuerpos secundarios: fragmento F(ab')₂ AffiniPure conjugado-fosfatasa alcalina (AP), IgG anti-humana, anti-ratón o anti-oveja de cabra (Jackson Immuno Research). Para la detección de los conjugados AP se usaron sustratos fluorogénicos como AttoPhos (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Entre todos los pasos de incubación, los pozos de la placa de microtitulación se lavaron con PBS-T tres veces y tres veces después de la incubación final con el anticuerpo secundario. Se midió la fluorescencia en un lector de placa espectraflúor TECAN.

Expresión de los anticuerpos Fab HuCAL GOLD[®] en *E. Coli* y purificación

La expresión de los fragmentos Fab codificados por pMORPH[®]X9_Fab_FH en las células TG-1 se llevó a cabo en cultivos de matraces con agitadores usando 750 mililitros de medio 2xYT suplementado con 34 microgramos/mililitro de cloranfenicol. Los cultivos se sacudieron a 30°C hasta que la OD_{600nm} alcanzó 0.5. La expresión se indujo mediante la acción de 0.75 mM de IPTG durante 20 horas a 30°C. Las células se rompieron usando lisozima y los fragmentos Fab se aislaron mediante cromatografía Ni-NTA (Qiagen, Hilden, Alemania). Las concentraciones de proteína se determinaron mediante espectrofotometría ultravioleta¹¹.

Ejemplo 2: Identificación de los candidatos a la neutralización del Fab de anti-TSLP humana que inhiben la señalización inducida por la TSLP del receptor de TSLP

Se probó la potencia de 22 anticuerpos específicos para la TSLP humana, los cuales se seleccionaron de la biblioteca HuCAL GOLD[®], para neutralizar la TSLP humana.

A. Bloqueo del enlace de la TSLP con el receptor de TSLP mediante Fabs anti-TSLP humana en el ensayo FACS

Se analizó la inhibición del enlace de la TSLP biotinilada para las células Ba/F3, que expresan la hTSLPR, hIL7R α mediante FACS. Los anticuerpos Fab se diluyeron en el regulador FACS (se lavaron las células (B&D)/3 por ciento FCS). 50 microlitros de TSLP biotinilada a 100 nanogramos/mililitro se incubaron con 50 microlitros de 100 microgramos/mililitro de Fab durante 1 hora a temperatura ambiente. Para evitar la internalización del receptor de TSLP todos los demás pasos con las células se llevaron a cabo a 4°C o sobre hielo. 100 microlitros de células Ba/F3 a 2x 10⁶ células/mililitro se transfirieron a cada pozo de una charola de 96 pozos (NUNC) y se centrifugaron a 2000 rpm; 4°C. Las células se lavaron 2 veces con 150 microlitros de regulador FACS frío, se resuspendieron con la mezcla de Fab/TSLP biotinilado y se incubaron durante 1 hora a 4°C sobre un sacudidor. Se añadió estreptavidina PE 1:400 en regulador FACS para la detección. Después de 30 minutos de incubación, las células se centrifugaron como se mencionó anteriormente y se lavaron 2 veces con 150 microlitros de regulador FACS frío. Se analizaron 5000 células de FACS. Las MOR04494, MOR04496, MOR04497 y MOR04609 mostraron inhibición del enlace celular.

Inhibición de la activación de la STAT5 dependiente de la TSLP

Se cultivaron células Ba/F3, que expresan hTSLPR, hIL7R α y un gen reportero Stat5-Luc, en presencia de 5 nanogramos/mililitro de TSLP. 10 microlitros de 1 x 10⁶ células/mililitro en regulador de ensayo (RPMI-1640 sin rojo de fenol, 10 por ciento FCS, penicilina 10 Uml⁻¹/estreptomycin 10 microgramos/ml⁻¹, 1 por ciento de puromicina) se añadieron a una placa blanca de 96 pozos Costar (Corning). Se añadieron 70 microlitros de regulador del ensayo y 10 microlitros de anticuerpo anti-TSLP (10x) en el regulador del ensayo y se incubaron durante 20 minutos a 37°C. Se añadieron 10 microlitros de 5 nanogramos/mililitro de TSLP (R&D Systems; 0.5 nanogramos/mililitro de concentración final) en el regulador del ensayo para dar un volumen final de ensayo de 100 microlitros. La charola se cubrió y se dejó durante 5-6 horas a 37°C en un incubador humidificado. A los pozos se añadieron 100 microlitros (1:1 con volumen de prueba) de luciferasa Bright-Glo^{MR} (Promega) y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. La charola se selló con TopSeal^{MR} antes de registrar la luminiscencia. MOR04493, MOR04494, MOR04496, MOR04497 y MOR04609 neutralizaron TSLP en esta prueba.

Determinación de la actividad neutralizante en el monocito primario

Aislamiento de los monocitos en sangre humana - se recolectaron 150 mililitros de sangre en voluntarios adultos sanos en el panel de donadores de NHRC. La sangre se recolectó en tubos que contenían 1 mililitro de anticoagulante (20 miligramos/mililitro de EDTA en PBS) por 10 mililitros de sangre y luego se diluyó con 12.5 mililitros de PBS por 20 mililitros de sangre. Los glóbulos rojos se sedimentaron mezclando la sangre diluida con 12.5 mililitros de dextrano al 4 por ciento (en PBS) por tubo y se incubó durante 40 minutos sobre hielo. Los PBMC se aislaron mediante centrifugación de densidad usando Ficoll y el "recubrimiento algodonoso" que contenía el

PBMC se recuperó usando un pastete de plástico. Las células se lavaron una vez (300 x g durante 7 minutos) en PBS y se contaron. El aislamiento por MACS de las células se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes usando el kit de aislamiento de monocitos II (Miltenyi Biotec). Todas las adiciones de regulador y los lavados fueron con regulador de MACS a 4°C (PBS, 0.5 por ciento BSA, 2mM de EDTA, pH 7.2) a menos que se estableciera otra cosa. En resumen, a 10^7 células, se añadieron 30 microlitros de regulador y 10 microlitros de cada uno de los reactivos bloqueadores de FcR y cóctel de biotina-anticuerpo, se mezclaron bien y se incubaron durante 10 minutos. Luego se añadieron otros 30 microlitros de regulador y 20 microlitros de microcuentas de anti-biotina a las células y se incubaron durante 15 minutos. Las células se lavaron (300 x g durante 10 minutos), se resuspendieron a 10^8 células por 500 microlitros de regulador y se aplicaron a la columna LS "cebada". La fracción del monocito "intocada" se recolectó reteniendo todos los otros tipos de células sobre la columna. Durante el procedimiento del aislamiento, las muestras se recolectaron para el análisis posterior mediante citometría de flujo.

Producción de TARC mediante los monocitos tratados con la TSLP y bloqueo de la respuesta con anticuerpos anti-TSLP - Monocitos aislados se resuspendieron a 1×10^6 células por mililitro de regulador de ensayo (RPMI 1640, 10 por ciento FCS, penicilina 10 unidades/mililitro/estreptomicina 10 microgramos/mililitro). Se añadieron 100 microlitros de células a cada pozo de una charola de fondo plano de 96 pozos para dar una concentración de 100,000 células por pozo. Se añadieron 80 microlitros del regulador del ensayo a los pozos que se usaron para la curva de respuesta de dosificación de TSLP y se añadieron 60 microlitros a los pozos en los cuales se iban a probar los anticuerpos anti-TSLP. Para la prueba de los anticuerpos anti-TSLP, se añadieron 20 microlitros de una solución de 10x caldo de cada anticuerpo anti-TSLP a las células y se incubaron a 37°C, 5 por ciento de CO₂ durante 20 minutos. Entonces se añadió la rhTSLP a 0.5 nanogramos/mililitro a cada pozo (20 microlitros de solución 10 x de caldo por pozo) que contenía el anticuerpo anti-TSLP. Se incluyó una curva de respuesta a la dosis de TSLP en cada charola. Las charolas se incubaron durante 24 horas a 37°C, 5 por ciento de CO₂ después de lo cual se cosecharon los sobrenadantes y se almacenaron a -20°C para futuros análisis.

ELISA de sobrenadantes de monocitos para medir TARC - Las mediciones de la producción de TARC en los sobrenadantes de los cultivos se llevó a cabo usando un juego ELISA de dos conjuntos de TARC humano (R + D Systems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, los sobrenadantes de los monocitos se diluyeron 1:2 en el regulador de la prueba (RPMI 1640, 10 por ciento FCS, penicilina 10 unidades/mililitro/estreptomicina 10 microgramos/mililitro) y se añadieron por triplicado a charolas de media área de 96 pozos previamente recubiertos con anticuerpo de captura de TARC. Las charolas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente, luego se lavaron de nuevo. 50 microlitros del anticuerpo monoclonal mAb de detección biotinilado se añadieron entonces a cada pozo y se incubaron durante otras 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y se añadió peroxidasa de rábano picante a 50 microlitros por pozo y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se llevó a cabo un lavado final y se añadieron 100 microlitros de sustrato TMB por pozo y las placas se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad. Se detuvo el desarrollo de color después de 20 minutos de incubación mediante la adición de 50 microlitros de hidróxido de sodio 1M. Las charolas se leyeron inmediatamente en un lector de microplacas Spectramax fijado a 450 nm (Molecular Devices). Los datos se analizaron usando el software SoftmaxPro y se calculó el porcentaje de inhibición de la respuesta de absorbancia máxima por los anticuerpos anti-TSLP usando una hoja de cálculo Excel.

Neutralización de la TSLP humana natural en el ensayo de gen receptor

La TSLP natural humana se generó tratando las células de fibroblastos humanos primarios (Clonetics), con un cóctel de citosina que contenía IL-1 β (1 nanogramo/mililitro), TNF- α (1 nanogramo/mililitro) e IL-13 (10 nanogramos/mililitro) durante 24 horas a 37°C en RPMI libre de rojo fenol que contenía 10 por ciento de FBS. El sobrenadante del cultivo celular que contenía la TSLP natural inducida mostró ser activa en el RGA descrito anteriormente.

Una dilución de 1 en 10 de la TSLP natural que contenía la TSLP correspondió aproximadamente al mismo nivel de actividad en el RGA que los 0.5 nanogramos/mililitro de rhTSLP y por lo tanto se usó como la dilución final cuando se probó la actividad de los anticuerpos candidatos.

Ensayo BioVeris de inhibición del enlace de la TSLP/receptor TSLP

Para el ensayo de inhibición de enlace de la TSLP, se acopló directamente la TSLP humana recombinante (R&D Systems) (Acoplamiento NHS/EDC) con cuentas magnéticas M-270 Dynal de ácido carboxílico. Se incubaron 50 microlitros de anticuerpos Fab por pozo (10 μ M de caldo, pasos de dilución 1:5) durante 2 horas con 25 microlitros de cuentas recubiertas con TSLP en charolas de 96 pozos (Nunc). Se añadieron 50 microlitros de 100 pM de receptor TSLP/fusión Fc y anticuerpo de detección Fc antihumano diluido 1:1000 etiquetado con BV-tag^{MR} de acuerdo con las instrucciones del proveedor (BioVeris, Europe, Witney, Oxfordshire, UK) a cada pozo y se incubaron durante 1 hora. (Concentración de Fab final: 32 nM - 4 μ M, concentración final de TSLP: 40 pM). La detección se realizó mediante BioVeris M-384 SERIES® Workstation (BioVeris Europe, Witney, Oxfordshire, UK). Las MOR04493, MOR04494, MOR04496, MOR04497, MOR04609, y MOR04832 mostraron inhibición del enlace con el receptor

TSLP en esta prueba.

Determinación de las afinidades nanomolares usando resonancia de plasmón superficial (Biacore)

5 Se realizó el análisis cinético SPR sobre un SA-chip (Biacore, Suecia) que había sido recubierto con una densidad de aproximadamente 400 RU de TSLP humana recombinante biotinilada. Una cantidad respectiva de albúmina de suero humano biotinilado (HSA) se inmovilizó sobre las células del flujo de referencia. Se usó PBS (136 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄ pH 7.4) como el regulador de la corrida. Los Fabs se aplicaron en series de concentración de 16 a 500 nM a un gasto de 20 microlitros/minuto. La fase de asociación se fijó en 60 segundos y la fase de disociación en 120 segundos. Las afinidades sumadas de los anticuerpos Fab progenitores 4493, 4494, 4496, 4497, 4832 y 4609 con la TSLP humana determinadas por este método están en el rango de 8 a 10 1400 nM.

Ejemplo 3: Maduración por afinidad de los Fabs anti-TSLP seleccionados mediante un intercambio paralelo de los casetes LCDR3 y HCDR2

B. Generación de bibliotecas de Fab para la maduración por afinidad

15 Con el fin de aumentar la afinidad de la actividad inhibidora de los anticuerpos anti-TSLP identificados, 6 clonas de Fab MOR04493, MO404494, MO404496, MO404497, MO404609, y MOR04832 se sometieron a una maduración por afinidad. Con este fin, se optimizaron las regiones CDR mediante mutagénesis de casete usando mutagénesis dirigida al trinucleótido^{12,13}.

20 El siguiente párrafo brevemente describe el protocolo usado para clonar las bibliotecas de maduración y la optimización de Fab. Fragmentos Fab del vector de expresión pMORPH[®]X9_Fab_FH se clonaron en el vector fagémido PMORPH[®]25 (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 6,753,136). Se aplicaron dos estrategias diferentes en paralelo para optimizar tanto la afinidad como la eficacia de los Fabs progenitores.

25 Se generaron seis bibliotecas de Fab de anticuerpos de fagos donde la LCDR3 de seis clonas progenitoras se reemplazaron por un repertorio de secuencias de la CDR3 de cadena ligera individuales. En paralelo, la región HCDR2 de cada clona progenitora fue reemplazada por un repertorio de secuencias de la CDR2 de cadena pesada individuales. Se generaron las bibliotecas de maduración por afinidad mediante procedimientos de clonación estándares y transformación de las clonas diversificadas en células TOP10F' de *E. coli* electrocompetentes (Invitrogen). Los fagos que presentan Fab se prepararon como se describe en el Ejemplo 1A. Se construyeron cuatro depósitos de maduración y se mantuvieron separados durante el proceso de selección posterior:

- depósito 1: bibliotecas CDR3 de MOR04493 y MOR04832
- 30 - depósito 2: bibliotecas HCDR2 de MOR04493 y MOR04832
- depósito 3: bibliotecas LCDR3 de MOR04494; MOR04496; MOR04497; MOR04609
- depósito 4: bibliotecas HCDR2 de MOR04494; MOR04496; MOR04497; MOR04609

Estrategias de lavado con batea de maduración

35 Se realizaron lavados con batea usando los cuatro depósitos de anticuerpo en una TSLP humana recombinante biotinilada (R&D Systems) en solución durante tres rondas, respectivamente, como se describe en el Ejemplo 1B, el lavado con batea de la solución contra la TSLP humana biotinilada. Lo estricto de la selección aumentó mediante la reducción del antígeno biotinilado desde la ronda de lavado con batea a ronda de lavado con batea, mediante pasos de lavado prolongados y mediante la adición de antígeno no biotinilado para la selección fuera de evaluación.

40 Análisis de enlace basado en electroquimioluminiscencia (BioVeris) para la detección de los Fab que enlazan la TSLP en lisados bacterianos

45 Se analizó el enlace de los anticuerpos Fab optimizados en los lisados de *E. coli* (extractos BEL) para la TSLP en BioVeris M-SERIES[®] 384 AnalyzerBioVeris, Europe, Witney, Oxfordshire, RU). Se diluyeron los extractos de BEL en el regulador de ensayo (PBS/0.05 por ciento Tween 20/0.5 por ciento BSA) para su uso en la selección BioVeris. La TSLP biotinilada (R&D Systems) se acopló con cuentas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina, el (Fab)₂ antihumano (Dianova) se etiquetó con rutenio usando la etiqueta BV-tag^{MR} (BioVeris Europe, Witney, Oxfordshire, RU). Este anticuerpo secundario se añadió a las cuentas acopladas con TSLP antes de medirlas en el analizador BioVeris M-SERIES[®] 384. Después del análisis de las secuencias de los alcances desde la selección BioVeris, se identificaron 20 clonas Fab únicas: MOR05008; MOR05009; MOR05010; MOR05011; MOR05012; MOR05013;

MOR05014; MOR05015; MOR05016; MOR05017; MOR05018; MOR05019; MOR05020; MOR05021; MOR05022; MOR05023; MOR05024; MOR05025; MOR05026; MOR05027.

Conversión de IgG y transfección cruzada de dos cadenas variables independientemente optimizadas con el fin de mejorar adicionalmente las afinidades de los anticuerpos

5 Los 20 anticuerpos Fab optimizados se subclonaron en formato IgG1. La afinidad de los 20 IgG1 de MOR05008; MOR05009; MOR05010; MOR05011; MOR05012; MOR05013; MOR05014; MOR05015; MOR05016; MOR05017; MOR05018; MOR05019; MOR05020; MOR05021; MOR05022; MOR05023; MOR05024; MOR05025; MOR05026; MOR05027 se midió en una titulación de equilibrio de la solución a partir del sobrenadante del cultivo de tejido.

10 Para otro mejoramiento de la afinidad las H-CDR2 y L-CDR3 optimizadas independientemente a partir de IgG1s maduras, las cuales se derivaron de la misma clona progenitora, se combinaron, debido a que había una alta probabilidad que esta combinación conduciría a una ganancia adicional de afinidad¹⁴⁻¹⁶. La cadena pesada y la cadena ligera de la IgG1 estaban en vectores separados y por lo tanto mediante transfección cruzada fue posible combinar las dos cadenas diferentes optimizadas las cuales se coexpresaron entonces en una célula y se ensamblaron a los anticuerpos IgG. Este método se aplicó para los enlazadores que se derivaron de la clona progenitora MOR04494 y MOR04497, donde se identificaron cadenas optimizadas en paralelo tanto en la biblioteca H-CDR2 como en la L-CDR3. Para la MOR04494 las seis cadenas pesadas optimizadas a partir de MOR05010 - MOR05015 se combinaron una por una con las tres cadenas ligeras optimizadas de MOR05016 - MOR05018 dando como resultado 18 nuevos anticuerpos. Para MOR04497 la cadena optimizada H-CDR2 de MOR05019 se combinó con las tres cadenas ligeras optimizadas de MOR05020 - MOR05022 dando como resultado 3 anticuerpos nuevos.

20 Determinación de afinidades picomolares usando la titulación de equilibrio de la solución (SET)

Para la determinación de K_D , se usaron fracciones de monómeros (cuando menos 90 por ciento de contenido de monómero, analizados mediante SEC analítico; Superdex75, Amersham Pharmacia) de Fab. En adición fue posible determinar las afinidades de IgG1, ya que la TSLP del antígeno se supone que es un monómero en solución. Se realizaron la determinación por afinidad basada en electroquimioluminiscencia (ECL) en solución y la evaluación de los datos básicamente como lo describen Haenel, y colaboradores, 2005. Una cantidad constante de Fab o IgG1 se equilibró con diferentes concentraciones (diluciones en serie de 3^n) de TSLP humana recombinante (R&D Systems) en solución. La TSLP humana biotinilada acoplada con cuentas paramagnéticas (M-280 Streptavidin, Dynal), y etiquetadas con BV-tag^{MR} (BioVeris Europe, Witney, Oxfordshire, RU) (Fab)₂ antihumana (Dianova) se añadió y la mezcla se incubó durante 30 minutos. Posteriormente, la concentración de Fab no unida se cuantificó vía detección por ECL usando el analizador M-SERIES[®] 384 (BioVeris Europe).

La detección por afinidad para la TSLP de cinomolgus (la expresión mamífera y purificación en NVS) en solución se hizo esencialmente como se describe anteriormente reemplazando la TSLP humana por la TSLP de cinomolgus. Para la detección del Fab libre, se usó la TSLP acoplada con cuentas paramagnéticas. Las afinidades se calcularon de acuerdo con Haenel y colaboradores. (2005)¹⁷. Usando las condiciones de ensayo descritas anteriormente, se determinaron las afinidades (monoméricas) para las IgGs anti-TSLP de afinidad-optimizada en solución. Las afinidades para la TSLP humana y de cinomolgus se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5: Afinidades de la IgG1 optimizada

Pares VH-/VL para IgG		IgG	TSLP rh	TSLP-APP de cino	Aglutinante progenitor	
	VH	VL	MOR0#	KD [pM]	KD [pM]	
1			5008	10	1438	MOR04493
2			5009	5	10861	
3			4494	>200	20857	MOR04494
4			5010	2	1099	
5			5011	31	4951	
6			5012	26	1535	
7			5013	34	1367	

ES 2 404 058 T3

(continuación)

8			5014	8	3711		
9			5015	26	2959		
10			5016	7	98		
11			5017	4	111		
12			5018	14	358		
13	5010	5016	5154	13	18		
14	5010	5017	5155	1	9		
15	5010	5018	5156	16	58		
16	5011	5016	5157	1	34		
17	5011	5017	5158	9	21		
18	5011	5018	5159	12	87		
19	5012	5016	5160	27	28		
20	5012	5017	5161	11	11		
21	5012	5018	5162	21	81		
22	5013	5016	5163	22	17		
23	5013	5017	5164	14	8		
24	5013	5018	5165	19	45		
25	5014	5016	5166	22	27		
26	5014	5017	5167	14	16		
27	5014	5018	5168	<1	108		
28	5015	5016	5169	1	53		
29	5015	5017	5170	11	25		
30	5015	5018	5171	29	71		
31			4497	>200	>20 nM		MOR04497
32			5019	36	3825		
33			5020	13	103		
34			5021	14	79		
35			5022	7	79		
36	5019	5020	5172	122	7540		

(continuación)

37	5019	5021	5173	39	3377	MOR04832
38	5019	5022	5174	117	4763	
39			5023	5	>20 nM	
40			5024	4	>20 nM	
41			5025	7	>20 nM	
42			5026	12	>20 nM	
43			5027	7	>20 nM	
	Progenitor					
	Clones x					

5 De este modo, como otro aspecto de la presente invención, se presenta el uso de una región de enlace con hTSLP aislada de un anticuerpo o fragmento funcional del mismo que tiene una KD menor de 100 pM, convenientemente menor de 50 pM, preferiblemente menor de 30 pM, en el tratamiento de una enfermedad asociada con la presencia de la hTSLP objetiva receptora de célula, tal como el asma o la dermatitis atópica.

Lista de referencias

1. Reche, P.A. y colaboradores. Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. *J Immunol* 167, 336-343 (2001).

10 2. Soumelis, V. y colaboradores. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* 3, 673-680 (2002).

3. Levin, S.D. y colaboradores. Thymic stromal lymphopoietin: a cytokine that promotes the development of IgM+ B cells in vitro and signals via a novel mechanism. *J Immunol* 162, 677-683 (1999).

15 4. Novak, N. & Bieber, T. The role of dendritic cell subtypes in the pathophysiology of atopic dermatitis. *J Am Acad. Dermatol.* 53, S171-S176 (2005).

5. Quentmeier, H. y colaboradores. Cloning of human thymic stromal lymphopoietin (TSLP and signaling mechanisms leading to proliferation. *Leukemia* 15, 1286-1292 (2001).

6. Knappik, A. y colaboradores. Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol* 296, 57-86 (2000).

20 7. Krebs, B. y colaboradores. High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies, *J Immunol Methods* 254, 67-84 (2001).

8. Rauchemberger, R. y colaboradores. Human combinatorial Fab library yielding specific and functional antibodies against the human fibroblast growth factor receptor 3. *J Biol Chem* 278, 38194-38205 (2003).

25 9. Knappik, A. y colaboradores. Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides, *J Mol Biol* 296, 57-86 (2000).

10. Löhning, C. Novel methods for displaying (poly)peptides/proteins on bacteriophage particles via disulfide bonds. (WO 01/05950). 2001.

Tipo de Ref: Patente

11. Krebs, B. Y colaboradores High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies, *J Immunol Methods* 254, 67-84 (2001).
- 5 12. Nagy, Z.A. y colaboradores. Fully human, HLA-DR-specific monoclonal antibodies efficiently induce programmed death of malignant lymphoid cells. *Nat. Med* 8, 801-807 (2002).
13. Virnekas, B. y colaboradores. Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. *Nucleic Acids Res* 22, 5600-5607 (1994).
14. Chen, Y, y colaboradores. Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody: crystal structure of an affinity-matured Fab in complex with antigen. *J. Mol Biol* 293, 865-881 (1999).
- 10 15. Schier, R. y colaboradores. Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site. *J Mol Biol* 263, 551-567 (1996).
16. Yang, W.P. y colaboradores CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range. *J Mol Biol* 254, 392-403 (1995).
- 15 17. Haenel, C., Satzger, M., Ducata, D.D., Ostendorp, R. & Brocks, B. Characterization of high-affinity antibodies by electrochemiluminescence-based equilibrium titration. *Anal Biochem* 339, 182-184 (2005).

Anexo 1 Secuencias CDR de los anticuerpos de la invención

Secuencias VH CDR (H-CDR)

Id no.	SEQ ID #	SEQ ID #	SEQ ID #	SEQ ID #
VH1A	G	GTFSS--Y A I S 1	GIIP--IFGTANYAQKFQG 8	
MOR04493	G	GTFSS--Y A I S 1	GIIP--DFGWANYAQKFQG 9	SGMFYSILFDY---- 26
MOR05008	G	GTFSS--Y A I S 1	GIIP--EFGFTNYAQKFQG 10	SGMFYSILFDY---- 26
MOR05009	G	GTFSS--Y A I S 1	HISP--EFGFTNYAQKFQG 11	SGMFYSILFDY---- 26
MOR04832	G	GTFSS--Y A I S 1	NIYP--IFGYANYAQKFQG 12	YGQYGQHFHSHGGMDV 27
MOR05023	G	GTFSS--Y A I S 1	NIYP--IFGYANYAQKFQG 12	YGQYGQHFHSHGGMDV 27
MOR05024	G	GTFSS--Y A I S 1	NIYP--IFGYANYAQKFQG 12	YGQYGQHFHSHGGMDV 27
MOR05025	G	GTFSS--Y A I S 1	NIYP--IFGYANYAQKFQG 12	YGQYGQHFHSHGGMDV 27
MOR05026	G	GTFSS--Y A I S 1	NIYP--IFGYANYAQKFQG 12	YGQYGQHFHSHGGMDV 27
MOR05027	G	GTFSS--Y A I S 1	NIYP--IFGYANYAQKFQG 12	YGQYGQHFHSHGGMDV 27
SEQ ID NO VH3	G	GTFSS--Y A M S 2	AISG--SGGSTYYADSVKG 13	
MOR04494	G	GTFSS--Y Y M S 3	NISY--DSSDTYYADSVKG 14	QQYFDHIDI----- 28
MOR05010	G	GTFSS--Y Y M S 3	GIFF--DGETYYAGSVKG 15	QQYFDHIDI----- 28
MOR05011	G	GTFSS--Y Y M S 3	GIFY--DGSTYYPDSVKG 16	QQYFDHIDI----- 28
MOR05012	G	GTFSS--Y Y M S 3	GIFF--TGETYYPDSVKG 17	QQYFDHIDI----- 28
MOR05013	G	GTFSS--Y Y M S 3	GIFF--DGETYYADSVKG 18	QQYFDHIDI----- 28
MOR05014	G	GTFSS--Y Y M S 3	GIFF--DGTTYYADSVKG 19	QQYFDHIDI----- 28
MOR05015	G	GTFSS--Y Y M S 3	GTF--DGSTYYADSVKG 20	QQYFDHIDI----- 28
MOR05016	G	GTFSS--Y Y M S 3	NISY--DSSDTYYADSVKG 14	QQYFDHIDI----- 28
MOR05017	G	GTFSS--Y Y M S 3	NISY--DSSDTYYADSVKG 14	QQYFDHIDI----- 28
MOR05018	G	GTFSS--Y Y M S 3	NISY--DSSDTYYADSVKG 14	QQYFDHIDI----- 28
MOR05154	G	GTFSS--Y Y M S 3	GIFF--DGETYYAGSVKG 15	QQYFDHIDI----- 28
MOR05155	G	GTFSS--Y Y M S 3	GIFF--DGETYYAGSVKG 15	QQYFDHIDI----- 28
MOR05156	G	GTFSS--Y Y M S 3	GIFF--DGETYYAGSVKG 15	QQYFDHIDI----- 28
MOR05157	G	GTFSS--Y Y M S 3	GIFY--DGSTYYPDSVKG 16	QQYFDHIDI----- 28
MOR05158	G	GTFSS--Y Y M S 3	GIFY--DGSTYYPDSVKG 16	QQYFDHIDI----- 28
MOR05159	G	GTFSS--Y Y M S 3	GIFY--DGSTYYPDSVKG 16	QQYFDHIDI----- 28
MOR05160	G	GTFSS--Y Y M S 3	GIFF--TGETYYPDSVKG 17	QQYFDHIDI----- 28
MOR05161	G	GTFSS--Y Y M S 3	GIFF--TGETYYPDSVKG 17	QQYFDHIDI----- 28
MOR05162	G	GTFSS--Y Y M S 3	GIFF--TGETYYPDSVKG 17	QQYFDHIDI----- 28
MOR05163	G	GTFSS--Y Y M S 3	GIFF--DGETYYADSVKG 18	QQYFDHIDI----- 28
MOR05164	G	GTFSS--Y Y M S 3	GIFF--DGETYYADSVKG 18	QQYFDHIDI----- 28
MOR05165	G	GTFSS--Y Y M S 3	GIFF--DGETYYADSVKG 18	QQYFDHIDI----- 28
MOR05166	G	GTFSS--Y Y M S 3	GIFF--DGTTYYADSVKG 19	QQYFDHIDI----- 28
MOR05167	G	GTFSS--Y Y M S 3	GIFF--DGTTYYADSVKG 19	QQYFDHIDI----- 28
MOR05168	G	GTFSS--Y Y M S 3	GIFF--DGTTYYADSVKG 19	QQYFDHIDI----- 28
MOR05169	G	GTFSS--Y Y M S 3	GTF--DGSTYYADSVKG 20	QQYFDHIDI----- 28
MOR05170	G	GTFSS--Y Y M S 3	GTF--DGSTYYADSVKG 20	QQYFDHIDI----- 28
MOR05171	G	GTFSS--Y Y M S 3	GTF--DGSTYYADSVKG 20	QQYFDHIDI----- 28
MOR04496	G	GTFSS--Y A I S 4	SISY--SGSSTYYADSVKG 21	MEYWYHLLYMDY... 29
MOR04497	G	GTFSSN--H A L S 5	GIQY--DGSNTGYADSVKG 22	YGGYSYMDY----- 30
MOR05019	G	GTFSSN--H A L S 5	VISF--DGVKFYADSVKG 23	YGGYSYMDY----- 30
MOR05020	G	GTFSSN--H A L S 5	GIQY--DGSNTGYADSVKG 22	YGGYSYMDY----- 30
MOR05021	G	GTFSSN--H A L S 5	GIQY--DGSNTGYADSVKG 22	YGGYSYMDY----- 30
MOR05022	G	GTFSSN--H A L S 5	GIQY--DGSNTGYADSVKG 22	YGGYSYMDY----- 30
MOR05172	G	GTFSSN--H A L S 5	VISF--DGVKFYADSVKG 23	YGGYSYMDY----- 30
MOR05173	G	GTFSSN--H A L S 5	VISF--DGVKFYADSVKG 23	YGGYSYMDY----- 30
MOR05174	G	GTFSSN--H A L S 5	VISF--DGVKFYADSVKG 23	YGGYSYMDY----- 30
SEQ ID NO VH6	G	DSVSSNSAAWN 6	RTYYR-SKWYNDYAVSVKS 24	
MOR04609	G	DSVSSNSAAWG 7	RIYYR-SKWLNDYAVSVKS 25	DGGWYIDV----- 31

Secuencias VL kappa CDR (L-CDR)

Id no.		SEQ ID #		SEQ ID #	SEQ ID #
SEQ ID NO	Vk1	R A S Q G I S - - - - - S Y L A	32	A A S S L Q S	41
MOR04493		R A S Q D I Y - - - - - N Y L N	33	G A S S L Q S	42
MOR05008		R A S Q D I Y - - - - - N Y L N	33	G A S S L Q S	42
MOR05009		R A S Q D I Y - - - - - N Y L N	33	G A S S L Q S	42
MOR04832		R A S Q D I S - - - - - I S L T	34	G A F S L Q S	43
MOR05023		R A S Q D I S - - - - - I S L T	34	G A F S L Q S	43
MOR05024		R A S Q D I S - - - - - I S L T	34	G A F S L Q S	43
MOR05025		R A S Q D I S - - - - - I S L T	34	G A F S L Q S	43
MOR05026		R A S Q D I S - - - - - I S L T	34	G A F S L Q S	43
MOR05027		R A S Q D I S - - - - - I S L T	34	G A F S L Q S	43
SEQ ID NO	Vk3	R A S Q S V S S - - - - - S Y L A	35	G A S S R A T	44
MOR04496		R A S Q S I G D - - - - - N Y L A	36	D A N N R A T	45

Secuencias VL lambda CDR (L-CDR)

ES 2 404 058 T3

Id no.	SEQ ID #	SEQ ID #	SEQ ID #
SEQ ID NO 40 VA3	S G D A L G D - - - - - K Y A S	37	D D S D R P S 46
MOR04494	G G D S L G G - - - - - K Y V Y	38	G D S K R P S 47
MOR05010	G G D S L G G - - - - - K Y V Y	38	G D S K R P S 47
MOR05011	G G D S L G G - - - - - K Y V Y	38	G D S K R P S 47
MOR05012	G G D S L G G - - - - - K Y V Y	38	G D S K R P S 47
MOR05013	G G D S L G G - - - - - K Y V Y	38	G D S K R P S 47
MOR05014	G G D S L G G - - - - - K Y V Y	38	G D S K R P S 47
MOR05015	G G D S L G G - - - - - K Y V Y	38	G D S K R P S 47
MOR05016	G G D S L G G - - - - - K Y V Y	38	G D S K R P S 47
MOR05017	G G D S L G G - - - - - K Y V Y	38	G D S K R P S 47
MOR05018	G G D S L G G - - - - - K Y V Y	38	G D S K R P S 47
MOR05154	G G D S L G G - - - - - K Y V Y	38	G D S K R P S 47
MOR05155	G G D S L G G - - - - - K Y V Y	38	G D S K R P S 47
MOR05156	G G D S L G G - - - - - K Y V Y	38	G D S K R P S 47
MOR05157	G G D S L G G - - - - - K Y V Y	38	G D S K R P S 47
MOR05158	G G D S L G G - - - - - K Y V Y	38	G D S K R P S 47
MOR05159	G G D S L G G - - - - - K Y V Y	38	G D S K R P S 47
MOR05160	G G D S L G G - - - - - K Y V Y	38	G D S K R P S 47
MOR05161	G G D S L G G - - - - - K Y V Y	38	G D S K R P S 47
MOR05162	G G D S L G G - - - - - K Y V Y	38	G D S K R P S 47
MOR05163	G G D S L G G - - - - - K Y V Y	38	G D S K R P S 47
MOR05164	G G D S L G G - - - - - K Y V Y	38	G D S K R P S 47
MOR05165	G G D S L G G - - - - - K Y V Y	38	G D S K R P S 47
MOR05166	G G D S L G G - - - - - K Y V Y	38	G D S K R P S 47
MOR05167	G G D S L G G - - - - - K Y V Y	38	G D S K R P S 47
MOR05168	G G D S L G G - - - - - K Y V Y	38	G D S K R P S 47
MOR05169	G G D S L G G - - - - - K Y V Y	38	G D S K R P S 47
MOR05170	G G D S L G G - - - - - K Y V Y	38	G D S K R P S 47
MOR05171	G G D S L G G - - - - - K Y V Y	38	G D S K R P S 47
MOR04497	S G D N L G S - - - - - K Y V H	39	A D N N R P S 48
MOR05019	S G D N L G S - - - - - K Y V H	39	A D N N R P S 48
MOR05020	S G D N L G S - - - - - K Y V H	39	A D N N R P S 48
MOR05021	S G D N L G S - - - - - K Y V H	39	A D N N R P S 48
MOR05022	S G D N L G S - - - - - K Y V H	39	A D N N R P S 48
MOR05172	S G D N L G S - - - - - K Y V H	39	A D N N R P S 48
MOR05173	S G D N L G S - - - - - K Y V H	39	A D N N R P S 48
MOR05174	S G D N L G S - - - - - K Y V H	39	A D N N R P S 48
MOR04609	S G D N L G S - - - - - Y Y A N	40	E D - K R P S 49

Anexo 2. Secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-TSLP HuCAL GOLD®

MOR04493 VH, SEQ ID NO: 67:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGII
PDFGWANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGMFYSILFDY
WGQGLTVTVSS

MOR04493 VL, SEQ ID NO: 68:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIYNYLNWYQQKPGKAPKLLIYGASS
LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQQNDYPLTFGQGTKVEIKRT

MOR04494 VH, SEQ ID NO: 69:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSNIS
YDSSDTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQQYFDHIDIW
GQGLTVTVSS

MOR04494 VL, SEQ ID NO: 70:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGGDSLGGKYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSK
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYTNALSTVFGGGTKLTVLGQ

MOR04496 VH, SEQ ID NO: 71:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAISWVRQAPGKGLEWVSSISY
SGSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARMYWHLLYM
DYWGQGLTVTVSS

MOR04496 VL, SEQ ID NO: 72:

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSIGDNYLAWYQQKPGQAPRLLIYDAN
NRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFATYYCQQYDDHPLTFGQGTKVEIKRT

MOR04497 VH, SEQ ID NO: 73:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNHALSWVRQAPGKGLEWVSGI
QYDGSNTGYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYGYSYMD
YWGQGLTVTVSS

MOR04497 VL, SEQ ID NO: 74:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLGSKYVHWYQQKPGQAPVLVIYADNN
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYDHMLQVFGGGTKLTVLGQ

MOR04609 VH, SEQ ID NO: 75:

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWGWIRQSPGRGLEWLGR
YYRSKWLNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDGGWYIDV
WGQGTLVTVSS

MOR04609 VL, SEQ ID NO: 76:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLGSYYANWYQQKPGQAPVLVIYEDKRP
SGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSFDSYHSDYVFGGGTKLTVLGQ

MOR04832 VH, SEQ ID NO: 77:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGGGLEWMGNI
YPIFGYANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARYGQYGHFSH
GGMDVWGQGLTVTVSS

MOR04832 VL, SEQ ID NO: 78:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISISLTWYQQKPGKAPKLLIYGAFSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQYYGTSATFGQGKVEIKRT

MOR05008 VH, SEQ ID NO: 79:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGGGLEWMGGII
PEFGFTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSGMFYSLFDY
WGQGTLVTVSS

MOR05008 VL, SEQ ID NO: 68:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIYNYLNWYQQKPGKAPKLLIYGASS
LQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITISLQPEDFAVYYCQQNDYPLTFGQGKVEIKRT

MOR05009 VH, SEQ ID NO: 80:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGGGLEWMGHI
SPEFGFTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSGMFYSLFDY
WGQGTLVTVSS

MOR05009 VL, SEQ ID NO: 68:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIYNWYQQKPGKAPKLLIYGASS
LQSGVPSRFSGSGGTDFLTISLQPEDFAVYYCQQNDYPLTFGGGTKVEIKRT

MOR05010 VH, SEQ ID NO: 81:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSGIF
FDGETYYAGSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQQYFDHIDIWG
QGTLVTVSS

MOR05010 VL, SEQ ID NO: 70:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGGDSLGGKYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSK
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYTNALSTVFGGGTKLTVLGQ

MOR05011 VH, SEQ ID NO: 82:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSGIF
YDGSTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQQYFDHIDIWG
QGTLVTVSS

MOR05011 VL, SEQ ID NO: 70:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGGDSLGGKYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSK
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYTNALSTVFGGGTKLTVLGQ

MOR05012 VH, SEQ ID NO: 83:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSGIF
FTGETYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQQYFDHIDIWG
QGTLVTVSS

MOR05012 VL, SEQ ID NO: 70:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGGDSLGGKYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSK
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYTNALSTVFGGGTKLTVLGQ

MOR05013 VH, SEQ ID NO: 84:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSGIF
FDGETYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQQYFDHIDIWG
QGTLVTVSS

MOR05013 VL, SEQ ID NO: 70:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGGDSLGGKYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSK
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYTNALSTVFGGGTKLTVLGQ

MOR05014 VH, SEQ ID NO: 85:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSGIF
FDGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQQYFDHIDIW
QGTLVTVSS

MOR05014 VL, SEQ ID NO: 70:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGGDSLGGKYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSK
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYTNALSTVFGGGTKLTVLGQ

MOR05015 VH, SEQ ID NO: 86:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSGT
FFDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQQYFDHIDIW
GQGTLVTVSS

MOR05015 VL, SEQ ID NO: 70:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGGDSLGGKYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSK
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYTNALSTVFGGGTKLTVLGQ

MOR05016 VH, SEQ ID NO: 69:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSNIS
YDSSDTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQQYFDHIDIW
GQGTLVTVSS

MOR05016 VL, SEQ ID NO: 87:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGGDSLGGKYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSK
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYDLQSLNIVFGGGTKLTVLGQ

MOR05017 VH, SEQ ID NO: 69:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSNIS
YDSSDTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQQYFDHIDIW
GQGTLVTVSS

MOR05017 VL, SEQ ID NO: 88:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGGDSLGGKYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSK
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYDLKSLNVVFGGGTKLTVLGQ

MOR05018 VH, SEQ ID NO: 69:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSNIS
YDSSDTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQQYFDHIDIW
GQGLVTVSS

MOR05018 VL, SEQ ID NO: 89:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGGDSLGGKYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSK
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYDLGSLNVVFGGGTKLTVLGQ

MOR05019 VH, SEQ ID NO: 90:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNHALS WVRQAPGKGLEWVSVIS
FDGVKIFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYGYSYMDYW
GQGLVTVSS

MOR05019 VL, SEQ ID NO: 74:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLGSKYVHWYQQKPGQAPVLVIYADNN
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYDHMLQVFGGGTKLTVLGQ

MOR05020 VH, SEQ ID NO: 73:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNHALS WVRQAPGKGLEWVSGI
QYDGSNTGYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYGYSYMD
YWGQGLVTVSS

MOR05020 VL, SEQ ID NO: 91:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLGSKYVHWYQQKPGQAPVLVIYADNN
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCSSYDSNSIRVFGGGTKLTVLGQ

MOR05021 VH, SEQ ID NO: 73:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNHALS WVRQAPGKGLEWVSGI
QYDGSNTGYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYGYSYMD
YWGQGLVTVSS

MOR05021 VL, SEQ ID NO: 92:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLGSKYVHWYQQKPGQAPVLVIYADNN
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDADYCYCSSYDLGVRVFGGGTKLTVLGQ

MOR05022 VH, SEQ ID NO: 73:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNHALSWVRQAPGKGLEWVSGI
QYDGSNTGYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYGYSYMD
YWGQGTLVTVSS

MOR05022 VL, SEQ ID NO: 93:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLGSKYVHWYQQKPGQAPVLVIYADNN
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDADYCYCSSTTSRIRVFGGGTKLTVLGQ

MOR05023 VH, SEQ ID NO: 77:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGNI
YPIFGYANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARYGQYGGHFSH
GGMDVWGQGTLLTVSS

MOR05023 VL, SEQ ID NO: 94:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISISLTWYQQKPGKAPKLLIYGAFSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQFYFHSPTFGGQTKVEIKRT

MOR05024 VH, SEQ ID NO: 77:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGNI
YPIFGYANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARYGQYGGHFSH
GGMDVWGQGTLLTVSS

MOR05024 VL, SEQ ID NO: 95:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISISLTWYQQKPGKAPKLLIYGAFSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQFWFEPVTFGGQTKVEIKRT

MOR05025 VH, SEQ ID NO: 77:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGNI
YPIFGYANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARYGQYGGHFSH
GGMDVWGQGTLLTVSS

MOR05025 VL, SEQ ID NO: 96:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDISISLTWYQQKPGKAPKLLIYGAFSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFWFHPVTFGGQGTKVEIKRT

MOR05026 VH, SEQ ID NO: 77:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGNI
YPIFGYANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARYGQYGGQHFHSH
GGMDVWGQGTLVTVSS

MOR05026 VL, SEQ ID NO: 97:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDISISLTWYQQKPGKAPKLLIYGAFSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFWSEPVTFGGQGTKVEIKRT

MOR05027 VH, SEQ ID NO: 77:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGNI
YPIFGYANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARYGQYGGQHFHSH
GGMDVWGQGTLVTVSS

MOR05027 VL, SEQ ID NO: 98:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDISISLTWYQQKPGKAPKLLIYGAFSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFWTEPVTFGGQGTKVEIKRT

MOR05154 VH, SEQ ID NO: 81:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSGIF
FDGETYYAGSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQQYFDHIDIWG
QGTLVTVSS

MOR05154 VL, SEQ ID NO: 87:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGGDSLGGKYVYWYQQKPGQAPVLIYGD
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYDLQSLNIVFGGGTKLTVLGG

MOR05155 VH, SEQ ID NO: 81:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSGIF
FDGETYYAGSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQQYFDHIDIWG
QGTLVTVSS

MOR05155 VL, SEQ ID NO: 88:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGGDSLGGKYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSK
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYDLKSLNVVFGGGTKLTVLGQ

MOR05156 VH, SEQ ID NO: 81:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSGIF
FDGETYYAGSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQQYFDHIDIWG
QGTLVTVSS

MOR05156 VL, SEQ ID NO: 89:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGGDSLGGKYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSK
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYDLGSLNVVFGGGTKLTVLGQ

MOR05157 VH, SEQ ID NO: 82:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSGIF
YDGSTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQQYFDHIDIWG
QGTLVTVSS

MOR05157 VL, SEQ ID NO: 87:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGGDSLGGKYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSK
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYDLQSLNIVFGGGTKLTVLGQ

MOR05158 VH, SEQ ID NO: 82:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSGIF
YDGSTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQQYFDHIDIWG
QGTLVTVSS

MOR05158 VL, SEQ ID NO: 88:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGGDSLGGKYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSK
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYDLKSLNVVFGGGTKLTVLGQ

MOR05159 VH, SEQ ID NO: 82:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSGIF
YDGSTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQQYFDHIDIWG
QGTLVTVSS

MOR05159 VL, SEQ ID NO: 89:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGGDSLGGKYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSK
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYDLGSLNLFVGGGTKLTVLGQ

MOR05160 VH, SEQ ID NO: 83:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSGIF
FTGETYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQQYFDHIDIWG
QGTLVTVSS

MOR05160 VL, SEQ ID NO: 87:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGGDSLGGKYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSK
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYDLQSLNIVFGGGTKLTVLGQ

MOR05161 VH, SEQ ID NO: 83:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSGIF
FTGETYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQQYFDHIDIWG
QGTLVTVSS

MOR05161 VL, SEQ ID NO: 88:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGGDSLGGKYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSK
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYDLKSLNVVFGGGTKLTVLGQ

MOR05162 VH, SEQ ID NO: 83:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSGIF
FTGETYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQQYFDHIDIWG
QGTLVTVSS

MOR05162 VL, SEQ ID NO: 89:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGGDSLGGKYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSK
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYDLGSLNLVFGGGTKLTVLGQ

MOR05163 VH, SEQ ID NO: 84:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSGIF
FDGETYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQQYFDHIDIWG
QGTLVTVSS

MOR05163 VL, SEQ ID NO: 87:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGGDSLGGKYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSK
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYDLQSLNIVFGGGTKLTVLGQ

MOR05164 VH, SEQ ID NO: 84:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSGIF
FDGETYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQQYFDHIDIWG
QGTLVTVSS

MOR05164 VL, SEQ ID NO: 88:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGGDSLGGKYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSK
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYDLKSLNVVFGGGTKLTVLGQ

MOR05165 VH, SEQ ID NO: 84:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSGIF
FDGETYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQQYFDHIDIWG
QGTLVTVSS

MOR05165 VL, SEQ ID NO: 89:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGGDSLGGKYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSK
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYDLGSLNLVFGGGTKLTVLGQ

MOR05166 VH, SEQ ID NO: 85:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSGIF
FDGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQQYFDHIDIWG
QGTLVTVSS

MOR05166 VL, SEQ ID NO: 87:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGGDSLGGKYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSK
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYDLQSLNIVFGGGTKLTVLGQ

MOR05167 VH, SEQ ID NO: 85:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSGIF
FDGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQQYFDHIDIWG
QGTLVTVSS

MOR05167 VL, SEQ ID NO: 88:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGGDSLGGKYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSK
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYDLKSLNIVFGGGTKLTVLGQ

MOR05168 VH, SEQ ID NO: 85:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSGIF
FDGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQQYFDHIDIWG
QGTLVTVSS

MOR05168 VL, SEQ ID NO: 89:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGGDSLGGKYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSK
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYDLGSLNIVFGGGTKLTVLGQ

MOR05169 VH, SEQ ID NO: 86:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSGT
FFDGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQQYFDHIDIW
QGTLVTVSS

MOR05169 VL, SEQ ID NO: 87:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGGDSLGGKYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSK
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYDLQSLNIVFGGGTKLTVLGQ

MOR05170 VH, SEQ ID NO: 86:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSGT
FFDGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQQYFDHIDIW
QGTLVTVSS

MOR05170 VL, SEQ ID NO: 88:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGGDSLGGKYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSK
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYDLKSLNVVFGGGTKLTVLGQ

MOR05171 VH, SEQ ID NO: 86:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSGT
FFDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQQYFDHIDIW
GQGTLTVVSS

MOR05171 VL, SEQ ID NO: 89:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCGGDSLGGKYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSK
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYDLGSLNLVFGGGTKLTVLGQ

MOR05172 VH, SEQ ID NO: 90:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNHALS WVRQAPGKGLEWVSVIS
FDGVKIFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYGYSYMDYW
GQGTLTVVSS

MOR05172 VL, SEQ ID NO: 91:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLGSKYVHWYQQKPGQAPVLVIYADNN
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCSSYDSNSIRVFGGGTKLTVLGQ

MOR05173 VH, SEQ ID NO: 90:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNHALS WVRQAPGKGLEWVSVIS
FDGVKIFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYGYSYMDYW
GQGTLTVVSS

MOR05173 VL, SEQ ID NO: 92:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLGSKYVHWYQQKPGQAPVLVIYADNN
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCSSYDLGVRVFGGGTKLTVLGQ

MOR05174 VH, SEQ ID NO: 90:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNHALS WVRQAPGKGLEWVSVIS
FDGVKIFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYGYSYMDYW
GQGTLTVVSS

MOR05174 VL, SEQ ID NO: 93:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLGSKYVHWYQQKPGQAPVLVIYADNN
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCSSYTTSGIRVFGGGTKLTVLGQ

MOR 5164, 5167, 5170 LAMBDA DE CADENA LIGERA

La secuencia de aminoácidos Lambda de Cadena Ligera se muestra en la SEQ ID NO: 99, y es codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 100.

**MAWALLLLTLLTQGTGSWADIELTQPPSVSVAPGQTARISCGGDSLGGKYVY
WYQQKPGQAPVLIYGDSCRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSY
DLKSLNIVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT
VAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGST
VEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 99:)**

**ATGGCCTGGGCTCTGCTGCTCCTCACCTCCTCACTCAGGGCACAGGATCC
TGGGCTGATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCACTGAGCGTTGCACCAGGTCAG
ACCGCGCGTATCTCGTGTGGCGGCGATTCTCTTGGTGGTAAGTATGTTTATTGGT
ACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCCTTGTGATTTATGGTGATTCTAAGCG
TCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGCGGATCCAACAGCGGCAACACCGCGAC
CCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCCAGTC**

**TTATGATCTTAAAGTCTCTTAATGTTGTGTTTGGCGGGCACGAAGTTAACCGTCC
TAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCTCGGTCACTCTGTTCCC GCCCTCCTCTGAGGA
GCTTCAAGCCAAACAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGA
GCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTC AAGGCGGGAGTGGG
GACCACACACCTCCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCT
GAGCCTGACGCTGAGCAGTGG AAGTCCACAGAAAGCTACAGCTGCCAGGTCAC
GCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA (SEQ
ID NO: 100:)**

5 MOR 5164, 5167, 5170 LAMBDA DE CADENA LIGERA (OPTIMIZADA)

La secuencia de aminoácidos Lambda de Cadena Ligera se muestra en la SEQ ID NO: 101, y es codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 102.

**MSVLTQVLALLLWLTGTRCDIELTQPPSVSVAPGQTARISCGGDSLGGKYV
YWYQQKPGQAPVLIYGDSCRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSY
YDLKSLNIVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAV
TVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGS
TVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 101:)**

**ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCTGGCGTGTGCTGCTGTGGCTTACAGGT
ACGCGTTCGACATCGAGCTGACCCAGCCCCAGCGTGTCTGTGGCCCCTGGCC
AGACCGCCCGGATCAGCTGTGGCGGCGACAGCCTGGGCGGCAAGTACGTGTACT
GGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCCCGTGCTGGTGATCTACGGCGACAGCA
AGCGGCCAGCGGCATCCCCGAGCGGTTCAGCGGCAGCAACAGCGGCAACACCG
CCACCCTGACCATCAGCGGCACCCAGGCCGAGGACGAGGCCGACTACTACTGCC
AGAGCTACGACCTGAAGAGCCTGAACGTTGGTGTGTTGGCGGGCAACAAGCTTA
CCGTCCTAGGTCAGCCAAGGCTGCCCTCGGTCACTCTGTTCCC GCCCTCCTCT
GAGGAGCTTCAAGCCAAACAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACC
CGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTC AAGGCGGGG
GTGGAGACAACACACCTCCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAG
CTATCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGG AAGTCCACAGAAAGCTACAGCTGCCA
GGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAAAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA
ATAG (SEQ ID NO: 102)**

10 MOR5164 IgG1 DE CADENA PESADA:

La secuencia de aminoácidos Lambda HC se muestra en la SEQ ID NO: 103, y es codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 104.

**MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY
YMSWVRQAPGKGLEWVSGIFFDGETYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCARQQYFDHIDIWQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 103)**

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCTGT
CCCAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCC
TGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTTCTTATTATATGTCTTGG
GTGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTATTTTTTTTGTATG
GTGAGACTTATTATGCTGATTCTGTAAAGGGTCGTTTTACCATTTCACGTGATAAT
TCGAAAACACCCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCC
GTGTATTATTGCGCGCGTCAGCAGTATTTGATCATATTGATATTTGGGGCCAAG
GCACCCTGGTGACGGTTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCT
GGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT
CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCCCTGAC
CAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTC
AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC
AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAA
ATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGG
GGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCC
GGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGG
TCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCTCACCGTCC
TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAG
CCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGGCAGCCCCGAG
AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGG
TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG
GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGA
CTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT
ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO: 104)

5 MOR5164 IgG1 DE CADENA PESADA (OPTIMIZADA)

La secuencia de aminoácidos Lambda HC se muestra en la SEQ ID NO: 105, y es codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 106.

MAVWVWTL PFLMAAAQSVQAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY
YMSWVRQAPGKGLEWVSGIFFDGETYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCARQQYFDHIDIWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 105)

ATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCCATTCCTGATGGCAGCTGCCCAAAGTGTC
CAGGCCAGGTGCAGCTGGTGGAACTGGCGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGC
AGCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTCAGCAGCTACTACATGA
GCTGGGTGCGGCAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGTCCGGCATCTTCTT
CGACGGCGAGACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGTTACCATCAGCCG
GGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGA
CACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGCAGCAGTACTTCGACCACATCGACATCTGG
GGCAGGGCACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCT

TCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGA ACTCAGGCGC
CCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTAC
TCCCTCAGCAGCGTCTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACA
TCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGC
CCAAATCTTGTGACAAA ACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCT
GGGGGACCGTCAGTCTTCTTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATC
TCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT
GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA
AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACC
GT
CCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA
AGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG
AGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTG
GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT
GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC
ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAATGA (SEQ ID NO: 106)

MOR5167 IgG1 DE CADENA PESADA:

La secuencia de aminoácidos Lambda HC se muestra en la SEQ ID NO: 107, y es codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 108.

5

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY
YMSWVRQAPGKGLEWVSGIFFDGTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCARQQYFDHIDIWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 107)

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTC
CTGTCCCAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCCTGGTGAACCGGGCGGC
AGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTTATTATATGTC
TTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTATTTTTTTT
GATGGTACTACTTATTATGCTGATTCTGTAAAGGGTCGTTTTACCATTTCACGTGA
TAATTCGAAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATAC
GGCCGTGTATTATTGCGCGCGTCAGCAGTATTTTATCATATTGATATTTGGGGC
CAAGGCACCCTGGTACGGTTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCC
CCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT
GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCGTGAAGTCAAGGCGCCCT
GACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCC
CTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCT
GCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCC
AAATCTTGACAAAACACTCACACATGCCACCCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGG

GGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC

CCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA
GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA
GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAAGCTCCTCACCGT
CCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCCAACAA
AGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCTCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG
AGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGCTG
GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT
GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC
GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA (SEQ ID NO: 108)

ACTACACGCAGAA-

MOR5167 IgG1 DE CADENA PESADA (OPTIMIZADA):

La secuencia de aminoácidos Lambda HC se muestra en la SEQ ID NO: 109, y es codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 110.

5

MAWVWTL PFLMAAAQSVQAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSY
 YMSWVRQAPGKGLEWVSGIFFDGTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE
 DTAVYYCARQQYFDHIDIWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
 VKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
 HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVM
 HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 109)

ATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCCATTCCTGATGGCAGCTGCCCAAAGTGTC
 CAGGCCAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGC
 AGCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTACCTTCAGCAGCTACTACATGA
 GCTGGGTGCGGCAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGTCCGGCATCTTCTT
 CGACGGCACCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCG
 GGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGA
 CACCGCCGTGTA ACTACTGCGCCAGGCAGCAGTACTTCGACCACATCGACATCTGG
 GGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCT
 TCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
 CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGA ACTCAGGCGC
 CCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTAC
 TCCCTCAGCAGCGTCTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACA
 TCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGC
 CCAAATCTTGAGCAAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCT
 GGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATC
 TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT
 GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA
 AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACC
 GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC
 AAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC
 CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC
 CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGG

AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCTCCCGTGC
 TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG
 GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC
 CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO: 110)

MOR5170 IgG1 DE CADENA PESADA:

5 La secuencia de aminoácidos Lambda HC se muestra en la SEQ ID NO: 111, y es codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 12.

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY
 YMSWVRQAPGKGLEWVSGTFFDGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRA
 EDTAVYYCARQQYFDHIDIWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
 LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV
 NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
 CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
 NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
 FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 111)

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTC
 CTGTCCCAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCCTGGTGGCAACCGGGCGGC
 AGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTTCTTATTATATGTC
 TTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTACTTTTTTT
 GATGGTTCTACTTATTATGCTGATTCTGTAAAGGGTCGTTTTACCATTTACGTGA
 TAATTCGAAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATAC
 GGCCGTGTATTATGCGCGCGTACAGCATTTTTGATCATATTGATATTTGGGGC
 CAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCC
 CCCTGGCACCCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT
 GGTC AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCT
 GACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCC
 CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCT
 GCAACGTGAATCAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCC
 AAATCTTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGG
 GGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTC
 CCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA
 GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA
 GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTACGCGTCTCACCCT
 CCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA
 AGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG
 AGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCA
 GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAG
 TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG
 GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGT
 GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC
 ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA (SEQ ID NO: 112)

MOR5170 IgG1 DE CADENA PESADA (OPTIMIZADA):

La secuencia de aminoácidos Lambda HC se muestra en la SEQ ID NO: 113, y es codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 114.

MAVWVWTLPFLMAAAQSVQAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY
YMSWVRQAPGKGLEWVSGTFFDGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRA
EDTAVYYCARQQYFDHIDIWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV
NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 113)

ATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCCATTCTGATGGCAGCTGCCCAAAGTGTC
CAGGCCAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCTGGCGGC
AGCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTACCTTCAGCAGCTACTACATGA
GCTGGGTGCGGCAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGTCCGGCACCTTCT
TCGACGGCAGCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCC
GGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGG
ACACCGCCGTGACTACTGCGCCAGGCAGCAGTACTTCGACCACATCGACATCTG
GGGCCAGGGCACCTGGTACCCTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTG
TCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT
GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCG
CCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTA
CTCCCTCAGCAGCGTCTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTAC
ATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAG
CCCAAATCTTGTGACAAAACACTCACACATGCCACCCTGCCAGCACCTGAACTCC
TGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGAT
CTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC
TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC
AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCGTCTCAC
CGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA
CAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC
CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAA
CCAGGTCAAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG
GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGT
GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC
AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO:
114)

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo humano o humanizado aislado o un fragmento funcional del mismo que comprende una región de enlace con antígeno que es específica para la TSLP, en donde el anticuerpo o fragmento funcional del mismo se enlaza con la TSLP y comprende una región variable pesada seleccionada de SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85 y SEQ ID NO: 86 y una región variable de cadena ligera SEQ ID NO: 88.
2. El anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 1, que es una IgG1, IgG2 o una IgG4.
- 10 3. El anticuerpo aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 que es una IgG1 que tiene una secuencia lambda de cadena ligera seleccionada de SEQ ID NO: 99 o SEQ ID NO: 101, y una secuencia de cadena pesada seleccionada de SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111 y SEQ ID NO: 113.
4. Un polinucleótido aislado o recombinante que codifica un polipéptido que comprende una región de enlace con antígeno de un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 o un anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 3.
5. El polinucleótido de la reivindicación 4, que es un ADN.
- 15 6. Una célula huésped aislada que comprende un primer y un segundo segmento de ADN recombinante que codifican una cadena pesada y una cadena ligera, respectivamente, del anticuerpo de la reivindicación 3; en donde dichos segmentos de ADN están respectivamente de manera operativa enlazados a un primer y un segundo promotor, y son capaces de expresarse en dicha célula huésped.
- 20 7. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento funcional del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable para el mismo.

Figura 1

