

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 080**

51 Int. Cl.:

A61P 37/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2013 PCT/EP2013/077898**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.07.2014 WO14106602**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2013 E 13811986 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 2941302**

54 Título: **Anticuerpos que se unen a TL1A y sus usos**

30 Prioridad:

02.01.2013 US 201361748201 P

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

08.11.2018

73 Titular/es:

**GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A. (100.0%)
Chemin de la Combeta, 5
2300 La Chaux-de-Fonds, CH**

72 Inventor/es:

**ATTINGER, ANTOINE;
BACK, JONATHAN ALBERT;
BLEIN, STANISLAS;
LISSILAA, RAMI y
SKEGRO, DARKO**

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

Observaciones:

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

ES 2 689 080 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 que se unen a TL1A y sus usos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen a TL1A. Más específicamente, la presente invención se refiere a un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a TL1A que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, y/o una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53; y/o que comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54, y/o una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55, y/o una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56.

15 Antecedentes de la invención

El ligando 1A tipo TNF (TL1A) es un miembro de la superfamilia del factor de necrosis de tumor (ligando), miembro 15. TL1A es también conocido como TNFSF15 y VEGI y se identificó en 1999 como un inhibidor de la angiogénesis que suprime el crecimiento de los carcinomas de colon *in vivo* (Zhai Y et al (1999) FASEB J, 13(1): 181-9). La proteína se expresa abundantemente en las células endoteliales y células activadas del linaje hematopoyético, incluyendo monocitos, macrófagos, linfocitos, células mononucleares de lámina propia, células dendríticas y células plasmáticas, pero no se expresa en los linfocitos B o T (Tan KB et al (1997) Gene, 204: 35-46; Prehn JL et al (2007) J Immunol, 178: 4033-4038). También se expresa en el riñón, pulmón, próstata y timo (Tan KB et al (1997), 25 anteriormente). Es un ligando para el receptor TNFRSF25/DR3 y señuelo TR6/DcR3 y su expresión es inducible por el TNF e IL-1 α . TNFRSF25/DR3 es un receptor que contiene el dominio de muerte que se regula positivamente durante la activación de linfocitos T. TL1A induce la activación de NF-kappaB y la apoptosis en líneas celulares que expresan TNFRSF25/DR3, y en los linfocitos T, TL1A puede actuar como un coestimulador que aumenta la capacidad de respuesta de IL-2 y la secreción de citocinas proinflamatorias tanto *in vitro* como *in vivo*. La interacción 30 de TL1A con DR3 puede promover la expansión de linfocitos T durante una respuesta inmune (Migone TS et al (2002) Immunity, 16(3): 479-92). El receptor señuelo secretado (DcR3), una proteína soluble de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR), bloquea la acción de TL1A. (Kim S & Zhang L (2005) J Immunol Methods, 298: 1-8). TL1A se ha implicado como una potencial diana terapéutica en varias enfermedades y trastornos.

Una de las principales causas de la inflamación pulmonar en la alergia y asma es la polarización de Th2 de los linfocitos T CD4 con niveles elevados de IgE y la producción de IL-13 por las células NKT. TL1A desempeña un papel importante en la inflamación alérgica pulmonar coestimulando la producción de IL-4 e IL-13 en las células NKT. El bloqueo de la interacción de TL1A y DR3 por el anticuerpo TL1A o TL1A mutante dominante negativo 40 suprime la inflamación del pulmón (Fang L et al., (2008) J Exp Med, 205(5): 1037-48). DcR3, el receptor señuelo para TL1A se expresa en varios carcinomas de pulmón y colon y en algunos tejidos normales, lo que sugiere, por lo tanto, un papel para TL1A en carcinomas de pulmón y colon. Además, TL1A también se ha indicado como angioestático y para inducir metaloproteínasa y expresión del gen IL-8 (Su WB et al., (2006) Exp Cell Res, 312: 266-277; Kang YJ et al., (2005) Cytokine, 29: 229-235). TL1A y DR3 pueden también participar en la patogénesis de la aterosclerosis por aumento de la producción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas y la disminución de la estabilidad de la placa mediante la inducción de enzimas degradantes de matriz extracelular (Kang YJ et al., (2005) 45 anteriormente). También existe evidencia que sugiere que TL1A/DR3 está implicado en la etiología de la artritis reumatoide (Bossen C et al., (2006) J Biol Chem, 281(20): 13964-13971).

Una asociación entre la expresión de TL1A y enfermedad inflamatoria intestinal se ha identificado por los investigadores (Prehn JL et al., (2004) Clin Immunol, 112: 66-77; Bamias G et al., (2003) J Immunol, 171: 4868-4874). La enfermedad de Crohn, que es un trastorno intestinal inflamatorio grave, se piensa que se origina de factores de predisposición genética y ambiental que causan un desequilibrio de las respuestas celulares efectoras (proinflamatorias) y de linfocitos T reguladores, dando como resultado la inflamación de la mucosa gastrointestinal y la enfermedad. La ruta TL1A/DR3 ha demostrado que desempeña un papel importante en enfermedades 55 intestinales, tales como la enfermedad de Crohn (Papadakis KA et al., (2005) J. Immunol, 174: 4985-4990; Bamias G et al., (2003) anteriormente), y, por lo tanto, el bloqueo de la ruta TL1A/DR3 puede ofrecer oportunidades terapéuticas en esta enfermedad.

- Los receptores de muerte y sus ligandos desempeñan un papel clave en el mantenimiento de homeostasis del tejido y la regulación fisiológica de la muerte celular programada. La unión de un ligando de muerte induce la oligomerización del receptor, el reclutamiento de una proteína adaptadora a través de un elemento de señalización citoplasmático conservado denominado el dominio de la muerte, la activación de las caspasas y la inducción de la apoptosis (Young HA et al., (2006) Proc Natl Acad Sci USA, 103(22): 8303-8304). Aunque inicialmente se caracterizaron inicialmente los receptores de muerte tales como Fas/Apo-1/CD95, TNF-R1, TRAIL-R1, TRAIL-R2, o DR3 como inductores de apoptosis, hay creciente evidencia de que estos receptores también tienen funciones no-apoptóticas, incluyendo la regulación de la respuesta inmune adaptativa. Bamias *et al.*, informaron que TL1A se expresa por células dendríticas de la lámina propia y que funciona mediante el aumento de la proliferación de células de memoria, pero no linfocitos T CD4+ sin tratar y sinergiza con IL-12 y/o estimulación de dosis baja de los receptores de linfocitos T para mejorar fuertemente la expresión génica de IFN- γ (Bamias Get al., (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 8441-8446). La expresión de IFN- γ en el intestino se ha considerado un marcador de inflamación y muchas estrategias para tratar la enfermedad de Crohn dependen de amplios intentos para suprimir el estado de activación inmune. Sin embargo, dichos enfoques (tratamiento con esteroides y fármacos inmunosupresivos) no se centran específicamente en el intestino y, por lo tanto, tienen sus propias complicaciones. Las terapias dirigidas basadas en el uso de antagonistas del TNF- α se introdujeron con éxito en la década de 1990 y los resultados sugieren que la terapia dirigida específicamente contra TL1A o su receptor puede proporcionar una terapia dirigida alternativa para este trastorno debilitante.
- 20 Se han generado anticuerpos contra TL1A humano tales como los descritos en el documento WO2012064682, y no se proporcionó ninguna demostración del potencial terapéutico de dichos anticuerpos.

- Los tratamientos actuales para la enfermedad de Crohn incluyen los anticuerpos monoclonales de anti-TNF- α Infliximab (Remicade®; Centocor) y Adalimumab (Humira®; Abbott), así como antiinflamatorios (por ejemplo, sulfasalazina), cortisona o esteroides (por ejemplo, prednisona), supresores del sistema inmunitario (por ejemplo, 6-mercaptopurina) y antibióticos. Sin embargo, el Infliximab es la opción de tratamiento único que tiene un alto grado de especificidad en comparación con los demás tratamientos disponibles (Young HA *et al.*, (2006) anteriormente). Aunque generalmente Infliximab se tolera bien, puede causar una recurrencia de la infección de tuberculosis, empeoramiento de la insuficiencia cardíaca, enfermedad de desmielinizante y una mayor incidencia de linfoma.
- 30 Por lo tanto sigue existiendo la necesidad en la técnica de composiciones que puedan usarse en el tratamiento y diagnóstico de diversas enfermedades y trastornos inflamatorios e inmunes.

Resumen de la invención

- 35 La presente descripción se refiere generalmente a anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen a TL1A, a métodos para su preparación y uso, incluyendo los métodos para tratar trastornos mediados por TL1A. Los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la presente invención que se unen a TL1A presentan numerosas propiedades deseables y pueden ser útiles para el tratamiento de diversas enfermedades, que incluyen, pero sin limitación, enfermedades inflamatorias y/o enfermedades autoinmunes, incluyendo entre otras, enfermedades inflamatorias del intestino (por ejemplo, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), artritis reumatoide, esclerosis múltiple (EM), aterosclerosis, rechazo de trasplante, lesión del sistema nervioso central, psoriasis, leucemia o linfoma (por ejemplo, leucemia linfocítica crónica (CLL)), aterosclerosis, y carcinomas de pulmón y colon. Los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la presente invención que se unen a TL1A exhiben numerosas propiedades deseables y pueden ser útiles para el tratamiento de diversas enfermedades, incluyendo, pero sin limitación, enfermedades inflamatorias y/o enfermedades autoinmunes, incluyendo entre otras enfermedades inflamatorias del intestino (por ejemplo, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), artritis reumatoide, esclerosis múltiple (EM), aterosclerosis, rechazo de trasplante, lesión del sistema nervioso central, psoriasis, leucemia o linfoma (por ejemplo, leucemia linfocítica crónica (CLL)), aterosclerosis y carcinomas de pulmón y colon, enfermedad pulmonar obstructiva crónica EPOC, neuritis óptica, degeneración macular relacionada con la edad, lupus eritematoso sistémico (SLE), síndrome de Sjogren, esclerodermia, esclerosis sistémica, enfermedad renal crónica, fibrosis hepática, tuberculosis, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis pulmonar inducida por tuberculosis, fibrosis retroperitoneal, fibrosis pulmonar, fibrosis quística, fibrosis endomiocárdica, fibrosis atrial, fibrosis mediastínica, mielofibrosis (médula ósea), fibrosis retroperitoneal, fibrosis masiva y progresiva, fibrosis sistémica nefrogénica, artrofibrosis.

En un aspecto, la presente descripción proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo, que se une a un TL1A humano, murino, de rata y de cynomolgus que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, y/o una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 52, y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53; y/o que comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54, y/o una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55, y/o una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56.

5

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a TL1A que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A que comprende una región marco variable de cadena pesada que es el producto o derivado de un gen humano seleccionado del grupo que consiste en: IGHVI-2*02 (SEQ ID NO: 3), IGHVI-2*04 (SEQ ID NO: 4), IGHVI-2*05 (SEQ ID NO: 5), IGHVI-2*01 (SEQ ID NO: 6), e IGHVI-46*01 (SEQ ID NO: 7).

10

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una región marco variable de cadena ligera que es el producto de o derivado del gen humano IGHVI-2*02 (SEQ ID NO: 3), y en el que la región marco variable de cadena pesada comprende al menos una modificación aminoacídica de la región marco correspondiente de la región variable de cadena ligera del anticuerpo murino correspondiente.

15

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, y en el que la región marco variable de cadena pesada comprende al menos una modificación aminoacídica de la región marco variable de cadena pesada correspondiente del anticuerpo murino correspondiente.

20

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a TL1A que comprende una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A que comprende una región marco variable de cadena ligera que es el producto o derivado de un gen humano seleccionado del grupo que consiste en: IGKV1-33*01 (SEQ ID NO: 8), IGKV1D-33*01 (SEQ ID NO: 9), IGKV1D-12*02 (SEQ ID NO: 10), IGKV1D-12*01 (SEQ ID NO: 11) e IGKV1-12*02 (SEQ ID NO: 12).

25

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una región marco variable de cadena ligera que es el producto o derivado del gen humano IGKV1-33*01 (SEQ ID NO: 8), y en el que la región marco variable de cadena ligera comprende al menos una modificación aminoacídica de la región marco correspondiente de la región variable de cadena ligera del anticuerpo murino correspondiente.

30

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A que comprende una secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 16, 21, 22, 23 y 24. En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A que comprende una secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 17 y 25.

35

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A que comprende:

40

(a) una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 o 24; y

45

(b) una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 13, 26, 27, 28 y 29. En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 14 y 30.

50

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A que comprende:

55

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 o 29; y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A, en el que el anticuerpo comprende una región Fc de IgG4 humana, en el que el anticuerpo no tiene actividad de citotoxicidad mediada por Fc. En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A, en el que el anticuerpo comprende una región Fc de IGHG1 humana, en el que el anticuerpo es competente para mecanismos de citotoxicidad tales como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). En un aspecto preferido, el anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A tiene una región Fc de IGHG1 no fucosilada y presenta mecanismos de citotoxicidad mediados por Fc potenciados tal como ADCC.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo de reactividad cruzada del fragmento del mismo que se une a TL1A humano y que también se une a TL1A murino, de rata y cynomolgus. Se entiende por "anticuerpo de reactividad cruzada" un anticuerpo que se une a un antígeno de una especie, por ejemplo, humana, y que también se une al antígeno correspondiente en una especie diferente, por ejemplo, rata.

En otro aspecto, la descripción de la presente invención también describe anticuerpos antagonistas o fragmentos de los mismos que se unen con una afinidad similar al TL1A como el anticuerpo quimérico correspondiente, por ejemplo, retienen al menos el 85 % de la afinidad de unión a TL1A (K_D) del anticuerpo quimérico correspondiente, o tienen al menos una afinidad de unión a TL1A (K_D) equivalente o mayor en comparación con el anticuerpo quimérico correspondiente. En un aspecto preferido el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo tiene aproximadamente una afinidad de unión de TL1A tres veces superior en comparación con el correspondiente anticuerpo quimérico.

En un aspecto adicional, la presente invención también describe anticuerpos humanizados o fragmentos de éstos que se unen a hTL1A e inhibe la interacción del hTL1A con DR3 y DcR3.

La descripción de la presente invención también proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican anticuerpos y fragmentos de los mismos que se unen a TL1A, vectores y células huésped que comprenden el ácido nucleico o el vector. También se proporcionan composiciones que comprenden el anticuerpo anti-TL1A o fragmento del mismo, y un vehículo e inmunoconjugados farmacéuticamente aceptables que comprenden el anticuerpo o fragmento del mismo unido a un agente terapéutico.

La presente divulgación también proporciona métodos para tratar trastornos mediados por TL1A. En un aspecto, en un modelo *in vitro* de la secreción de IFN γ inducida por TL1A por los linfocitos T CD4 preparados, un anticuerpo anti-TL1A o fragmento del mismo eficientemente suprimen la producción de IFN γ inducida por los monocitos estimulados por el complejo inmune. En otro aspecto, en un modelo *in vivo* de asma alérgica, un anticuerpo anti-TL1A redujo el número de eosinófilos en el fluido de lavado broncoalveolar de ratones asmáticos en aproximadamente 4 veces. En un aspecto adicional, en un modelo *in vivo* de la colitis aguda inducida en ratones con dextrano sulfato de sodio (DSS) y en ratas por ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS), un anticuerpo anti-TL1A fue eficaz en la reducción de los síntomas de la enfermedad.

La presente descripción también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti-TL1A o fragmentos del mismo, y un vehículo, tal como un diluyente o excipiente.

La presente descripción también proporciona kits y artículos de fabricación que comprenden el anticuerpo o fragmentos del mismo, una composición o un inmunoconjugado para el tratamiento de un trastorno mediado por TL1A.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Esta figura muestra la unión de anticuerpos de hibridomas a TL1A-his humanos (Figura 1A) o la proteína-his irrelevante (Figura 1B), detectada utilizando un anticuerpo secundario IgG anti-ratón marcado con HRP y sustrato de TMB. La Figura 1A muestra la absorbancia a 450 nm de ELISA contra TL1A-his humano recubierto y la Figura 1B muestra la absorbancia a 450 nm de ELISA frente a una proteína-his irrelevante.

Figura 2: Esta figura muestra el efecto de los anticuerpos anti-TL1A de hibridoma purificados en tres concentraciones diferentes en ELISA de bloqueo, donde la unión de TNFRSF25 humano a TL1A se evaluó en presencia de los anticuerpos que mostrados en la Figura 2. La absorbancia se leyó a 450 nm. mIgG: control de isotipo IgG de ratón.

Figura 3: Los candidatos 5G6 parentales bloquean el efecto de TL1A unido a la membrana y soluble

producido por monocitos activados: Figura 3A: PBMC de donantes sanos se estimularon con complejos inmunes, y después se tiñeron con anticuerpos fluorescentes. Los monocitos se regularon basándose en la gran dispersión de luz directa y parámetros de dispersión lateral altos. El gráfico de histograma muestra la fluorescencia de PE de la población de monocitos regulada. El histograma sombreado con gris representa el control de isotipo y el histograma en blanco representa la tinción con anti TL1A. Figura 3B: Los sobrenadantes de monocitos humanos purificados de PBMC de donantes sanos estimulados con complejos inmunes se recogieron y se ensayaron por ELISA para detectar la presencia de proteínas sTL1A. El gráfico muestra la concentración interpolada de TL1A medida en los sobrenadantes de las condiciones indicadas. "Estimulación IC" significa estimulado con complejo inmune. "NS" significa no estimulado. Figura 3C: Los linfocitos T CD4 sin tratar purificados a partir de PBMC de donantes sanos se incubaron con IL-12, IL-18 y monocitos autólogos estimulados con IC. El anticuerpo 5G6 quimérico parental se añadió a las concentraciones indicadas en la tabla al mismo tiempo que los monocitos. NA indica que no se añadieron IL-12 e IL-18. Los sobrenadantes de cultivos se cuantificaron mediante ELISA. El gráfico muestra la concentración de IFN- γ interpolada para cada condición indicada.

Figura 4: El candidato 5G6 parental se une a ratón, rata, mono cynomolgus y TL1A humano: La unión de 5G6 en la parte extracelular de proteína TL1A correspondiente a secuencias humanas (*Homo sapiens*), rata (*Ratus norvegicus*), ratón (*Mus musculus*) y mono cynomolgus (*Macaca fascicularis*) se determinó por inmunofluorescencia. El gráfico muestra la absorbancia a 450 nm según el log de la concentración de 5G6 utilizado.

Figura 5: Anticuerpos 5G6 humanizados bloquean la secreción de IFN- γ inducida por TL1A por linfocitos T CD4 cebados: Los linfocitos T CD4 sin tratar se incubaron con IL-12, IL-18 y TL1A humano recombinante soluble y los candidatos 5G6 humanizados (VH3/VL1, VH4/VL1, VH5/VL1 y VH2/VL2) se añadieron a las concentraciones indicadas en la tabla. NA indica que no se añadieron IL-12 e IL-18. Los sobrenadantes de cultivo se cuantificaron por ELISA para la concentración de IFN- γ . Los gráficos 5A a 5D muestran la concentración de IFN- γ para cada condición de cultivo. Cada gráfico muestra el resultado de un candidato 5G6 humanizado.

Figura 6: El anticuerpo 5G6 humanizado redujo el número de células en el fluido de lavado broncoalveolar (BAL) en un modelo murino de asma alérgica. Los ratones se trataron con el candidato 5G6 humanizado (VH5/VL1; bisagra de formato IgG4 estabilizada) a 50 mg/kg o una cantidad equivalente de IgG de control humano, o dexametasona a 5 mg/kg (control positivo), el día 28, 30 y 33 después de la inducción de una respuesta inmunológica inducida por la estimulación de ovoalbúmina. El gráfico muestra el número de eosinófilos en el fluido de BAL para cada ratón y se calculó el número promedio de eosinófilos para cada grupo. La desviación estándar se calculó usando ANOVA unidireccional * indica $p < 0,05$, y ** indica $p < 0,01$.

Figura 7: El tratamiento por un anticuerpo 5G6 humanizado mejora el acortamiento del colon en un modelo de colitis aguda inducida por DSS. Los ratones se trataron 3 x semanas con 50 mg/kg de anticuerpo 5G6 humanizado (VH5/VL1; bisagra formato IgG4 estabilizada) o una cantidad equivalente de control de isotipo, o ciclosporina en 5 mg/kg (control positivo). El gráfico muestra la toda la longitud del colon para cada ratón y la longitud promedio por grupo. La desviación estándar se calculó usando ANOVA unidireccional * indica $p < 0,05$, ** indica $p < 0,01$ y *** indica $p < 0,001$.

Figura 8: El tratamiento por anticuerpo 5G6 humanizado mejora la gravedad de la enfermedad en un modelo inducido por TNBS de colitis aguda. Las ratas se trataron i.p con una dosis única de anticuerpo 5G6 humanizado (50 mg/kg) o una cantidad igual de control de isotipo, dos horas después de la administración de TNBS. Se administró prednisolona como control positivo. La gravedad de la enfermedad se evaluó mediante una puntuación colónica por adherencias, estenosis, úlceras y espesor de la pared y la puntuación promedio se muestra en los histogramas. La desviación estándar se calculó usando una prueba t de Student y * indica $p < 0,05$.

Figura 9: La unión de 5G6 a hTL1A está bloqueada por hDcR3-Fc y hDR3-Fc. TL1A humano marcado con histidina se recubrió en 2 $\mu\text{g/ml}$ en una placa de ELISA y se incubó con 20 $\mu\text{g/ml}$ de 5G6 en presencia de 10 $\mu\text{g/ml}$ de fusiones Fc de los ectodominios de cualquier DcR3 humano (barra blanca), DR3 (barra negra) o un receptor irrelevante (Ctrl-Fc, barra sombreada) seguido de detección con IgG anti-humana conjugada con peroxidasa (específica de Fab).

Descripción detallada de la invención

La presente descripción se refiere a anticuerpos y fragmentos de los mismos que se unen a TL1A.

El término "TL1A" como se usa en el presente documento incluye variantes, isoformas y homólogos de especies de TL1A. Por consiguiente, los anticuerpos de esta descripción pueden unirse a TL1A humano y pueden reaccionar de forma cruzada con TL1A de especies que no sean humanos, por ejemplo, ratón, rata o mono cynomolgus. En ciertas

realizaciones, los anticuerpos pueden ser completamente específicos para una o más proteínas TL1A humanas y pueden no presentar especies u otros tipos de reactividad cruzada no humana. La secuencia de aminoácidos completa de un TL1A humano ejemplar tiene el número de acceso de Swiss-Prot 095150 (TNFSF15_HUMAN; SEQ ID NO:38). TL1A también se conoce como TNFSF15; proteína 1A tipo TNF; VEGI; TNF γ . El TL1A humano se designa ID del gen: 9966 por Entrez Gene, y HGNC: 11931 por HGNC. TL1A puede codificarse por el gen designado TNFSF15/TL1A. La secuencia de aminoácidos completa de un TL1A murino ejemplar tiene el número de acceso de Swiss-Prot Q5UBV8 (TNFSF15_MOUSE; SEQ ID NO: 39). El TL1A murino se designa ID del gen: 326623 por Entrez Gene. La secuencia de aminoácidos completa de un TL1A de rata ejemplar tiene el número de acceso de Swiss-Prot Q8K3Y7 (TNFSF15_RAT; SEQ ID NO: 40). El TL1A de rata se designa ID del gen: 252878 por Entrez Gene. La secuencia de aminoácidos completa de un TL1A de cyno (*macaca fascicularis*) ejemplar tiene la SEQ ID NO: 41.

El uso de "TL1A" en el presente documento incluye todos los alelos conocidos y aún no descubiertos y las formas polimórficas de TL1A, preferiblemente TL1A humano.

El término "anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A" como se usa en el presente documento incluye anticuerpos o un fragmento de los mismos que se unen al TL1A, por ejemplo, TL1A humano en forma aislada, con una afinidad (K_D) de 850 pM o menos, preferiblemente 700 nM o menos, más preferiblemente 300 nM o menos, más preferiblemente 260 nM o menos, incluso más preferiblemente 250 nM o menos.

El término "anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A" incluye anticuerpos o fragmentos de unión antígenicos del mismo.

El término "anticuerpo" como se denomina en el presente documento incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno o cadenas sencillas de los mismos. Un "anticuerpo" se refiere a una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR) con secuencias hipervariables y/o implicadas en el reconocimiento de antígenos y/o usualmente forman bucles estructuralmente definidos, intercalados con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR o FW). Cada VH y VL está compuesto por tres CDR y cuatro FW, dispuestos desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FW1, CDR1, FW2, CDR2, FW3, CDR3, FW4. Las secuencias de aminoácidos de FW1, FW2, FW3 y FW4 constituyen juntas la "región no CDR" o "región CDR no extendida" de VH o VL como se hace referencia en el presente documento.

El término "región marco variable de cadena pesada" como se hace referencia en el presente documento puede comprender una o más (por ejemplo, una, dos, tres y/o cuatro) secuencias de la región marco de cadena pesada (por ejemplo, marco 1 (FW1), marco 2 (FW2), marco 3 (FW3) y/o marco 4 (FW4)). Preferiblemente, la estructura de región variable de cadena pesada comprende FW1, FW2 y/o FW3, más preferiblemente FW1, FW2 y FW3. El término "región marco variable de cadena ligera" como se hace referencia en el presente documento puede comprender una o más (por ejemplo, una, dos, tres y/o cuatro) secuencias de la región marco de cadena ligera (por ejemplo, marco 1 (FW1), marco 2 (FW2), marco 3 (FW3) y/o marco 4 (FW4)). Preferiblemente, la estructura de región variable de cadena ligera comprende FW1, FW2 y/o FW3, más preferiblemente FW1, FW2 y FW3.

Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores huésped, incluyendo diversas células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el Primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.

Los anticuerpos se agrupan en clases, también denominadas isotipos, según se determina genéticamente por la región constante. Las cadenas ligeras constantes humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa (CK) y lambda (CL). Las cadenas pesadas se clasifican como mu (μ), delta (δ), gamma (γ), alfa (α) o épsilon (ϵ), y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Por lo tanto, "isotipo" como se usa en el presente documento se refiere a cualquiera de las clases y/o subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes. Los isotipos de inmunoglobulina humana conocidos son IgG1

- (IGHG1), IgG2 (IGHG2), IgG3 (IGHG3), IgG4 (IGHG4), IgA1 (IGHA1), IgA2 (IGHA2), IgM (IGHM), IgD (IGHD), e IgE (IGHE). El denominado gen IGHGP pseudo-gamma de inmunoglobulina humana representa un gen de la región constante pesada de inmunoglobulina humana adicional que se ha secuenciado pero no codifica una proteína debido a una región de cambio alterada (Bensmana M et al., (1988) Nucleic Acids Res. 16(7): 3108). A pesar de tener una región de cambio alterada, el gen IGHGP pseudo-gamma de inmunoglobulina humana tiene marcos de lectura abiertos para todos los dominios constantes pesados (CH1-CH3) y bisagra. Todos los marcos de lectura abiertos para sus dominios constantes pesados codifican dominios de proteína que se alinean bien con todos los dominios constantes de inmunoglobulina humana con las características estructurales previstas. Este isotipo pseudo-gamma adicional se denomina en el presente documento IgGP o IGHGP. Se han informado otros genes de pseudo-inmunoglobulina tales como los pseudogenes épsilon P1 y P2 de dominio constante pesado de inmunoglobulina humana (IGHEP1 e IGHEP2). La clase IgG es la más comúnmente utilizada con fines terapéuticos. En seres humanos, esta clase comprende las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En ratones, esta clase comprende las subclases IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c e IgG3.
- 15 El término "anticuerpo murino" como se usa en el presente documento incluye anticuerpos en los las secuencias de región variable y las secuencias de región constante se derivan de un ratón.
- El término "anticuerpo quimérico" como se usa en el presente documento incluye anticuerpos en los que las secuencias de región variable se derivan de una especie y las secuencias de región constante se derivan de otra especie, tal como un anticuerpo en el que las secuencias de región variable se derivan de un anticuerpo de ratón y las secuencias de región constante se derivan de un anticuerpo humano.
- 20 El término "anticuerpo humanizado" o "anticuerpo anti-TL1A humanizado" como se usa en el presente documento, incluye anticuerpos en los que las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas. Se pueden realizar modificaciones de la región marco adicionales dentro de las secuencias marco humanas, así como dentro de las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero.
- 25 El término "anticuerpo neutralizante" incluye un anticuerpo que es capaz de inhibir y/o neutralizar la actividad biológica de TL1A, por ejemplo, al bloquear la unión o substancialmente reducir la unión de TL1A a su receptor TNFRSF25/DR3 o el receptor señuelo TNFRSF21/DR6 y, por lo tanto, inhibir o reducir la vía de señalización desencadenada por TL1A y/o inhibir o reducir una respuesta celular mediada por TL1A como, por ejemplo, proliferación de linfocitos, expresión de citocina o supervivencia de linfocitos.
- 30 Los términos "anticuerpo antagonístico" o "anticuerpo antagonista" se usan en el presente documento de manera equivalente e incluyen un anticuerpo que es capaz de inhibir y/o neutralizar la actividad de señalización biológica de TL1A, como se describe para un anticuerpo neutralizante anteriormente.
- Los términos "anticuerpo agonístico" o "anticuerpo agonista" se usan en el presente documento de forma equivalente e incluyen un anticuerpo que es capaz de activar y/o mejorar la actividad de señalización biológica de TL1A, por ejemplo aumentando la unión de TL1A a su receptor TNFRSF25/DR3 o el receptor señuelo TNFRSF21/DR6 y así activar o mejorar la vía de señalización desencadenada por TL1A y/o activando o aumentando la respuesta celular mediada por TL1A como por ejemplo, proliferación de linfocitos, expresión de citocinas o supervivencia de linfocitos.
- 40 El término "Fab" o "región Fab" como se usa en el presente documento incluye los polipéptidos que comprenden los dominios de inmunoglobulina VH, CH1, VL y CL. Fab puede referirse a esta región en aislamiento, o esta región en el contexto de un anticuerpo de longitud completa o fragmento de anticuerpo.
- 45 El término "Fc" o "región Fc", como se usa en el presente documento, incluye el polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo que excluye el primer dominio de inmunoglobulina de la región constante. Por lo tanto, Fc se refiere a los dos últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgA, IgD e IgG, y los últimos tres dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM, y la bisagra flexible N-terminal a estos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, Fc comprende los dominios de inmunoglobulina C gamma 2 y C gamma 3 (Cγ2 y Cγ3) y la bisagra entre C gamma 1 (Cγ1) y C gamma 2 (Cγ2). Aunque los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana se define habitualmente comprendiendo los residuos C226 o P230 con respecto a su extremo carboxilo, en donde la numeración es según el sistema de numeración de EU. Para la IgG1 humana, la región Fc se define en el presente documento para comprender el residuo P232 con respecto a su extremo carboxilo, en donde la numeración es según el sistema de numeración de

EU (Edelman GM et al., (1969) Proc Natl Acad Sci USA, 63(1): 78-85). Fc puede referirse a esta región en aislamiento o esta región en el contexto de un polipéptido Fc, por ejemplo un anticuerpo.

El término "bisagra" o "región bisagra" o "región bisagra de anticuerpo" en el presente documento incluye el polipéptido flexible que comprende los aminoácidos entre los dominios constantes primero y segundo de un anticuerpo. La "región bisagra" a la que se hace referencia en el presente documento es una región de secuencia de 6-62 aminoácidos de longitud, solo presente en IgA, IgD e IgG, que incluye los residuos de cisteína que unen las dos cadenas pesadas. Estructuralmente, el dominio CH1 de IgG termina en la posición EU 220, y el dominio CH2 de IgG comienza en la posición UE del residuo 237. Por lo tanto, para la IgG, la bisagra del anticuerpo se define en el presente documento para incluir las posiciones 221 (D221 en IgG1) a 231 (A231 en IgG1), en donde la numeración es según el sistema de numeración de EU (Edelman GM et al., anteriormente).

El término "anticuerpo parental" o "inmunoglobulina parental" como se usa en el presente documento, incluye un anticuerpo no modificado que se modifica posteriormente para generar una variante. Dicho anticuerpo parental puede ser un anticuerpo de origen natural, o una versión variante o modificada de un anticuerpo de origen natural. El anticuerpo parental puede referirse al propio anticuerpo, las composiciones que comprenden el anticuerpo parental, o la secuencia de aminoácidos que lo codifica. Por "anticuerpo anti-TL1A parental" como se usa en el presente documento se entiende un anticuerpo o inmunoglobulina que se une al TL1A y se modifica para generar una variante. Por "anticuerpo murino correspondiente" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo murino o inmunoglobulina que se une al TL1A y que puede modificarse para generar una variante, específicamente el anticuerpo murino 5G6 como se describe en el presente documento. Por "anticuerpo quimérico correspondiente" como se usa en el presente documento se entiende un anticuerpo quimérico o inmunoglobulina que se une a TL1A y que puede modificarse para generar una variante.

El término "anticuerpo variante" o "variante de anticuerpo" como se usa en el presente documento incluye una secuencia de anticuerpo que difiere de la de una secuencia de anticuerpo parental en virtud de al menos una modificación aminoacídica en comparación con el parental. La secuencia de anticuerpo variante en el presente documento poseerá preferiblemente al menos aproximadamente un 80 %, mucho más preferiblemente al menos aproximadamente un 90 %, más preferiblemente al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de anticuerpo parental. La variante de anticuerpo puede referirse al propio anticuerpo, las composiciones que comprenden la variante de anticuerpo, o la secuencia de aminoácidos que la codifica.

El término "identidad" o "identidad sustancial" o "sustancialmente idéntico", al referirse a un ácido nucleico o fragmento del mismo, indica que, cuando óptimamente está alineada con inserciones de nucleótidos apropiadas o supresiones con otro ácido nucleico (o su cadena complementaria), hay identidad de secuencia de nucleótidos en al menos aproximadamente el 80 %, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de las bases de nucleótidos, según se mide por cualquier algoritmo bien conocido de la identidad de la secuencia, tal como FASTA, BLAST o GAP, como se analiza a continuación.

Según se aplica a los polipéptidos, el término "similitud sustancial" o "sustancialmente similar" significa que dos secuencias de péptidos, cuando están alineadas óptimamente, tal como por los programas GAP o BESTFIT usando los pesos del hueco por defecto, comparten al menos el 80 % de identidad de secuencia, aún más preferiblemente al menos un 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia. Preferiblemente, las posiciones de residuos que no son idénticas se diferencian por sustituciones del aminoácido conservadoras.

El término "modificación aminoacídica" en el presente documento incluye una sustitución, inserción y/o delección de aminoácidos en una secuencia polipeptídica. Por "sustitución aminoacídica" o "sustitución" en el presente documento se refiere al reemplazo de un aminoácido en una posición particular en una secuencia polipeptídica parental con otro aminoácido. Por ejemplo, la sustitución R94K se refiere a un polipéptido variante, en este caso una variante de la región marco variable de cadena pesada, en la que la arginina en la posición 94 se reemplaza por una lisina. Para el ejemplo anterior, 94K indica la sustitución de la posición 94 por una lisina. Para los fines del presente documento, las sustituciones múltiples están típicamente separadas por una barra. Por ejemplo, R94K/L78V se refiere a una variante doble que comprende las sustituciones R94K y L78V. Por "inserción de aminoácido" o "inserción" como se usa en el presente documento, se refiere a la adición de un aminoácido en una posición particular en una secuencia polipeptídica parental. Por ejemplo, la inserción -94 designa una inserción en la posición 94. Por "delección de aminoácido" o "eliminación" como se usa en el presente documento se refiere a la eliminación de un aminoácido en una posición particular en una secuencia polipeptídica parental. Por ejemplo, R94- designa la eliminación de arginina en la posición 94.

- Como se usa en el presente documento, la expresión "modificaciones conservativas" o "modificaciones de secuencia conservativas" pretende referirse a modificaciones aminoacídicas que no afectan significativamente o alteran las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Dichas modificaciones conservativas incluyen sustituciones, inserciones y deleciones de aminoácidos. Se pueden introducir modificaciones en un anticuerpo de la invención mediante técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como mutagénesis de sitio dirigido y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservativas son aquellas en las que el residuo de aminoácido se reemplaza por un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones CDR o dentro de las regiones marco de un anticuerpo de la invención pueden reemplazarse con otros residuos de aminoácidos de la misma familia de cadenas laterales y el anticuerpo alterado (anticuerpo variante) puede probarse para determinar la función conservada.
- El término "epítipo" se refiere a una región de un antígeno que está unida por un anticuerpo. Un epítipo puede definirse como estructural o funcional. Los epítipos funcionales son generalmente un subconjunto de epítipos estructurales y aquellos residuos que contribuyen directamente a la afinidad de la interacción. Los epítipos también pueden ser conformacionales, es decir, estar compuestos por aminoácidos no lineales. En ciertas modalidades, los epítipos pueden incluir factores determinantes que son agrupaciones de superficie químicamente activas de moléculas tales como los aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, grupos fosforilo o grupos sulfonilo y, en algunas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas.
- Para todos los dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina humana, la numeración está según el "sistema de numeración de EU" (Edelman GM et al., (1969) Proc Natl Acad Sci USA, 63(1): 78-85). Para el dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina kappa humana (IGKC), la numeración está según el "sistema de numeración de EU" (Edelman GM et al., *supra*).
- Para los dominios constantes de cadena ligera de inmunoglobulina lambda humana (IGLC1, IGLC2, IGLC3, IGLC6, e IGLC7), la numeración es según el "sistema de numeración de Kabat" (Kabat EA et al., (1991) Sequences of proteins of immunological interest. 5ª Edición - US Department of Health and Human Services, publicación NIH n.º 91-3242) como se describe por Dariavach P et al., (1987) Proc Natl Acad Sci USA, 84(24): 9074-8 y Frangione B et al., (1985) Proc Natl Acad Sci USA, 82(10): 3415-9.
- El término "dominio variable" se refiere a los dominios que media la unión al antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular para un antígeno particular. En los anticuerpos de origen natural, el sitio de unión al antígeno consiste en dos dominios variables que definen la especificidad: uno ubicado en la cadena pesada (VH) y el otro ubicado en la cadena ligera (VL). En algunos casos, la especificidad puede residir exclusivamente en solo uno de los dos dominios como en los anticuerpos de dominio único de anticuerpos de cadena pesada que se encuentran en los camélidos. Las regiones V son usualmente de aproximadamente 110 aminoácidos de largo, y consisten en tramos relativamente invariantes de secuencia de aminoácidos que se denominan regiones marco (FR) de 15-30 aminoácidos separados por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas "regiones hipervariables" que son de 9-12 aminoácidos de largo. Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cuatro FR, adoptando en gran medida una configuración de hoja de tiempo, conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas muy cerca por las FR, y con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat EA et al., anteriormente). El término "región hipervariable" como se usa en el presente documento se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable generalmente comprende residuos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR", siendo la última de mayor variabilidad de secuencia y/o estando implicada en el reconocimiento de antígeno. Para todos los dominios variables, la numeración está según Kabat (Kabat EA et al., anteriormente).

Se usan varias definiciones de CDR y se incluyen en el presente documento. La definición de Kabat se basa en la

variabilidad de secuencia y es la más comúnmente utilizada (Kabat EA *et al.*, anteriormente). Chothia se refiere en cambio a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia C & Lesk AM (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917). La definición de AbM es un compromiso entre las definiciones de Kabat y Chothia y se usa por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular (Martin ACR *et al.*, (1989) Proc. Natl Acad. Sci. USA, 86: 9268-72; Martin ACR *et al.*, (1991) Methods Enzymol. 203: 121-153; Pedersen JT *et al.*, (1992) Immunomethods, 1: 126-136; Rees AR *et al.*, (1996) en Sternberg M.J.E. (ed.), Protein Structure Prediction. Oxford University Press, Oxford, 141-172). La definición de contacto se ha introducido recientemente (MacCallum RM *et al.*, (1996) J. Mol. Biol. 262: 732-745) y se basa en un análisis de las estructuras complejas disponibles, que están disponibles en Protein Databank. La definición de la CDR por IMGT®, el international ImMunoGeneTics information system® (<http://www.imgt.org>) se basa en la numeración de IMGT para todas las REGIONES V del receptor de inmunoglobulinas y de linfocitos T de todas las especies (IMGT®, el international ImMunoGeneTics information system®; Lefranc MP *et al.*, (1991) Nucleic Acids Res. 27(1): 209-12; Ruiz M *et al.*, (2000) Nucleic Acids Res. 28(1): 219-21; Lefranc MP (2001) Nucleic Acids Res. 29(1): 207-9; Lefranc MP (2003) Nucleic Acids Res. 31(1): 307-10; Lefranc MP *et al.*, (2005) Dev. Comp. Immunol. 29(3): 185-203; Kaas Q *et al.*, (2007) Briefings in Functional Genomics & Proteomics, 6(4): 253-64).

Todas las regiones determinantes de complementariedad (CDR) analizadas en la presente invención, se definen preferiblemente según IMGT®. Los residuos de dominio variable para cada una de estas CDR son como se indica a continuación (numeración según Kabat EA, *et al.*, anteriormente): LCDR1: 27-32, LCDR2: 50-52, LCDR3: 89-97, HCDR1: 26-35, HCDR2: 51-57 y HCDR3: 93-102. La "región no CDR" de la región VL como se usa en el presente documento comprende las secuencias de aminoácidos: 1-26 (FR1), 33-49 (FR2), 53-88 (FR3), y 98- aproximadamente 107 (FR4). La "región no CDR" de la región VH como se usa en el presente documento comprende las secuencias de aminoácidos: 1-25 (FR1), 36-50 (FR2), 58-92 (FR3), y 103- aproximadamente 113 (FR4).

Las CDR de la presente invención pueden comprender "CDR extendidas" que se basan en las definiciones mencionadas anteriormente y tienen residuos de dominio variable como se indica a continuación: LCDR1: 24-36, LCDR2: 46-56, LCDR3: 89-97, HCDR1: 26-36, HCDR2: 47-65, HCDR3: 93-102. Estas CDR extendidas también se numeran según Kabat *et al.*, anteriormente. La "región CDR no extendida" de la región VL como se usa en el presente documento comprende las secuencias de aminoácidos: 1-23 (FR1), 37-45 (FR2), 57-88 (FR3), y 98- aproximadamente 107 (FR4). La "región CDR no extendida" de la región VH como se usa en el presente documento comprende las secuencias de aminoácidos: 1-25 (FR1), 37-46 (FR2), 66-92 (FR3), y 103- aproximadamente 113 (FR4).

El término "anticuerpo de longitud completa", como se usa en el presente documento, incluye la estructura que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo, incluyendo regiones variables y constantes. Por ejemplo, en la mayoría de los mamíferos, incluidos los seres humanos y los ratones, el anticuerpo de longitud completa de la clase IgG es un tetrámero y consiste en dos pares idénticos de dos cadenas de inmunoglobulina, teniendo cada par una cadena ligera y una cadena pesada, comprendiendo cada cadena ligera los dominios de inmunoglobulina VL y CL, y comprendiendo cada cadena pesada los dominios de inmunoglobulina VH, CH1 (Cy1), CH2 (Cy2) y CH3 (Cy3). En algunos mamíferos, por ejemplo, en camellos y llamas, los anticuerpos IgG pueden consistir en solo dos cadenas pesadas, comprendiendo cada cadena pesada un dominio variable unido a la región Fc.

Los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1, incluyendo Fab' y Fab'-SH, (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward ES *et al.*, (1989) Nature, 341: 544-546) que consiste en una sola variable, (v) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos, (vi) moléculas Fv monocatenarias (scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL están unidos por un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a antígeno (Bird RE *et al.*, (1988) Science 242: 423-426; Huston JS *et al.*, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879-83), (vii) dímeros de Fv monocatenarios biespecíficos (documento PCT/US92/09965), (viii) "diacuerpos" o "triacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos contruidos por fusión génica (Tomlinson I & Hollinger P (2000) Methods Enzymol. 326: 461-79; documento WO94/13804; Holliger P *et al.*, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-48) e (ix) scFv genéticamente condensado al mismo anticuerpo o uno diferente (Coloma MJ & Morrison SL (1997) Nature Biotechnology, 15(2): 159-163).

El término "función efectora" como se usa en el presente documento, incluye un evento bioquímico que es resultado de la interacción de una región Fc del anticuerpo con un receptor o ligando Fc. Las funciones efectoras incluyen funciones efectoras mediadas por FcγR tales como ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos) y ADCP (fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos), y funciones efectoras mediadas

por complemento tales como CDC (citotoxicidad dependiente de complemento). Una función efectora de un anticuerpo puede alterarse alterando, es decir potenciando o reduciendo, preferiblemente potenciando, la afinidad del anticuerpo por una molécula efectora tal como un receptor Fc o un componente de complemento. La función efectora puede determinarse usando ensayos basados en una o más células o *in vivo*. Tales ensayos a menudo implican el control de la respuesta de las células al anticuerpo, por ejemplo la supervivencia celular, muerte celular, cambio en la morfología celular o activación transcripcional tal como expresión celular de un gen natural o gen indicador. Por ejemplo, dichos ensayos pueden medir la capacidad de un anticuerpo para provocar ADCC, ADCP o CDC. Para algunos ensayos adicionales, puede no ser necesario añadir las células o componentes, es decir, además de las células dianas, por ejemplo, complemento suero o células efectoras tales como monocitos de sangre periférica (PBMC), células NK, macrófagos y similares. La función efectora mejorada puede determinarse comparando la función efectora de un anticuerpo alterado con un anticuerpo de control y detectando, por ejemplo, un aumento en ADCC, ADCP o CDC medido por uno o más de los ensayos mencionados anteriormente.

La afinidad de unión generalmente variará modificando el sitio de unión a la molécula efectora, y en este caso, es apropiado localizar el sitio de interés y modificar al menos parte del sitio de una manera adecuada. También se prevé que una alteración en el sitio de unión en el anticuerpo para la molécula efectora no necesita alterar significativamente la afinidad global de unión, pero puede alterar la geometría de la interacción haciendo que el mecanismo efector sea ineficaz como en una unión no productiva. Se prevé además que una función efectora también se pueda alterar modificando un sitio que no esté directamente implicado en la unión a la molécula efectora, pero que esté implicado de otro modo en el rendimiento de la función efectora. Al alterar una función efectora de un anticuerpo, puede ser posible controlar diversos aspectos de la respuesta inmune, por ejemplo, potenciar o suprimir diversas reacciones del sistema inmune, con posibles efectos beneficiosos en el diagnóstico y la terapia.

Como se usa en el presente documento, el término "trastorno mediado por TL1A" incluye afecciones tales como enfermedades inflamatorias y/o enfermedades autoinmunes, incluyendo, entre otras, enfermedades inflamatorias y/o enfermedades autoinmunes, incluyendo entre otras enfermedades inflamatorias del intestino (por ejemplo, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), artritis reumatoide, esclerosis múltiple (EM), aterosclerosis, rechazo de trasplante, lesión del sistema nervioso central, psoriasis, leucemia o linfoma (por ejemplo, leucemia linfocítica crónica (CLL)), aterosclerosis y carcinomas de pulmón y colon, enfermedad pulmonar obstructiva crónica EPOC, neuritis óptica, degeneración macular relacionada con la edad, lupus eritematoso sistémico (SLE), síndrome de Sjogren, esclerodermia, esclerosis sistémica, enfermedad renal crónica, fibrosis hepática, tuberculosis, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis pulmonar inducida por tuberculosis, fibrosis retroperitoneal, fibrosis pulmonar, fibrosis quística, fibrosis endomiocárdica, fibrosis atrial, fibrosis mediastínica, mielofibrosis (médula ósea), fibrosis retroperitoneal, fibrosis masiva y progresiva, fibrosis sistémica nefrogénica, artrofibrosis.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc. Preferentemente, el sujeto es humano.

Anticuerpos anti-TL1A

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, y/o una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53; y/o que comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54, y/o una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55, y/o una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A comprende una CDR1 de cadena pesada extendida que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57, y/o una CDR2 de cadena pesada extendida que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58, y/o una CDR3 de cadena pesada extendida que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59; y/o comprende una CDR1 de cadena ligera extendida que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60, y/o una CDR2 de cadena ligera extendida que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, y/o una CDR3 de cadena ligera extendida que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62.

Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A y comprende una CDR1 de cadena

pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, y una CDR3 de pesada cadena que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, y/o una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54, una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55, y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56. Más preferiblemente, el anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, y una CDR3 de pesada cadena que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, y una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54, una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55, y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56. Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento del mismo se une a TL1A humano y reacciona de forma cruzada con TL1A de ratón, rata y cyno.

Es bien conocido en la técnica que el dominio CDR3, independientemente de los dominios CDR1 y/o CDR2, solo puede determinar la especificidad de unión de un anticuerpo por un antígeno relacionado y que se pueden generar predeciblemente múltiples anticuerpos con la misma especificidad de unión basada en una secuencia CDR3 común. Véase, por ejemplo, Klimka A et al., (2000) Br. J. Cancer, 83(2): 252-260 (que describe la producción de un anticuerpo anti-CD30 humanizado usando solo la CDR3 de dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD30 murino Ki-4); Beiboer SH et al., (2000) J. Mol. Biol. 296: 833-849 (que describe anticuerpos de glucoproteína 2 epitelial recombinante (EGP-2) usando solo la secuencia CDR3 de cadena pesada del anticuerpo MOC-31 anti-EGP-2 murino parental); Rader C et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci USA, 95: 8910-8915 (que describe un panel de anticuerpos $\alpha\beta 3$ anti-integrina humanizados que usan un dominio CDR3 variable de cadena pesada y ligera de un anticuerpo $\alpha\beta 3$ anti-integrina murino LM609 en el que cada anticuerpo miembro comprende una secuencia distinta fuera del dominio CDR3 y capaz de unir el mismo epítipo que el anticuerpo murino parental con afinidades tan altas o más altas que el anticuerpo murino parental); Barbas C et al., (1994) J. Am. Chem. Soc. 116: 2161-62 (que describe que el dominio CDR3 proporciona la contribución más significativa a la unión al antígeno).

Por consiguiente, la presente invención proporciona anticuerpos y fragmentos de los mismos que se unen al TL1A que comprende uno o más dominios CDR3 de cadena pesada y/o ligera, que comprenden particularmente CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, y/o CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56, en donde el anticuerpo es capaz de unirse al TL1A. En algunas realizaciones, dichos anticuerpos de la invención que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo no humano (a) son capaces de competir por la unión con; (b) conservan las características funcionales; (c) se unen al mismo epítipo; y/o (d) tienen una afinidad de unión similar al anticuerpo no humano, por ejemplo, murino, parental correspondiente. En un aspecto adicional, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En un aspecto adicional, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región no CDR de una secuencia de la región variable de cadena pesada que es al menos un 80 % idéntica a la región no CDR de la secuencia de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 1.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a TL1A que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a TL1A que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29. En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A que comprende una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, y una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento del mismo se une a TL1A humano y reacciona de forma cruzada con TL1A de ratón, rata y cyno.

En otro aspecto, la presente invención proporciona variantes de un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A. Por lo tanto, la presente invención proporciona anticuerpos o fragmentos de los mismos que tienen una secuencia de aminoácidos de las regiones no CDR de la secuencia de la región variable de cadena pesada y/o

- ligera que es al menos un 80 % idéntica (que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos) a la secuencia de aminoácidos de las regiones no CDR de la secuencia de la región variable de cadena pesada y/o ligera del anticuerpo parental de la cadena pesada o ligera, por ejemplo, de las secuencias de la región variable pesada y ligera como en la SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 14, respectivamente. También se proporcionan por la presente invención anticuerpos o fragmentos de los mismos que tienen una secuencia de aminoácidos de las regiones CDR no extendidas de la secuencia de la región variable de cadena pesada y/o ligera que es al menos un 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de las regiones CDR no extendidas de la secuencia de la región variable de cadena pesada y/o ligera del anticuerpo parental de la cadena pesada o ligera. Preferiblemente, la identidad de la secuencia de aminoácidos de las regiones no CDR o de las regiones CDR no extendidas de la secuencia de la región variable de cadena pesada y/o ligera es de al menos un 85 %, más preferiblemente al menos un 90 %, y mucho más preferiblemente al menos un 95 %, en particular un 96 %, más en particular un 97 %, incluso en particular un 98 %, mucho más en particular un 99 %, incluyendo, por ejemplo, un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, y un 100 %. La identidad u homología con respecto a una secuencia de aminoácidos se define en el presente documento como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos al anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia. Por lo tanto, la identidad de secuencia puede determinarse mediante métodos estándar que se usan comúnmente para comparar la similitud en la posición de los aminoácidos de dos polipéptidos. Usando un programa informático, tal como BLAST o FASTA, dos polipéptidos se alinean para determinar la correspondencia óptima de sus respectivos aminoácidos (ya sea a lo largo de la longitud completa de una o ambas secuencias o a lo largo de una porción predeterminada de una o ambas secuencias). Los programas proporcionan una penalización de apertura predeterminada y una penalización por hueco predeterminada, y se puede usar una matriz de puntuación tal como PAM250 (una matriz de puntuación estándar; véase Dayhoff MO et al., (1978) en Atlas of Protein Sequence and Structure, vol 5, supp. 3) junto con el programa informático. Por ejemplo, el porcentaje de identidad se puede calcular como: el número total de coincidencias idénticas multiplicado por 100 y luego dividido por la suma de la longitud de la secuencia más larga dentro del intervalo combinado y el número de huecos introducidos en las secuencias más largas para alinear las dos secuencias.
- En algunas realizaciones, por lo tanto, la presente descripción proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una secuencia de región marco variable de cadena pesada que es al menos un 65 % idéntica a la secuencia de región marco de SEQ ID NOS: 3, 4, 5, 6 o 7, y/o una secuencia de región marco variable de cadena ligera que es al menos un 75 % idéntica a la secuencia de región marco de SEQ ID NOS: 8, 9, 10, 11 y 12. En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una secuencia de región marco variable de cadena pesada que es al menos un 69 % idéntica a la secuencia de región marco de SEQ ID NO: 3, y/o una secuencia de región marco variable de cadena ligera que es al menos un 80 % idéntica a la secuencia de región marco de SEQ ID NO: 8.
- En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A que comprende las CDR de cadena pesada y/o ligera como se ha descrito anteriormente, y que comprende además una región marco variable de cadena pesada que es el producto o derivado de un gen humano seleccionado del grupo que consiste en IGHV1-2*02 (SEQ ID NO: 3), IGHV1-2*04 (SEQ ID NO: 4), IGHV1-2*05 (SEQ ID NO: 5), IGHV1-2*01 (SEQ ID NO: 6), e IGHV1-46*01 (SEQ ID NO: 7), preferiblemente una región marco variable de cadena pesada que es el producto o derivado del gen humano IGHV1-2*01 (SEQ ID NO: 3). La región marco variable de cadena pesada puede comprender una o más (por ejemplo, una, dos, tres y/o cuatro) secuencias de región marco de cadena pesada (por ejemplo, marco 1 (FW1), marco 2 (FW2), marco 3 (FW3) y/o marco 4 (FW4)) presentes en el producto o derivadas de los genes humanos. Preferiblemente, el marco de la región variable de cadena pesada comprende FW1, FW2 y/o FW3, más preferiblemente FW1, FW2 y FW3 presentes en el producto o derivados de un gen humano seleccionado del grupo que consiste en IGHV1-2*02 (SEQ ID NO: 3), IGHV1-2*04 (SEQ ID NO: 4), IGHV1-2*05 (SEQ ID NO: 5), IGHV1-2*01 (SEQ ID NO: 6), e IGHV1-46*01 (SEQ ID NO: 7). Las secuencias de la región marco de cadena pesada como se usan en el presente documento incluyen FW1 (posición 1 a posición 25), FW2 (posición 36 a posición 49), FW3 (posición 66 a posición 94), y FW 4 (posición 103 a posición 113), en donde la posición aminoacídica se indica utilizando el sistema de numeración expuesto en Kabat.
- En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región marco variable de cadena pesada que es el producto o derivado del gen humano IGHV1-2*01 (SEQ ID NO: 3), y en el que la región marco variable de cadena pesada comprende al menos una modificación aminoacídica de la región marco variable de cadena pesada correspondiente

del anticuerpo murino correspondiente.

En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, y en el que la región marco variable de cadena pesada comprende al menos una modificación aminoacídica de la región marco variable de cadena pesada correspondiente del anticuerpo murino correspondiente.

Preferiblemente, la modificación de aminoácidos comprende una sustitución de aminoácidos en la posición aminoacídica seleccionada del grupo que consiste en 37, 48, 50, 67, 69, 71 y 75, más preferiblemente en posiciones aminoacídicas seleccionadas del grupo que consiste en 37, 48, 50, 67 y 71, mucho más preferidas en la posición aminoacídica 37, en donde la posición aminoacídica de cada miembro del grupo se indica según la numeración de Kabat. Específicamente, la modificación de aminoácidos comprende una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en 37A, 48I, 50E, 67A, 69L, 71V y 75S, preferiblemente una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en V37A, M48I, W50E, V67A, M69L, R71V e I75S, mientras que V37A es la sustitución aminoacídica más preferida en la que la posición aminoacídica de cada miembro del grupo se indica según la numeración de Kabat.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A humano que comprende una región marco variable de cadena ligera que es el producto o derivado de un gen humano seleccionado del grupo que consiste en IGKV1-33*01 (SEQ ID NO: 8), IGKV1D-33*01 (SEQ ID NO: 9), IGKV1D-12*02 (SEQ ID NO: 10), IGKV1D-12*01 (SEQ ID NO: 11), e IGKV1-12*02 (SEQ ID NO: 12), preferiblemente una región marco variable de cadena ligera que es el producto o derivado del gen humano IGKV1-33*01 (SEQ ID NO: 8). La región marco de región variable de cadena ligera puede comprender una o más (por ejemplo, una, dos, tres y/o cuatro) secuencias de región marco de cadena ligera (por ejemplo, marco 1 (FW1), marco 2 (FW2), marco 3 (FW3) y/o marco 4 (FW4)) presentes en el producto o derivadas de los genes humanos. Preferiblemente, el marco de la región variable de cadena ligera comprende FW1, FW2 y/o FW3, más preferiblemente FW1, FW2 y FW3 presentes en el producto o derivados de un gen humano seleccionado del grupo que consiste en IGKV1-33*01 (SEQ ID NO: 8), IGKV1D-33*01 (SEQ ID NO: 9), IGKV1D-12*02 (SEQ ID NO: 10), IGKV1D-12*01 (SEQ ID NO: 11), e IGKV1-12*02 (SEQ ID NO: 12). Las secuencias de la región marco de cadena ligera como se usan en el presente documento incluyen FW1 (posición 1 a posición 23), FW2 (posición 35 a posición 49), FW3 (posición 57 a posición 88), y FW 4 (posición 98 a posición 108), en donde la posición aminoacídica se indica utilizando el sistema de numeración expuesto en Kabat.

En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una región marco variable de cadena ligera que es el producto o derivado del gen humano IGKV1-33*01 (SEQ ID NO: 8), y en el que la región marco variable de cadena ligera comprende al menos una modificación aminoacídica de la región marco correspondiente de la región variable de cadena ligera del anticuerpo murino correspondiente.

En un aspecto adicional, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En un aspecto adicional, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región no CDR de una secuencia de la región variable de cadena ligera que es al menos un 80 % idéntica a la región no CDR de la secuencia de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 2.

En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 25.

En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17. Como alternativa, la región marco variable de cadena ligera de la secuencia de cadena ligera comprende al menos una modificación aminoacídica de la región marco variable de cadena ligera correspondiente del anticuerpo murino correspondiente.

La modificación de aminoácidos puede comprender una sustitución de aminoácidos en una posición aminoacídica seleccionada del grupo que consiste en 5 y 34, en donde la posición aminoacídica de cada miembro del grupo se indica de acuerdo con la numeración de Kabat. Específicamente, la modificación de aminoácidos comprende una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en 5N, y 34S, preferiblemente T5N y N34S, en donde la posición aminoacídica de cada miembro del grupo se indica de acuerdo con la numeración de Kabat. Se prefiere particularmente una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, sin ninguna modificación de aminoácidos.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A comprende una región marco variable de cadena pesada que es el producto o derivado de un gen humano seleccionado del grupo que consiste en IGHV1-2*02 (SEQ ID NO: 3), IGHV1-2*04 (SEQ ID NO: 4), IGHV1-2*05 (SEQ ID NO: 5), IGHV1-2*01 (SEQ ID NO: 6), e IGHV1-46*01 (SEQ ID NO: 7), y una región marco variable de cadena ligera que es el producto o derivado de un gen humano seleccionado del grupo que consiste en IGKV1-33*01 (SEQ ID NO: 8), IGKV1D-33*01 (SEQ ID NO: 9), IGKV1D-12*02 (SEQ ID NO: 10), IGKV1D-12*01 (SEQ ID NO: 11), e IGKV1-12*02 (SEQ ID NO: 12), preferiblemente una región marco variable de cadena pesada que es el producto o derivado del gen humano IGHV1-2*02 (SEQ ID NO: 3), y una región marco variable de cadena ligera que es el producto o derivado del gen humano IGKV1-33*01 (SEQ ID NO: 8). También se incluyen por la presente invención combinaciones de regiones marco variables de cadena pesada que están presentes en el producto o derivadas de diferentes genes humanos mencionados anteriormente y/o de regiones marco de región variable de cadena ligera que están presentes en el producto o derivadas de diferentes genes humanos mencionados anteriormente.

Las secuencias de ADN de línea germinal de genes humanos de región variable de cadena pesada y ligera pueden encontrarse en la base de datos de secuencia de línea germinal humana "VBase" (disponible en Internet en www.mrcpc.cam.ac.uk/vbase), así como en Kabat EA *et al.*, anteriormente; Tomlinson IM *et al.*, (1992) J. Mol. Biol. 227: 776-798 y Cox JPL *et al.*, (1994) Eur. J. Immunol. 24: 827-836. Como otro ejemplo, las secuencias de ADN de la línea germinal para genes de la región variable de cadena pesada y ligera humana se pueden encontrar en la base de datos de Genbank.

En otro aspecto, la presente descripción también proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A, en el que al menos una de las CDR de cadena pesada y/o al menos una de las CDR de cadena ligera comprende al menos una modificación aminoacídica. La mutagénesis de sitio dirigido o la mutagénesis mediada por PCR pueden realizarse para introducir la modificación o modificaciones y el efecto sobre la unión al anticuerpo, u otras propiedades funcionales de interés puede evaluarse en ensayos *in vitro* o *in vivo*. Preferiblemente se introducen modificaciones conservativas. La modificación o modificaciones pueden ser sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos, pero son preferiblemente sustituciones. Típicamente, no se realizan más de cinco, preferiblemente no más de cuatro, más preferiblemente no más de tres, incluso más preferiblemente no más de dos, mucho más preferiblemente no más de una modificación aminoacídica dentro de una región CDR.

En ciertas realizaciones, las secuencias marco pueden usarse para diseñar regiones variables para producir anticuerpos variantes. Los anticuerpos variantes de la invención incluyen aquellos en los que se han realizado modificaciones a residuos marco dentro de VH y/o VK, por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente, dichas modificaciones de marco se realizan para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque es "retromutar" uno o más residuos marco en la secuencia murina correspondiente o "retromutar" uno o más residuos marco en una secuencia de línea germinal correspondiente.

Por lo tanto, en un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A, en el que al menos una de las secuencias de región marco de la región variable de cadena pesada del anticuerpo o fragmento del mismo comprende al menos una modificación aminoacídica de la región marco correspondiente de la región variable de cadena pesada del anticuerpo murino correspondiente. Preferiblemente, la modificación de aminoácidos es una sustitución de aminoácidos. Típicamente, no se realizan más de siete, preferiblemente no más de seis, preferiblemente no más de cinco, preferiblemente no más de cuatro, más preferiblemente no más de tres, incluso más preferiblemente no más de dos, mucho más preferiblemente no más de una modificación aminoacídica dentro de una región marco. En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A, en el que la modificación de aminoácidos de las regiones marco de la región variable de cadena pesada comprende una sustitución de aminoácidos en la posición aminoacídica seleccionada del grupo que consiste en 37, 48, 50, 67, 69, 71, y 75, y en donde la posición aminoacídica de cada miembro del grupo se indica según la numeración de Kabat. La sustitución de aminoácidos preferida de las regiones marco de la región variable de cadena pesada es en las posiciones aminoacídicas seleccionadas del grupo que consiste en 37, 48, 50, 67 y 71. Las sustituciones de aminoácidos más preferidas de las regiones marco de la región variable de cadena pesada se seleccionan del grupo que consiste en V37A, M48I, W50E, V67A, M69L, R71V e I75S, mientras que V37A es la sustitución de aminoácidos más preferida de las regiones marco de la región variable de cadena pesada.

La presente descripción también proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A, en el que al menos una de las secuencias de región marco de la región variable de cadena ligera del anticuerpo o fragmento del mismo puede comprender al menos una modificación aminoacídica de la región marco correspondiente de la región variable de cadena ligera del anticuerpo murino correspondiente. Preferiblemente, la modificación de aminoácidos es

una sustitución de aminoácidos. Típicamente, no se realizan más de dos, más preferiblemente no más de una y más preferiblemente, ninguna modificación de aminoácidos dentro de una región marco. En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo, en el que la modificación de aminoácidos de las regiones marco de la secuencia de la región variable de cadena ligera comprende una sustitución de aminoácidos en la posición aminoacídica seleccionada del grupo que consiste en 5 y 34. Las modificaciones aminoacídicas de las regiones marco de la secuencia de la región variable de cadena ligera comprenden una sustitución seleccionada del grupo que consiste en 5N y 34S, preferiblemente T5N y N34S, y en donde la posición aminoacídica de cada miembro del grupo se indica según la numeración de Kabat. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención puede comprender modificaciones de aminoácidos de las regiones marco de la secuencia de región variable de cadena pesada como se ha expuesto anteriormente, y modificaciones de aminoácidos de las regiones marco de la secuencia de la región variable de cadena ligera como se ha expuesto anteriormente.

La presente descripción también proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A que comprende una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 13, 26, 27, 28 y 29, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 26, 27, 28 y 29, más preferiblemente del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 27, 28 y 29 e incluso más preferiblemente del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 27 y 29. La presente descripción también proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A que comprende una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 14 y 30, más preferiblemente SEQ ID NO: 14. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A comprende una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 26, 27, 28 y 29, y una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 14 y 30. Dado que cada una de estas secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera se puede unir al TL1A, las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera se pueden "mezclar y combinar" para crear moléculas de unión anti-TL1A de la invención. La unión a TL1A de dichos anticuerpos "mezclados y combinados" se puede analizar usando los ensayos de unión descritos, por ejemplo, en los Ejemplos.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A comprende una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 27 y 29, y una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 14 y 30. En realizaciones más preferidas, el anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. Mucho más preferido es un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A que comprende una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 27 y 29, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

La presente descripción también proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A que comprende una secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 16, 21, 22, 23 y 24, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 22, 23 y 24 y más preferiblemente del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 22 y 24. La presente descripción también proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A que comprende una secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 17 y 25, más preferiblemente SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A comprende una secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 21, 22, 23 y 24, y una secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 17 y 25. Dado que cada una de estas secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera se puede unir al TL1A, las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera se pueden "mezclar y combinar" para crear moléculas de unión anti-TL1A de la invención. La unión a TL1A de dichos anticuerpos "mezclados y combinados" se puede analizar usando los ensayos de unión descritos, por ejemplo, en los Ejemplos.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A comprende una secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 22 y 24, y una secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 17 y 25. En realizaciones más preferidas, el anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17. Mucho más preferido es un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A que comprende una secuencia de cadena

pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 22 y 24, y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17.

En una realización de la presente descripción, el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo humanizado.

5 Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo monoclonal humanizado.

La presente descripción también proporciona un anticuerpo monovalente o fragmento del mismo que se une al TL1A, es decir, un anticuerpo que consiste en un único brazo de unión a antígeno. La presente descripción también proporciona un fragmento de un anticuerpo que se une al TL1A seleccionado del grupo que consiste en Fab, Fab',
10 Fab'-SH, Fd, Fv, dAb, F(ab')₂, scFv, dímeros de Fv monocatenarios biespecíficos, diacuerpos, triacuerpos y scFv genéticamente condensado al mismo anticuerpo o uno diferente. Los fragmentos preferidos son scFv, dímeros de Fv monocatenarios biespecíficos y diacuerpos. La presente descripción también proporciona un anticuerpo de longitud completa que se une al TL1A.

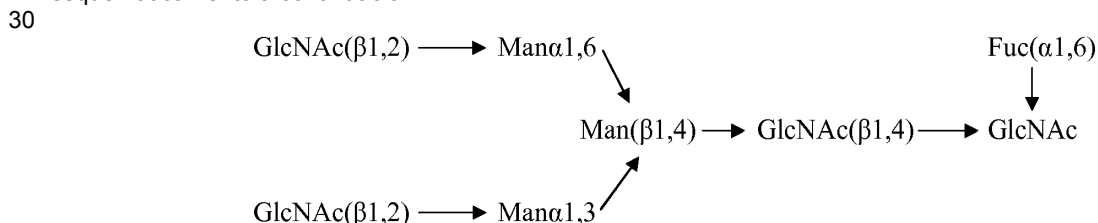
15 La presente descripción también proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A que comprende además una región constante pesada y/o ligera, en particular, una región constante pesada humana y/o ligera humana. Las regiones constantes pesadas humanas pueden seleccionarse del grupo que inmunoglobulinas humanas que consisten en IgG1 (IGHG1), IgG2 (IGHG2), IgG3 (IGHG3), IgG4 (IGHG4), IgA1 (IGHA1), IgA2 (IGHA2), IgM (IGHM), IgD (IGHD), o IgE (IGHE), mientras que se prefiere la región constante pesada humana IgG,
20 en particular IgG1 (IGHG1). La región constante ligera humana puede seleccionarse del grupo de inmunoglobulinas humanas que consiste en regiones constantes kappa o lambda, mientras que se prefiere la región constante kappa humana. En una realización preferida, el anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A comprende un dominio constante pesado de IgG1 humana (IGHG1) y un dominio constante kappa de ligero humano.

25 Además, o como alternativa a las modificaciones realizadas dentro de las regiones marco o regiones CDR, los anticuerpos de la invención pueden diseñarse para incluir modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como la semivida en suero, fijación al complemento, unión al receptor Fc, y/o citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Además, un anticuerpo de la invención puede modificarse químicamente (por ejemplo, uno o más restos químicos se pueden unir al anticuerpo) o modificarse para
30 alterar su glucosilación. Cada una de estas realizaciones se describe con más detalle a continuación. Las modificaciones dentro de la región Fc como se detalla a continuación son según la numeración de EU de residuos en la región Fc. En una realización, la región bisagra de CH1 se modifica de tal forma que el número de residuos de cisteína en la región bisagra se altere, por ejemplo, aumenta o disminuye. Este enfoque se describe adicionalmente en la Patente de Estados Unidos N.º 5.677.425 de Bodmer et al. El número de residuos de cisteína en la región
35 bisagra de CH1 se altera, por ejemplo, para facilitar el ensamblaje de las cadenas ligera y pesada o aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo. En otra realización, la región bisagra de Fc de un anticuerpo está mutada para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región de la interfaz de dominio CH2-CH3 del fragmento bisagra de Fc de manera que el anticuerpo tiene una unión deteriorada a la proteína A estafilocócica (SpA) con respecto a la unión a SpA del
40 dominio bisagra de Fc nativo. Este enfoque se describe con más detalle en la Patente de Estados Unidos N.º 6.165.745 de Ward et al. En otra realización, el anticuerpo se modifica para aumentar su semivida biológica. Son posible diversos enfoques. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 6.277.375 de Ward. Alternativamente, para aumentar la semivida biológica, el anticuerpo puede alterarse dentro de la región CH1 o CL para contener un
45 epítipo de unión al receptor de rescate tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las Patentes de Estados Unidos N.º 5.869.046 y 6.121.022 de Presta et al. En una realización adicional, la región Fc se altera reemplazando al menos un residuo aminoacídico con un residuo aminoacídico diferente para alterar la función o funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 pueden reemplazarse por un
50 residuo aminoacídico diferente de tal forma que el anticuerpo tenga una afinidad alterada por un ligando efector pero conserve la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo parental. El ligando efector al que se modifica la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el componente C1 de complemento. Este enfoque se describe con más detalle en las Patentes de Estados Unidos N.º 5.624.821 y 5.648.260, ambas de Winter et al. En otro ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácidos 329, 331 y 322 pueden reemplazarse con un
55 residuo de aminoácido diferente de tal forma que el anticuerpo tenga alterada la unión a C1q y/o reducida o suprimida la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Este enfoque se describe con más detalle en las Patentes de Estados Unidos N.º 6.194.551 de Idusogie et al. En otro ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos en las posiciones aminoacídicas 231 a 238 en la región N-terminal del dominio CH2 se alteran para alterar de este modo la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Este enfoque se describe adicionalmente en la

Publicación PCT WO94/29351 de Bodmer et al. En otro ejemplo más, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fcγ mediante la modificación de uno o más aminoácidos en las siguientes posiciones: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439. Este enfoque se describe adicionalmente en la Publicación PCT WO00/42072 de Presta.

La presente descripción también proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A que comprende regiones constantes pesadas y/o ligeras humanas, en el que la región constante pesada humana comprende una variante isotípica que comprende la región CH1, la región bisagra, la región CH2 y región CH3 de IgG4 humana (IGHG4), y en el que la región bisagra comprende una sustitución de serina en la posición 228 por prolina. Preferiblemente, el anticuerpo que comprende la variante isotípica es un anticuerpo de longitud completa. Un anticuerpo preferido particular o fragmento del mismo que se une al TL1A que comprende una variante isotípica que comprende CH1 de IgG4 humana (IGHG4), la bisagra de IgG4 humana (IGHG4), que tiene una sustitución S228P, y la CH2 y CH3 de IgG4 humana (IGHG4). Se ha encontrado que la variante isotípica no presenta mecanismos de citotoxicidad mediados por Fc tal como ADCC, en comparación con un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A que comprende una región constante pesada humana de IgG1 humana (IGHG1) (que usualmente es una IgG1 humana nativa), es decir, en comparación con un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A que solo difiere de la variante isotípica con respecto a la región constante pesada modificada.

La presente descripción también proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A que comprende una región Fc de IgG humana, en el que la estructura de carbohidrato central madura unida a la región Fc de IgG humana carece de fucosa (denominada en el presente documento, como alternativa, "no fucosilada"). El término "estructura de carbohidrato de núcleo maduro" como se usa en el presente documento incluye una estructura de carbohidrato de núcleo procesado unida a una región Fc que consiste generalmente de la estructura de carbohidrato GlcNAc (Fucosa)-GlcNAc-Man-(Man-GlcNAc)₂ típica de oligosacáridos biantenarios representada esquemáticamente a continuación:



Este término incluye específicamente las formas G-1 de la estructura de carbohidrato maduro de núcleo que carece de un residuo β1,2 GlcNAc. Preferiblemente, sin embargo, la estructura de carbohidrato de núcleo incluye ambos residuos β1,2 GlcNAc. La estructura de carbohidrato de núcleo maduro en el presente documento generalmente no es hipermanosilada. La estructura de carbohidrato de núcleo maduro se une a la región Fc de la glucoproteína, generalmente a través de la unión N a Asn297 de un dominio CH2 de la región Fc.

Preferiblemente, el anticuerpo comprende una región Fc de IgG1 humana (IGHG1), en la que la estructura de carbohidrato central madura unida a la región Fc de IgG1 humana (IGHG1) carece de fucosa. Más preferido es un anticuerpo de longitud completa que comprende una región Fc de IgG1 humana (IGHG1), en la que la estructura de carbohidrato central madura unida a la región Fc de IgG1 humana (IGHG1) carece de fucosa. Se sabe a partir del documento WO03/035835 que la falta de fucosa en la estructura de carbohidrato central madura unida a la región Fc de IgG humana puede potenciar la ADCC. Por lo tanto, en una realización adicional, el anticuerpo o fragmento del mismo de la presente descripción comprende una región Fc de IgG1 humana (IGHG1), en la que la estructura de carbohidrato central madura unida a la región Fc de IgG1 humana (IGHG1) carece de fucosa, mientras que el anticuerpo que carece de fucosa presenta una ADCC potenciada en comparación con el anticuerpo parental o un fragmento del mismo que no contiene fucosa.

50 Los métodos para generar anticuerpos que carecen de fucosa son, por ejemplo (a) el uso de una célula huésped modificada o mutante que es deficiente en el metabolismo de la fucosa de modo que tiene una capacidad reducida para (o es incapaz de) fucosilar proteínas expresadas en la misma; (b) cultivar células en condiciones que evitan o reducen la fucosilación; (c) la eliminación postraduccion de fucosa (por ejemplo, con una enzima fucosidasa); (d) la

adición postraducciona del carbohidrato deseado, por ejemplo, después de la expresión recombinante de una glucoproteína no glucosilada; o (e) la purificación de la glucoproteína para seleccionar el producto que no está fucosilado. Preferiblemente se usan los métodos descritos en el Ejemplo 14 del documento WO10/095031, por ejemplo, los métodos descritos en Longmore et al., (1982) Carbohydr. Res. 365-92 o en Imai-Nishiya et al., (2007), BMC Biotechnol. 7: 84.

También se proporciona por la presente invención un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A y que se une al mismo epítipo que el anticuerpo que comprende la secuencia variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 27 o 29 y la secuencia variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 14. También se proporciona mediante la presente invención una región específica o epítipo de TL1A que está unido por un anticuerpo proporcionado por la presente invención, en particular por un anticuerpo que comprende la secuencia variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 27 o SEQ ID NO 29 y la secuencia variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 14. Esta región específica o epítipo del polipéptido TL1A se puede identificar mediante cualquier método de mapeo de epítopos adecuado conocido en la técnica junto con uno cualquiera de los anticuerpos proporcionados por la presente invención. Los ejemplos de tales métodos incluyen cribar péptidos de diferentes longitudes derivados de TL1A para unirse al anticuerpo de la presente invención con el fragmento más pequeño que se puede unir específicamente al anticuerpo que contiene la secuencia del epítipo reconocido por el anticuerpo. Los péptidos TL1A pueden producirse sintéticamente o mediante digestión proteolítica del polipéptido TL1A. Los péptidos que se unen al anticuerpo se pueden identificar mediante, por ejemplo, análisis de espectrometría de masas. En otro ejemplo, se pueden usar la espectroscopía de RMN o la cristalografía de rayos X para identificar el epítipo unido por un anticuerpo de la presente invención. Una vez identificado, el fragmento epitópico que se une a un anticuerpo de la presente invención se puede usar, si se requiere, como un inmunógeno para obtener anticuerpos adicionales que se unen al mismo epítipo.

Propiedades del anticuerpo anti-TL1A

Se conocen en la técnica ensayos estándar para evaluar la capacidad de unión de los anticuerpos hacia, por ejemplo, TL1A, incluyendo, por ejemplo, ELISA, BIAcore®, transferencias Western, RIA y análisis de citometría de flujo. Los ensayos adecuados se describen en detalle en los Ejemplos. La cinética de unión (por ejemplo, afinidad de unión como KD) de los anticuerpos también puede evaluarse mediante ensayos convencionales conocidos en la técnica, tales como mediante análisis de sistema Scatchard o BIAcore®. La afinidad de unión relativa Ki puede evaluarse mediante ensayos de competición estándar conocidos en la técnica.

En un aspecto adicional la presente invención proporciona anticuerpos o fragmentos del mismo que se unen a TL1A de humano, de ratón, de rata y de mono cynomolgus como se visualiza por métodos de ELISA o BIAcore®. ELISA de unión puede realizarse y medirse de acuerdo con el Ejemplo 3.

En un aspecto adicional la presente invención proporciona anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen a TL1A humano recombinante o naturalmente producido y previenen la activación y secreción de citocinas por los linfocitos T CD4. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención pueden suprimir la producción de INF γ inducido por los monocitos estimulados complejos inmunes. Un ensayo para determinar dicha secreción de citocina mediada por TL1A por los linfocitos T CD4 puede llevarse a cabo y medirse de acuerdo con los Ejemplos 3 y 6.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen al TL1A, en particular TL1A en forma aislada, con una afinidad (KD) de 850 pM o menos, preferiblemente 700 nM o menos, más preferiblemente 300 nM o menos, más preferiblemente 260 nM o menos, incluso más preferiblemente 250 nM o menos, por ejemplo, medida por resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento BIAcore® (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza) mediante la captura del anticuerpo en un chip sensor de grado de investigación CM5 acoplado a proteína A (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza; BR-1000-14) con un polipéptido TL1A soluble humano (codificado por SEQ ID NO: 116) usado como analito como se detalla en el Ejemplo 5. En un aspecto preferido, la presente invención proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que conserva al menos el 85 % de la afinidad de unión a TL1A (KD) del anticuerpo quimérico correspondiente. Preferiblemente, el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo conserva al menos el 90 % de la afinidad de unión a TL1A (KD) del anticuerpo quimérico correspondiente, más preferiblemente al menos el 95 % de la afinidad de unión (KD) del anticuerpo quimérico correspondiente. Preferiblemente, el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo se une al TL1A humano con afinidad equivalente al anticuerpo quimérico correspondiente. Por "afinidad equivalente" se refiere a un valor de afinidad que está dentro de un intervalo de ± 10 % de la afinidad de

- unión a TL1A del anticuerpo quimérico correspondiente. Más preferiblemente, la presente invención proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al TL1A humano con una afinidad mayor que el anticuerpo quimérico correspondiente. Preferiblemente, el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo se une al TL1A humano con una afinidad dos veces mayor que el anticuerpo quimérico correspondiente, más preferiblemente con una afinidad tres veces mayor que el anticuerpo quimérico correspondiente. En un aspecto preferido de la presente invención, se proporcionan anticuerpos o fragmento de los mismos que se unen al TL1A humano que tienen una afinidad de unión (K_D) de 900 pM o menos, 700 pM o menos, preferiblemente 500 pM o menos, más preferiblemente 300 nM o menos, más preferiblemente 260 pM o menos, incluso más preferiblemente 250 pM o menos, por ejemplo, medida por resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento BIAcore® (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza) mediante la captura del anticuerpo en un chip sensor de grado de investigación CM5 acoplado a proteína A (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza; BR-1000-14) con un polipéptido TL1A humano soluble (codificado por la SEQ ID NO: 116) usado como analito como se detalla en el Ejemplo 5.
- 15 Un aspecto adicional de la presente invención proporciona anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen al TL1A y que tienen buena estabilidad térmica. En una realización, preferida un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A tiene una temperatura de termoestabilidad del fragmento FAB superior a 70 °C, preferiblemente superior a 75 °C, e incluso más preferiblemente superior a 80°C. Para el análisis de la termoestabilidad del fragmento FAB, se utilizan mediciones de calorimetría de barrido diferencial, mientras que se identifica una temperatura de fusión del punto medio del fragmento FAB en el contexto de una IgG de longitud completa. Este tipo de mediciones calorimétricas son conocidas por el experto en la técnica y se pueden realizar de acuerdo con, por ejemplo, Garber E & Demarest SJ (2007) Biochem Biophys Res Commun, 355: 751-7, como se describe adicionalmente en el Ejemplo 5.

25 Ácidos nucleicos, vectores y células huésped

- La presente descripción también proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos y fragmentos de los mismos que se unen a TL1A, vectores y células huésped que comprenden el ácido nucleico o el vector. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico está "aislado" o "se vuelve sustancialmente puro" cuando se purifica de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos celulares o proteínas, mediante técnicas estándar, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, bandas de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otros ya conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, F. Ausubel, et al., ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York. Un ácido nucleico de la invención puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede contener o no secuencias de intrones. En una realización preferida, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

- Los ácidos nucleicos de la invención se pueden obtener usando técnicas estándar de biología molecular, por ejemplo, los ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo o que codifican los segmentos VH y VL, se pueden obtener por amplificación por PCR estándar o técnicas de clonación de ADNc. Para anticuerpos obtenidos a partir de una genoteca de inmunoglobulina (por ejemplo, usando técnicas de presentación en fagos), pueden recuperarse de la biblioteca de uno o más ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo. Los métodos para introducir ácido nucleico exógeno en células huésped se conocen bien en la técnica, y variarán con la célula huésped utilizada. Las técnicas incluyen, pero sin limitación, transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato cálcico, tratamiento con cloruro cálcico, transfección mediada por polietilenimina, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, infección viral o por fagos, encapsulación del polinucleótido o polinucleótidos en liposomas, y microinyección directa del ADN en los núcleos. En el caso de células de mamífero, la transfección puede ser transitoria o estable.

- 50 Las moléculas de ácidos nucleicos preferidas de la invención son las que codifican la secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 42, 43, 44, 45 y 46 y/o la secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 47 y 48. Las moléculas de ácidos nucleicos preferidas de la invención son las que codifican la región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 31, 32, 33, 34 y 35 y/o la región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en 55 SEQ ID NOS: 36 y 37.

Las moléculas de ácidos nucleicos preferidas de la invención son las que codifican la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 1 y/o la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 2, por ejemplo, ADN que codifica la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 63 y/o ADN que

codifica la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 64. Las moléculas de ácido nucleico más preferidas de la invención son las que codifican la región variable de cadena pesada de SEQ ID NOS: 27 o 29 y/o la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 14, por ejemplo, ADN que codifica la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NOS: 33 o 35 y/o ADN que codifica la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 36, que son mucho más preferidas.

Una vez que se obtienen fragmentos de ADN que codifican segmentos VH y VL, estos fragmentos de ADN pueden manipularse adicionalmente por técnicas de ADN recombinante estándar, por ejemplo para convertir los genes de la región variable en genes de la cadena de anticuerpo de longitud completa, o genes de fragmentos correspondientes a los fragmentos descritos anteriormente como los genes del fragmento Fab o un gen scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica VL o VH se une operativamente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible. El término "unido operativamente", como se usa en este contexto, pretende significar que los dos fragmentos de ADN están unidos de manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en el marco. El ADN aislado que codifica la región VH puede convertirse en un gen de cadena pesada de longitud completa uniendo operativamente el ADN que codifica VH a otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de los genes de la región constante de cadena pesada humana se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat EA *et al.*, anteriormente) y los fragmentos de ADN que incluyen estas regiones se pueden obtener por amplificación PCR estándar. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG1 (IGHG1), IgG2 (IGHG2), IgG3 (IGHG3), IgG4 (IGHG4), IgA1 (IGHA1), IgA2 (IGHA2), IgM (IGHM), IgD (IGHD), o IgE (IGHE), pero mucho más preferiblemente es una región constante de IgG1 (IGHG1). Para un gen de cadena pesada del fragmento Fab, el ADN que codifica VH se puede unir operativamente a otra molécula de ADN que codifica solo la región constante CH1 de cadena pesada. El ADN aislado que codifica la región VL puede convertirse en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como un gen de cadena ligera Fab) uniendo operativamente el ADN que codifica VL a otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de los genes de la región constante de cadena ligera humana se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat EA *et al.*, anteriormente) y los fragmentos de ADN que incluyen estas regiones se pueden obtener por amplificación PCR estándar. En realizaciones preferidas, la región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda, preferiblemente una región constante kappa. Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican VH y VL se unen operativamente a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly4-Ser)₃, de tal forma que las secuencias VH y VL pueden expresarse como una proteína monocatenaria contigua, con las regiones VL y VH unidas por el enlazador flexible (véase, por ejemplo, Bird RE *et al.*, (1988) Science, 242: 423-426; Huston JS *et al.*, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879-83; McCafferty J *et al.*, (1990) Nature, 348: 552-554). Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo de los anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron a través de digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto K *et al.*, (1992) J. Biochem. & Biophysical Methods, 24: 107-117 y Brennan M *et al.*, (1985) Science, 229: 81-3). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden producirse directamente por células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar a partir de las bibliotecas de fagos de anticuerpos analizadas anteriormente. Como alternativa, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter P *et al.*, (1992) Bio/ Technology, 10: 163-167). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ se pueden aislar directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el experto en la técnica. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv), véase, por ejemplo, el documento WO 1993/16185; Patente de Estados Unidos N.º 5.571.894 y Patente de Estados Unidos N.º 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 5.641.870, por ejemplo.

Los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la presente invención se pueden incorporar en un vector, preferiblemente un vector de expresión para expresar la proteína. Se puede utilizar una diversidad de vectores de expresión para la expresión de proteínas. Los vectores de expresión pueden comprender vectores extracromosómicos autorreplicantes o vectores que se integran en un genoma huésped. Los vectores de expresión se construyen para que sean compatibles con el tipo de célula huésped. Por lo tanto, los vectores, preferiblemente los vectores de expresión, que encuentran uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, aquellos que permiten la expresión de proteínas en células de mamífero, bacterias, células de insectos, levaduras y en sistemas *in vitro*. Como se conoce en la técnica, están disponibles una diversidad de vectores de expresión, comercialmente o de otro modo, que pueden encontrar uso en la presente invención para expresar anticuerpos.

Los vectores de expresión típicamente comprenden una proteína unida operativamente con secuencias reguladoras o de control, marcadores seleccionables, cualquier pareja de fusión y/o elementos adicionales. Por "unido operativamente" en el presente documento significa que el ácido nucleico se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. El término "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de la cadena del anticuerpo. Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology, Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). En general, estos vectores de expresión incluyen ácido nucleico regulador transcripcional y traduccional unido operativamente al ácido nucleico que codifica el anticuerpo, y son típicamente apropiados para la célula huésped utilizada para expresar la proteína. En general, las secuencias reguladoras de transcripción y traducción pueden incluir secuencias promotoras, sitios de unión ribosómica, secuencias de inicio y detención de la transcripción, secuencias de inicio y detención de la traducción, y secuencias potenciadoras o activadoras. Como también se conoce en la técnica, los vectores de expresión contienen típicamente un gen o marcador de selección para permitir la selección de células huésped transformadas que contienen el vector de expresión. Los genes de selección se conocen bien en la técnica y variarán con la célula huésped utilizada. Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células huésped dhfr- con selección/amplificación de metotrexato) y el gen neo (para selección de G418).

Las células huésped adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en el presente documento son células procariotas, de levadura o eucariotas superiores. Los procariotas adecuados para este fin incluyen eubacterias, incluyendo organismos gram-negativos o gram-positivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis*, *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Los huéspedes de clonación de *E. coli* adecuados incluyen *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537), y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325). Además de procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadería común, es la más utilizada entre los microorganismos huésped eucariotas inferiores. Sin embargo, varios otros géneros, especies y cepas están comúnmente disponibles y son útiles, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes de *Kluyveromyces* incluyendo *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. Walth* (AJCC 56.500), *K. drosopmarum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans*, o *K. marxianusyarrowia* (documento EP402226); *Pichia pastoris* (documento EP183070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP244234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos, incluyendo *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, o huéspedes de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* o *A. niger*.

Las células huésped adecuadas para la expresión de los anticuerpos de la invención se derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes de baculovirus y se han identificado células huésped de insectos permisivas correspondientes de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes augypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Una diversidad de cepas virales para transfección están disponibles públicamente, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y tales virus pueden usarse, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. Cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco también se pueden utilizar como huéspedes.

Las células huésped para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención son preferiblemente células huésped de mamífero que incluyen ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células CHO dhfr-, descritas en Urlaub G & Chasin LA (1980) Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 77: 4216-4220, usadas con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo, como se describe en Kaufman RJ & Sharp PA (1982) J. Mol. Biol, 159: 601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. En particular, para su uso con células de mieloma NSO, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión génica GS descrito en los documentos WO 87/04462 (de Wilson), WO 89/01036 (de Bebbington) y EP338841 (de Bebbington). Cuando se introducen genes de anticuerpos recombinantes en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferiblemente, para la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que crecen las células huésped. Las células huésped útiles para producir anticuerpos que se unen al TL1A se pueden cultivar en una diversidad de

medios. Medios comercialmente disponibles tales como Ham's F10 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza), medio mínimo esencial (MEM; Sigma-Aldrich Chemie GmbH), RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Basilea, Suiza) y medio Eagle modificado de Dulbecco ((DMEM; Sigma-Aldrich Chemie GmbH) son adecuados para el cultivo de células huésped. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo usando métodos estándar de purificación de proteínas.

Los anticuerpos se pueden unir operativamente a un compañero de fusión para permitir el direccionamiento de la proteína expresada, la purificación, el cribado, la presentación y similares. Los compañeros de fusión se pueden unir a la secuencia del anticuerpo a través de secuencias enlazadoras. La secuencia enlazadora generalmente comprenderá una pequeña cantidad de aminoácidos, típicamente menos de diez, aunque también se pueden usar enlazadores más largos. Típicamente, las secuencias enlazadoras se seleccionan para que sean flexibles y resistentes a la degradación. Como apreciarán los expertos en la técnica, cualquiera de una amplia variedad de secuencias se puede usar como enlazadores. Por ejemplo, una secuencia enlazadora común comprende la secuencia de aminoácidos GGGGS. Un compañero de fusión puede ser una secuencia de direccionamiento o señal que dirige el anticuerpo y cualquier pareja de fusión asociada a una ubicación celular deseada o a los medios extracelulares. Como se conoce en la técnica, ciertas secuencias de señalización pueden dirigirse a una proteína a secretar en el medio de crecimiento, o en el espacio periplásmico, localizado entre la membrana interna y externa de la célula. Un compañero de fusión también puede ser una secuencia que codifica un péptido o proteína que permite la purificación y/o el cribado. Dichos compañeros de fusión incluyen, pero sin limitación, etiquetas de polihistidina (etiquetas His) (por ejemplo, H6 y H10 u otras etiquetas para su uso con sistemas de cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC) (por ejemplo, Columnas de afinidad de Ni^{+2})), fusiones GST, fusiones MBP, etiqueta de estreptomicina, la secuencia diana de biotilación BSP de la enzima bacteriana BirA, y etiquetas de epítomos que se dirigen por anticuerpos (por ejemplo, etiquetas c-myc, etiquetas de indicadores, y similares). Como apreciarán los expertos en la técnica, dichas etiquetas pueden ser útiles para la purificación, el cribado o ambos.

Construcción y producción de anticuerpos

Los anticuerpos generados contra el polipéptido TL1A pueden obtenerse por inmunización de un animal, es decir, administrando los polipéptidos a un animal, preferiblemente un animal no humano, usando protocolos ya conocidos y de rutina, véase, por ejemplo, el Handbook of Experimental Immunology (Weir DM (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Inglaterra, 1986). Muchos animales de sangre caliente, tales como conejos, ratones, ratas, ovejas, vacas, camellos o cerdos pueden ser inmunizados. Sin embargo, los ratones, conejos, cerdos y ratas, en particulares los ratones, son generalmente los más adecuados. Los anticuerpos también se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante conocidas por el experto. En los anticuerpos adicionales se pueden producir mediante la escisión enzimática o química de los anticuerpos de origen natural. Los anticuerpos humanizados de la presente invención se pueden construir transfiriendo una o más CDR o porciones de las mismas de regiones VH y/o VL de un animal no humano (por ejemplo, ratón) a una o más regiones marco de regiones VH y/o VL humanas. Opcionalmente, los residuos marco humanos presentes de este modo en las regiones VH y/o VL pueden reemplazarse por residuos no humanos correspondientes (por ejemplo, ratón) cuando sea necesario o se desee, para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo y/o mantener la afinidad de unión. Opcionalmente, los residuos de aminoácidos no humanos presentes en las CDR pueden reemplazarse por residuos humanos. Los anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente invención se pueden preparar basándose en la secuencia de un anticuerpo monoclonal no humano preparado como se ha descrito anteriormente. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera puede obtenerse a partir del hibridoma no humano de interés y diseñarse para contener secuencias de inmunoglobulina no murinas (por ejemplo, humanas) usando técnicas de biología molecular convencionales. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas se pueden unir a regiones constantes humanas usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 4.816.567 de Cabilly et al). Para crear un anticuerpo humanizado, se pueden insertar regiones CDR murinas en un marco humano utilizando métodos conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 5.225.539 de Winter, y las Patentes de Estados Unidos N.º 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen et al).

Se pueden construir anticuerpos humanizados de la presente invención en los que la molécula aceptora humana para la región variable de cadena pesada se selecciona basándose en consideraciones de homología entre las regiones variables de la molécula aceptora potenciales y la región variable de cadena pesada del anticuerpo murino. Se prefieren moléculasceptoras humanas candidatas de línea germinal para reducir la inmunogenicidad potencial. Las bases de datos de línea germinal están compuestas de secuencias de anticuerpos que se leen a través del extremo de la región FW3 de cadena pesada y parcialmente en la secuencia CDR3. Para la selección de una región FW4, se pueden buscar bases de datos de secuencias de anticuerpos maduros que se han derivado de la molécula

- de línea germinal seleccionada o se pueden usar secuencias de anticuerpos que se han derivado de la molécula de línea germinal seleccionada de un donante humano. Las moléculas aceptoras humanas se seleccionan preferiblemente de la misma clase de cadena pesada que la molécula donante murina, y de la misma clase estructural canónica de la región variable de la molécula donante murina. Las consideraciones secundarias para la selección de la molécula aceptora humana para la región variable de cadena pesada eluden la homología en la longitud de CDR entre la molécula donante murina y la molécula aceptora humana. Las moléculas de anticuerpo aceptor humano se seleccionan preferiblemente mediante búsqueda de homología en la base de datos V-BASE, aunque también pueden usarse otras bases de datos tales como Kabat y las bases de datos públicas de NCBI.
- 10 Se pueden construir anticuerpos humanizados de la presente invención en los que la molécula aceptora humana para la región variable de cadena ligera se selecciona basándose en consideraciones de homología entre las regiones variables de la molécula aceptora potenciales y con la región variable de cadena ligera del anticuerpo murino. Se prefieren moléculas aceptoras humanas candidatas de línea germinal para reducir la inmunogenicidad potencial. Las bases de datos de línea germinal están compuestas de secuencias de anticuerpos que se leen a través del extremo de la región FW3 de cadena pesada y parcialmente en la secuencia CDR3. Para la selección de una región FW4, se pueden buscar bases de datos de secuencias de anticuerpos maduros que se han derivado de la molécula de línea germinal seleccionada o se pueden usar secuencias de anticuerpos que se han derivado de la molécula de línea germinal seleccionada de un donante humano. Las moléculas aceptoras humanas se seleccionan preferiblemente de la misma clase de cadena ligera que la molécula donante murina, y de la misma clase estructural canónica de la región variable de la molécula donante murina. Las consideraciones secundarias para la selección de la molécula aceptora humana para la región variable de cadena ligera incluyen la homología en la longitud de CDR entre la molécula donante murina y la molécula aceptora humana. Las moléculas de anticuerpo aceptor humano se seleccionan preferiblemente mediante búsquedas de homología en la base de datos V-BASE, y también pueden usarse otras bases de datos tales como Kabat y las bases de datos públicas de NCBI. Los métodos para humanizar un anticuerpo no humano se describen en el presente documento, incluido en el Ejemplo 5, a continuación.

La presente invención proporciona un método para producir un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A que comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A o un vector que comprende un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A de manera que el ácido nucleico se expresa y el produzca el anticuerpo. Preferiblemente, el anticuerpo está aislado. Para las células huésped, los ácidos nucleicos y los vectores, se pueden usar los descritos anteriormente. La expresión de los ácidos nucleicos puede obtenerse, por ejemplo, mediante una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección génica como se conoce bien en la técnica (por ejemplo, Morrison S (1985) Science 229: 1202) y como se ha descrito además anteriormente. Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos de los mismos, se pueden obtener ADN que codifican cadenas ligeras y pesadas parciales o de longitud completa mediante técnicas de biología molecular estándar (por ejemplo, amplificación por PCR o clonación de ADNc usando un hibridoma que expresa el anticuerpo de interés), y los ADN se pueden insertar en vectores tales como vectores de expresión. El vector de expresión y las secuencias de control de expresión se eligen para que sean compatibles con la célula huésped de expresión utilizada. El gen de cadena ligera del anticuerpo y el gen de cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en un vector separado o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión mediante métodos estándar (por ejemplo, ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento y vector génico del anticuerpo, o ligación del extremo como si no están presentes sitios de restricción). Las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos en el presente documento pueden usarse para crear genes de anticuerpos de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo insertándolos en vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de cadena pesada y constantes de cadena ligera del isotipo deseado de tal forma que el segmento VH está unido operativamente al segmento o segmentos CH1 dentro del vector y el segmento VK está unido operativamente al segmento CK dentro del vector.

Caracterización y purificación de anticuerpos anti-TL1A

El cribado de anticuerpos se puede realizar usando ensayos para medir la unión a TL1A y/o ensayos para medir la capacidad de bloquear la unión de TL1A a su receptor TNFRSF25. Un ejemplo de un ensayo de unión es un ELISA, en particular, que usa una proteína de fusión de TL1A y Fc humano, que está inmovilizada en placas, y que emplea un anticuerpo secundario conjugado para detectar anticuerpo anti-TL1A unido a la proteína de fusión. Un ejemplo de un ensayo de bloqueo es un ensayo basado en citometría de flujo que mide el bloqueo de la unión de la proteína de fusión del ligando de TL1A al TNFRSF25 en células CD4 humanas. Se usa un anticuerpo secundario marcado por fluorescencia para detectar la cantidad de proteína de fusión del ligando TL1A que se une a la célula. Este ensayo

busca una reducción en la señal ya que el anticuerpo en el sobrenadante bloquea la unión de la proteína de fusión del ligando a TNFRSF25. Un ejemplo adicional de un ensayo de bloqueo es un ensayo en el que se mide el bloqueo de coestimulación de linfocitos T sin tratar humanos mediada por la proteína de fusión del TL1A cubierta en una placa midiendo la incorporación de timidina. Como un ensayo para evaluar la actividad funcional de anticuerpos anti-TL1A, por ejemplo, puede usarse la reducción de la secreción de citocinas por linfocitos T CD4, como se describe en los Ejemplos 3 y 6.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden aislar o purificar de diversas maneras conocidas por los expertos en la técnica. Los métodos de purificación estándar incluyen técnicas cromatográficas, incluyendo intercambio iónico, interacción hidrófoba, afinidad, dimensionado o filtración en gel, y fase reversa, realizadas a presión atmosférica o a alta presión utilizando sistemas tales como FPLC y HPLC. Los métodos de purificación también incluyen técnicas electroforéticas, inmunológicas, de precipitación, de diálisis y de cromatofluorecencia. Las técnicas de ultrafiltración y diafiltración, junto con la concentración de proteínas, también son útiles. Para purificar los anticuerpos TL1A, las células huésped seleccionadas se pueden hacer crecer en, por ejemplo, matraces giratorios para la purificación de anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes se pueden filtrar y concentrar antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-sefarosa (Pharmacia, Piscataway, NJ). Los anticuerpos eluidos se pueden comprobar mediante electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento para garantizar la pureza. Un anticuerpo preferido de la presente invención es, por lo tanto, un anticuerpo aislado y/o purificado que se une al TL1A.

Imunoconjugados

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo TL1A o un fragmento del mismo que se une al TL1A, unido a un agente terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina. Tales conjugados se denominan en el presente documento "imunoconjugados". Los imunoconjugados que incluyen una o más citotoxinas se denominan "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para (por ejemplo, destruya) las células. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracnodiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo descarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfán, dibromomantol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). Otros ejemplos de citotoxinas terapéuticas que se pueden unir a un anticuerpo de la invención incluyen duocarmicinas, calicheamicinas, maitansinas y auristatinas, y derivados de las mismas. Un ejemplo de un conjugado de anticuerpo de calicheamicina está disponible en el mercado (Mylotarg(R), American Home Products). Las citotoxinas se pueden unir a anticuerpos de la invención usando tecnología de enlazador disponible en la técnica. Los ejemplos de tipos de enlazadores que se han usado para conjugar una citotoxina con un anticuerpo incluyen, pero sin limitación, hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y enlazadores que contienen péptidos. Puede elegirse un enlazador que es, por ejemplo, susceptible de escisión por pH bajo dentro del compartimento lisosómico o susceptible de escisión por proteasas, tales como proteasas expresadas preferentemente en tejido tumoral tal como catepsinas (por ejemplo, catepsinas B, C, D). Para un análisis adicional de tipos de citotoxinas, enlazadores y métodos para conjugar agentes terapéuticos con anticuerpos, véase también Saito G et al., (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55: 199-215; Trail PA et al., (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52: 328-337; Payne G (2003) Cancer Cell, 3: 207-212; Allen TM (2002) Nat. Rev. Cancer, 2: 750-763; Pastan I & Kreitman RJ (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs, 3: 1089-1091; Senter PD & Springer CJ, (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53: 247-264. Los anticuerpos de la presente invención también se pueden unir a un isótopo radiactivo para generar productos radiofarmacéuticos citotóxicos, también denominados radioinmunoconjugados. Los ejemplos de isótopos radiactivos que pueden conjugarse con anticuerpos para uso diagnóstico o terapéutico incluyen, pero sin limitación, yodo¹³¹, indio¹¹¹, itrio⁹⁰ y lutecio¹⁷⁷. Los métodos para preparar radioinmunoconjugados se establecen en la técnica. Los ejemplos de radioinmunoconjugados están disponibles comercialmente, incluyendo Zevalin® (EDEC Pharmaceuticals) y Bexxar® (Corixa Pharmaceuticals) y métodos similares pueden usarse para preparar radioinmunoconjugados usando los anticuerpos de la invención. Los imunoconjugados de anticuerpos de la invención se pueden usar para modificar una respuesta biológica dada, y el resto de fármaco no debe interpretarse como limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina

enzimáticamente activa, o un fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, o toxina de la difteria; una proteína tal como factor de necrosis tumoral o 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 estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), u otros factores de crecimiento.

Las técnicas para unir tales agentes terapéuticos a anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al., (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2ª Ed.), Robinson et al., (eds.), págs. 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 et al., (eds.), págs. 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 et al., (eds.), págs. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe PE & Ross WC (1982) Immunol. Rev. 62: 119-58.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo TL1A o un fragmento del mismo que se une al TL1A, administrado junto con un agente terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina.

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo, de la presente invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones pueden incluir uno o una combinación de (por ejemplo, dos o más diferentes) anticuerpos, y/o inmunoconjugados de la invención y/o un agente terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención puede comprender una combinación de anticuerpos (o inmunoconjugados) que se unen a diferentes epítopos en el antígeno diana o que tienen actividades complementarias. Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo TL1A de la presente invención combinado con al menos otro agente antiinflamatorio o inmunosupresor.

Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares, que son fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, anticuerpo o inmunoconjugado, se puede recubrir con un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio convencional o agente sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas de la invención. Los compuestos activos complementarios también pueden incorporarse en las composiciones.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo que se une al TL1A unido a un agente terapéutico y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los inmunoconjugados y agentes terapéuticos que se pueden usar son como se ha descrito anteriormente.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención que comprende además otro agente farmacéuticamente activo. Preferiblemente, el otro agente farmacéuticamente activo es uno o más de: a) otro antagonista de TL1A, b) un agente antiinflamatorio, c) un agente inmunosupresor, por ejemplo, un antagonista TNF α , cortisona o esteroides, etc.) y/o d) un agente anti-alérgico.

Una composición farmacéutica de la invención también puede incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales

como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito sódico, sulfito sódico, y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares. Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tal como el oleato de etilo. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos. Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede asegurar tanto mediante procedimientos de esterilización, anteriormente, como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsorbico, y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico, y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede conseguirse mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como el monoestearato de aluminio y la gelatina.

Usos terapéuticos y otros usos

Los anticuerpos de la presente invención tienen numerosas utilidades diagnósticas y terapéuticas *in vitro* e *in vivo* que implican el diagnóstico y tratamiento de trastornos mediados por TL1A. Por ejemplo, estas moléculas se pueden administrar a células en cultivo, *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos humanos, por ejemplo, *in vivo*, para tratar, prevenir y diagnosticar una diversidad de trastornos mediados por TL1A. Los sujetos preferidos son seres humanos e incluyen pacientes que tienen trastornos mediados por la actividad de TL1A (trastornos mediados por TL1A). Los anticuerpos neutralizantes de la presente invención pueden ser eficaces en el tratamiento de pacientes independientemente de su estado coestimulante de TL1A. Los sujetos más preferidos son seres humanos e incluyen pacientes que expresan un alto nivel de TL1A.

Un "paciente" para los fines de la presente invención incluye tanto seres humanos como otros animales, preferiblemente mamíferos y mucho más preferiblemente seres humanos. Por lo tanto, los anticuerpos de la presente invención tienen tanto aplicaciones para terapia humana como veterinaria. El término "tratamiento" o "tratar" en la presente invención pretende incluir el tratamiento terapéutico, así como medidas profilácticas, o supresoras para una enfermedad o trastorno. Por lo tanto, por ejemplo, la administración exitosa de un anticuerpo antes del inicio de la enfermedad da como resultado el tratamiento de la enfermedad. Como otro ejemplo, la administración exitosa de un anticuerpo después de la manifestación clínica de la enfermedad para combatir los síntomas de la enfermedad comprende el tratamiento de la enfermedad. "Tratamiento" y "tratar" también incluyen la administración de un anticuerpo después de la aparición de la enfermedad con el fin de erradicar la enfermedad. La administración exitosa de un anticuerpo después del inicio y después de que se hayan desarrollado los síntomas clínicos, con posible reducción de los síntomas clínicos y quizás la mejora de la enfermedad, comprende el tratamiento de la enfermedad. Aquellos "que necesitan el tratamiento" incluyen mamíferos que ya tienen la enfermedad o trastorno, así como aquellos propensos a tener la enfermedad o trastorno, incluidos aquellos en los que la enfermedad o trastorno se va a prevenir.

En una realización particular, los anticuerpos se usan *in vivo* para tratar, prevenir o diagnosticar una diversidad de trastornos mediados por TL1A. Por lo tanto, la invención proporciona un método para tratar un trastorno mediado por TL1A en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento del mismo. Los trastornos mediados por TL1A ejemplares incluyen, pero sin limitación, enfermedades inflamatorias y/o enfermedades autoinmunes, por ejemplo, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), incluyendo colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, EM, diabetes tipo 1 y tipo 2, psoriasis, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, dermatitis atópica; reacciones o afecciones alérgicas, incluyendo, por ejemplo, asma e inflamación alérgica del pulmón; cánceres, arteriosclerosis, infecciones, enfermedades neurodegenerativas, rechazo de injerto, enfermedades de injerto contra huésped (GVHD) y trastornos/enfermedades cardiovasculares. La invención también proporciona un método para tratar un trastorno mediado por TL1A en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento del mismo. Los trastornos mediados por TL1A ejemplares incluyen, pero sin limitación, enfermedades inflamatorias y/o enfermedades autoinmunes, por ejemplo, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) incluyendo colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, EM, diabetes tipo 1 y tipo 2, psoriasis, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, dermatitis atópica; reacciones o afecciones alérgicas, incluyendo, por ejemplo, asma e

inflamación alérgica del pulmón; cáncer, arteriosclerosis, infecciones, enfermedades neurodegenerativas, rechazo de injerto, enfermedades de injerto contra huésped (GVHD) y trastornos/enfermedades cardiovasculares, enfermedad pulmonar obstructiva crónica EPOC, neuritis óptica, degeneración macular relacionada con la edad, lupus eritematoso sistémico (SLE), síndrome de Sjogen, esclerodermia, esclerosis sistémica, enfermedad renal crónica, fibrosis hepática, tuberculosis, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis pulmonar inducida por tuberculosis, fibrosis retroperitoneal, fibrosis pulmonar, fibrosis quística, fibrosis endomiocárdica, fibrosis auricular, fibrosis mediastínica, mielofibrosis (médula ósea), fibrosis retroperitoneal, fibrosis masiva progresiva, fibrosis sistémica nefrogénica, artrofibrosis. Preferiblemente, los trastornos mediados por TL1A incluyen enfermedades inflamatorias y/o enfermedades autoinmunes, incluyendo, entre otras, enfermedades inflamatorias del intestino (por ejemplo, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), artritis reumatoide, EM y aterosclerosis.

Los trastornos mediados por TL1A preferidos a tratar con el anticuerpo de la invención se seleccionan del grupo que consiste de enfermedad inflamatoria del intestino, esclerosis múltiple, artritis reumatoide y asma. Un trastorno mediado por TL1A particularmente preferido que se trata con el anticuerpo de la invención es la enfermedad inflamatoria del intestino.

El modelo animal para evaluar la actividad funcional de anticuerpos anti-TL1A en trastornos mediados por TL1A se describe en el Ejemplo 7 para el asma y en los Ejemplos 8 y 9 para IBD.

En una realización, los anticuerpos de la invención pueden usarse para detectar niveles de TL1A, o niveles de células que contienen TL1A en su superficie de membrana, niveles que pueden vincularse luego a ciertos síntomas de la enfermedad. Como alternativa, los anticuerpos pueden usarse para inhibir o bloquear la función de TL1A que, a su vez, puede vincularse a la prevención o mejora de ciertos síntomas de la enfermedad, implicando de este modo al TL1A como un mediador de la enfermedad. Esto puede lograrse poniendo en contacto una muestra y una muestra de control con el anticuerpo TL1A en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y TL1A. Cualquier complejo formado entre el anticuerpo y TL1A se detecta y compara en la muestra y el control. A la luz de la unión específica de los anticuerpos de la invención para TL1A, los anticuerpos de la invención se pueden usar para detectar específicamente la expresión de TL1A en la superficie de las células, por ejemplo, se pueden usar para detectar a un paciente que tiene un bajo o alto nivel de expresión de TL1A. Los anticuerpos de la invención también pueden usarse para purificar TL1A mediante purificación por inmutafinidad.

En otra realización, los anticuerpos de la invención pueden probarse inicialmente para determinar la actividad de unión asociada con el uso terapéutico o diagnóstico *in vitro*. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden ensayarse usando ensayos de citometría de flujo.

La presente descripción proporciona además el uso de un anticuerpo o fragmento del mismo como un medicamento y el uso de un anticuerpo o fragmento del mismo en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno mediado por TL1A. En una realización adicional, la presente descripción proporciona el anticuerpo o fragmento del mismo para su uso como un medicamento. También se proporciona por la presente descripción el anticuerpo o fragmento del mismo para su uso en un método para tratar un trastorno mediado por TL1A. Los trastornos mediados por TL1A son los descritos anteriormente. El anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención puede ser particularmente útil para tratar trastornos mediados por TL1A independientemente del estado coestimulante de DR3 de un paciente. En una realización preferida, el anticuerpo o fragmento del mismo puede usarse para tratar un trastorno mediado por TL1A en el que un paciente expresa un alto nivel de TL1A.

Como se ha descrito previamente, los anticuerpos anti-TL1A de la invención se pueden coadministrar con uno o más agentes terapéuticos diferentes, por ejemplo, un agente citotóxico, un agente radiotóxico o un agente inmunosupresor. El anticuerpo se puede unir al agente (como un inmunoconjugado como se ha descrito anteriormente) o se puede administrar separado del agente. En este último caso (administración separada), el anticuerpo puede administrarse antes, después o concurrentemente con el agente o puede administrarse conjuntamente con otras terapias conocidas, por ejemplo, una terapia anticancerosa, por ejemplo, radiación.

Para la administración del anticuerpo, la dosificación varía de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 10 mg/kg, del peso corporal del huésped. Un régimen de tratamiento ejemplar implica una 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 tres meses o una vez cada tres a seis meses. El anticuerpo usualmente se administra en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis individuales pueden ser, por ejemplo, semanalmente, mensuales, trimestrales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares, como se indica midiendo los niveles sanguíneos de anticuerpos con respecto al antígeno diana en el paciente. En algunos métodos, la

dosificación se ajusta para alcanzar una concentración de anticuerpo en plasma de aproximadamente 1-1000 µg/ml y en algunos métodos aproximadamente 25-300 µg/ml. Como alternativa, el anticuerpo se puede administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosis y la frecuencia varían dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente. La dosificación y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduce o finaliza.

10

Los niveles de dosificación reales de los principios activos, es decir, el anticuerpo en las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se pueden variar para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del anticuerpo particular empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados junto con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, el estado, la salud general y el historial médico previo del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

20

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo TL1A de la invención preferiblemente da como resultado una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los períodos libres de síntomas de la enfermedad, y/o una prevención del deterioro o incapacidad debida al padecimiento de la enfermedad. La capacidad de un compuesto para el tratamiento de un trastorno mediado por TL1A puede evaluarse en un sistema de modelo animal que predice la eficacia en seres humanos. Como alternativa, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular, dicha inhibición puede medirse *in vitro* mediante ensayos conocidos por el experto en la técnica. Un experto en la técnica podría determinar tales cantidades basándose en factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto, y la composición o vía de administración particular seleccionada.

30

El anticuerpo o la composición de la presente invención se pueden administrar a través de una o más vías de administración usando uno o más de una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Como se apreciará por el experto en la técnica, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Las vías de administración preferidas incluyen intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías de administración parenterales, por ejemplo, mediante inyección o infusión. Las vías de administración más preferidas son intravenosa o subcutánea. La frase "administración parenteral" como se usa en el presente documento se refiere a modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, inyección e infusión subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal. Como alternativa, un anticuerpo de la invención se puede administrar a través de una ruta no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o por mucosas, por ejemplo, por vía intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

45 **Artículo de fabricación y kit**

En otra realización de la descripción, se proporciona un artículo de fabricación que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo, la composición o el inmuconjugado de la invención para el tratamiento de un trastorno mediado por TL1A. El artículo de fabricación puede comprender un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales o jeringas. Los recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que puede ser eficaz para tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición puede ser el anticuerpo descrito en el presente documento. La etiqueta o prospecto puede indicar que la composición puede usarse para tratar la afección de elección, tal como cáncer. En una realización, la etiqueta o prospecto puede indicar que la composición que comprende el anticuerpo puede usarse para tratar un trastorno mediado por TL1A.

Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el

mismo, en el que la composición comprende el anticuerpo en el presente documento, y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente terapéutico distinto del anticuerpo. El artículo de fabricación en esta realización de la descripción puede comprender además un prospecto que indica que la primera y la segunda composiciones se pueden usar en combinación para tratar una enfermedad o trastorno mediado por TL1A. Dicho agente terapéutico puede ser cualquiera de las terapias adjuntas descritas en la sección anterior (por ejemplo, un agente trombolítico, un agente antiplaquetario, un agente quimioterapéutico, un agente antiangiogénico, un compuesto antihormonal, un cardioprotector y/o un regulador de la función inmune en un mamífero, incluyendo una citocina). Como alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

También están dentro del alcance de la presente invención los kits que comprenden el anticuerpo, las composiciones o los inmunoconjugados de la invención y las instrucciones de uso. El kit puede contener además uno o más reactivos adicionales, tales como un reactivo inmunosupresor, un agente citotóxico o un agente radiotóxico, o uno o más anticuerpos adicionales de la invención (por ejemplo, un anticuerpo que tiene una actividad complementaria que se une a un epítipo en el antígeno TL1A distinto del primer anticuerpo).

Sin más descripción, se cree que un experto en la técnica puede, usando la descripción anterior y los siguientes ejemplos ilustrativos, fabricar y utilizar los agentes de la presente descripción y poner en práctica los métodos reivindicados. Los siguientes ejemplos de trabajo se proporcionan para facilitar la práctica de la presente descripción, y no deben interpretarse como limitantes de ninguna manera del resto de la descripción.

25 **Ejemplos**

Ejemplo 1:

Generación y cribado de anticuerpos anti-TL1A humano de ratón

Para producir la proteína TL1A-FC humana recombinante, se adquirió un ADNc para el gen TL1A humano en Source BioScience (Nottingham, Reino Unido; número de clon: IRATp970G02115D). Este ADNc se usó como una plantilla para amplificar la región codificante de la versión secretada procesada de TL1A humano (SEQ ID NO: 116) usando PCR. La PCR se realizó usando los cebadores GlnPr994 y GlnPr995 (SEQ ID NOs: 119 y 120, respectivamente). El cebador GlnPr994 añade un sitio de restricción BamHI 5' de la región extracelular y escinde el péptido señal nativo. El cebador GlnPr995 añade un sitio de restricción HindIII 3' de la región extracelular. El amplicón se cortó usando los sitios de restricción de flanco BamHI y HindIII y se clonó en un vector de expresión de mamífero modificado basado en el plásmido de pADNc3.1(-) de Invitrogen (Invitrogen AG, Basilea, Suiza), expresando una construcción de fusión de Fc. El vector de expresión contiene el promotor CMV humano con el fragmento donante-aceptor de Ig (primer intrón) descrito en la Patente de Estados Unidos 5.924.939, la secuencia OriP (Koons MD et al., (2001) J Virol. 75(22): 10582-92), el potenciador SV40, y el poliA de SV40 condensado al terminador de gastrina como se describe por Kim D, et al., (2003) Biotechnol. Prog. 19(5): 1620-2. El casete de expresión contiene una región kozak aguas arriba del marco de lectura abierto de la proteína de fusión Fc, seguido de un péptido señal, terminado por un sitio de restricción BamHI para la clonación conveniente. La región Fc de la proteína de fusión es iniciada por un sitio de restricción HindIII para la clonación conveniente, seguido de un enlazador de glicina-serina pequeño. Para liberar la construcción anterior aguas arriba de la región Fc, el vector se cortó usando BamHI (NEB, Ipswich, MA, Estados Unidos) e HindIII (NEB, Ipswich, MA, Estados Unidos), se trató usando CIP (NEB, Ipswich, MA, Estados Unidos) y se purificó en gel. La codificación del inserto para la región extracelular de TL1A humano se ligó en el esqueleto y se transformó en células de *E coli* Top 10 (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) conduciendo a la construcción de expresión de fusión Fc (SEQ ID NO: 117). Los primeros 20 aminoácidos SEQ ID NO: 117 corresponden a la secuencia señal, que no estaba presente en la construcción de expresión de fusión Fc final.

Este plásmido recombinante permitió la expresión de la proteína TL1A-Fc humana en células de mamífero con secreción en el medio de cultivo celular dirigido por el péptido señal. Para la producción de proteína recombinante, el vector recombinante mencionado anteriormente se transfirió en células HEK 293 EBNA adaptadas a la suspensión (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) usando reactivo de transfección jetPEI™ (Polyplus-transfection S.A., Strasbourg, Francia, distribuidor: Brunschwig, Basilea, Suiza). El sobrenadante de cultivo celular se recogió después de cinco días y se purificó adicionalmente usando una columna de purificación por afinidad de Proteína A

(columna de Sepharose HiTrap Protein A; GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza) operada en un sistema ÄKTA FPLC (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza).

Para producir la proteína TL1A humana recombinante secretada con etiqueta his, la secuencia de ADN que codifica la versión procesada de TL1A humana secretada se amplificó por PCR usando los cebadores GlnPr1542 y GlnPr1543 (SEQ ID NOs: 121 y 122, respectivamente) añadiendo un enlazador 6xHis N-terminal. Una segunda vuelta de PCR usando los cebadores GlnPr1544 (SEQ ID NO: 123) y GlnPr1543 añade un péptido señal y sitios de restricción flanqueantes convenientes para la clonación (5': NheI; 3': XhoI). El producto de PCR se cortó usando NheI y XhoI (NEB, Ipswich, MA, Estados Unidos) y posteriormente se clonó en el plásmido pcDNA3.1(-) modificado escrito anteriormente, se cortó usando las mismas enzimas y se sometió a CIP. Esta digestión de restricción libera el marco de lectura abierto de la proteína de fusión-Fc entera previamente presente en el vector de expresión. Después de la ligadura y la transformación en células de *E coli* Top 10, el plásmido final fue elegido en base en la digestión de restricción y la secuenciación de la construcción de expresión para TL1A secretado con una etiqueta his N-terminal (SEQ ID No: 118). Los primeros 20 aminoácidos SEQ ID NO: 118 corresponden a la secuencia señal, que no estaba presente en la construcción de expresión de etiqueta-his N-terminal final.

Este plásmido recombinante permitió la expresión de la proteína humana TL1A-his en células de mamíferos con secreción en los medios de cultivo celular. Para la producción de proteína, el vector recombinante se transfirió en células HEK 293 EBNA adaptadas a la suspensión (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) usando reactivo de transfección jetPEI™ (Polyplus-transfection S.A., Strasbourg, Francia, distribuidor: Brunschwig, Basilea, Suiza). El sobrenadante de cultivo celular se recogió cinco días después de la transfección y se purificó usando una columna de purificación por afinidad de Ni²⁺-NTA (columna de Sepharose HiTrap Ni²⁺-NTA; GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza) operada en un sistema ÄKTA FPLC (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza). El tampón de las proteínas recombinantes humanas TL1A-Fc y TL1A-his se cambió a solución salina tamponada con fosfato (PBS). La proteína TL1A-Fc recombinante humana disuelta en PBS se mezcló con un volumen igual de adyuvante Stimune (Prionics, Suiza) y se preparó una emulsión. La emulsión se transfirió a jeringas de insulina de 0,5 ml (BD Pharmingen, Allschwil, Suiza) y se inmunizaron por vía subcutánea animales BALB/c (Harlan, Holanda) en las almohadillas traseras, la base de la cola y el cuello con 50 µg de la proteína emulsionada. La inmunización se repitió dos semanas más tarde con la misma cantidad de antígeno y la misma ruta de inyección.

La presencia de anticuerpos anti-TL1A circulantes en los sueros de ratón inmunizados se evaluó mediante ELISA directo usando placas recubiertas con la proteína TL1A-his humana recombinante. Se añadió una dilución seriada (de 1:10⁰ a 1:10⁹) de los diferentes sueros de ratón a las placas y se detectaron los anticuerpos unidos usando una molécula entera de H+L de cabra anti-ratón-HRP (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza). Se realizó un refuerzo subcutáneo final con 50 µg de antígeno sin adyuvante en animales que presentaban el mejor título sérico de IgG anti-TL1A humano tres días antes del sacrificio.

Los animales se sacrificaron y se recogieron los ganglios linfáticos inguinales, axilares, braquiales, poplíteos y ciáticos para preparar una única suspensión celular alterando la arquitectura de los ganglios linfáticos con dos agujas 25G en una solución de ADNasa (Roche Diagnostics (Schweiz) AG, Rotkreuz, Suiza) y de collagenasa (Roche Diagnostics (Schweiz) AG, Rotkreuz, Suiza). Las suspensiones de células individuales se fusionaron a una línea celular de mieloma X63AG8.653 (línea celular de mieloma BALB/c de ratón; número de acceso ATCC: CRL 1580; Kearney JF et al., (1979) J. Immunol. 123(4): 1548-1550) a una relación de 7:1 (compañero de fusión con respecto a células de los ganglios linfáticos recogidas) con polietilenglicol 1500 (Roche Diagnostics (Schweiz) AG, Rotkreuz, Suiza). Las células fusionadas se colocaron en placas de 96 pocillos de fondo plano que contenían macrófagos de ratón en medio DMEM-10 (Invitrogen AG, Basilea, Suiza) complementado con suero fetal bovino al 10 % (FBS, PAA Laboratories, Pasching, Austria), L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina (Biochrom AG, Alemania), 100 µg/ml de estreptomina (Biochrom AG, Alemania), HEPES 10 mM (Invitrogen AG, Basilea, Suiza), β-mercaptoetanol 50 µM (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza), HAT (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza) y factor de crecimiento al 1 % (Hybridokine, Interchim/Uptima, Montluçon, Francia).

Aproximadamente 800 pocillos de las fusiones se cribaron mediante ELISA para determinar la presencia de IgG de ratón que reconocía TL1A humano y bloqueaba la unión de TL1A humano en su receptor. Los pocillos positivos se expandieron y se sometieron a dos rondas de subclonación. Las células se recogieron y las cadenas pesada y ligera se clonaron y se secuenciaron.

Ejemplo 2:

Clonación y secuenciación de las cadenas VH y VL de los anticuerpos anti-TL1A de células de hibridoma

Para cada hibridoma seleccionado positivamente, se preparó ARN total, se transcribió de forma inversa en ADNc y los genes VH y VL se amplificaron respectivamente mediante PCR. Estos productos de PCR se ligaron en un vector de rescate (vector pDrive, QIAGEN AG, Hombrechtikon, Suiza), lo que permitió la secuenciación de ADN de productos de PCR individuales y la determinación de mono o policlonalidad de los hibridomas seleccionados. Este vector permitió la selección azul/blanca en placas de LB-agar que contenían IPTG y X-gal (las colonias sin inserto eran azules debido a la degradación de X-gal por el péptido LacZ- α). Se prepararon plásmidos recombinantes de clones bacterianos positivos (color blanco) y se secuenciaron usando cebadores de secuenciación de ADN estándar específicos para la cadena principal del vector (M13rev, M13fwd, T7 o SP6). Las secuencias de ADN finalmente se subclonaron en un vector de expresión para la expresión recombinante del anticuerpo de interés en células de mamífero.

Aislamiento de ARN.

15 El ARN total se aisló de $2 \cdot 10^6$ células usando el kit RNeasy Mini de QIAGEN (QIAGEN AG, Hombrechtikon, Suiza) de acuerdo con el protocolo del fabricante; las muestras se cuantificaron usando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (WITEC AG, Littau, Suiza).

RT-PCR de una etapa

20 Las preparaciones de ARN total descritas anteriormente se transcribieron de forma inversa adicionalmente en ADNc, y los fragmentos VH y VL se amplificaron por PCR usando dos mezclas diferentes de cebadores degenerados, permitiendo cada uno la recuperación de todas las diferentes subfamilias de fragmentos variables de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón y regiones de unión de cadena pesada variables o la recuperación de todos los fragmentos variables kappa de cadena ligera de inmunoglobulina de ratón y regiones de unión kappa de cadena ligera variables. Los cebadores usados para la transcripción inversa y la amplificación se sintetizaron por Microsynth (Balgach, Suiza), y se purificaron por HPLC (Tablas 1-4). Tanto la transcripción inversa como la amplificación por PCR se realizaron simultáneamente usando el kit de RT-PCR de una etapa QIAGEN (QIAGEN AG, Hombrechtikon, Suiza). Dado que la técnica usó cebadores específicos, cada muestra de ARNm se trató después por duplicado, 25 permitiendo la transcripción inversa individual y la amplificación de los fragmentos VH o VL. Se mezclaron 2 μ g de ARN total disuelto en agua libre de RNasa hasta un volumen final de 30 μ l con: 10 μ l de una solución madre 5x de tampón OneStep RT-PCR QIAGEN, 2 μ l de una mezcla dNTPs a una concentración de 10 mM, 3 μ l de mezcla de cebadores a una concentración de 10 μ M y 2 μ l de mezcla enzimática OneStep RT-PCR QIAGEN. La mezcla final se colocó luego en un tubo de PCR y se cicló en un termociclador de PCR (BioRad iCycler versión 4.006, Bio-Rad 30 permitiendo la transcripción inversa individual y la amplificación de los fragmentos VH o VL. Se mezclaron 2 μ g de ARN total disuelto en agua libre de RNasa hasta un volumen final de 30 μ l con: 10 μ l de una solución madre 5x de tampón OneStep RT-PCR QIAGEN, 2 μ l de una mezcla dNTPs a una concentración de 10 mM, 3 μ l de mezcla de cebadores a una concentración de 10 μ M y 2 μ l de mezcla enzimática OneStep RT-PCR QIAGEN. La mezcla final se colocó luego en un tubo de PCR y se cicló en un termociclador de PCR (BioRad iCycler versión 4.006, Bio-Rad 35 Laboratories AG, Reinach, Suiza) usando los siguientes ajustes:

30 min a 50 °C

15 min a 95 °C

40 ciclos: 30 s a 94 °C
30 s a 55 °C
1 min a 72 °C

10 min a 72 °C

Mantenimiento a 4 °C

Clonación pDrive

40 Los productos de PCR se procesaron sobre geles de agarosa al 2 %. Después de la electroforesis de ADN, los fragmentos de interés (~450 pb) se escindieron de los geles de agarosa, y se extrajeron adicionalmente usando el kit 250 de Macherey-Nagel NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Oensingen, Suiza). Para la secuenciación del ADN, los productos de PCR extraídos se clonaron en el vector de rescate descrito anteriormente (vector pDrive, QIAGEN AG, Hombrechtikon, Suiza) y se transformaron en la cepa TOP10 de *E. coli* (Invitrogen AG, Basilea, Suiza).

Extracción Miniprep

Las colonias positivas se cultivaron durante una noche a 37 °C (agitación a 250 RPM) en 1,5 ml de medio Luria Bertani (LB) complementado con 100 μ g/ml de ampicilina sembrada en placas de bloque de pocillos Macherey-Nagel (Macherey-Nagel, Oensingen, Suiza). Al día siguiente, se realizaron extracciones de ADN miniprep usando el

kit de plásmidos NucleoSpin Multi-8 (Macherey-Nagel, Oensingen, Suiza).

Secuenciación y análisis de secuencia

5 Se enviaron muestras para la secuenciación de ADN a la empresa de servicios de secuenciación de ADN Fasteris (Plan-les-Ouates, Suiza). Se usaron los cebadores estándar: M13rev, M13fwd, T7, SP6 (Tabla 5). Para analizar las secuencias de ADN, se usaron el Clone Manager 9 Professional Edition (Scientific & Educational Software, NC, Estados Unidos) y el editor de alineamiento de secuencias BioEdit (Hall TA (1999) Nucl Acids Symp Ser 41: 95-98).

10 Clonación del vector de expresión para la expresión del anticuerpo quimérico recombinante

Para la expresión recombinante en células de mamífero, los fragmentos VH y VL murinos aislados se formatearon como inmunoglobulinas quiméricas usando métodos de PCR basados en ensamblaje. Estos anticuerpos quiméricos consisten en una cadena pesada donde el dominio variable de cadena pesada murina se fusiona con los dominios
15 constantes de cadena pesada de IgG1 humana (regiones $\gamma 1$, bisagra, $\gamma 2$ y $\gamma 3$) y una cadena ligera donde el dominio variable de la cadena ligera murina se fusiona a un dominio constante kappa humano (C κ). Las partes constantes humanas y variables murinas ensambladas por PCR se clonaron posteriormente en un vector de expresión de mamífero modificado basado en el vector pcDNA3.1(-) modificado de Invitrogen mencionado en el Ejemplo 1 con la diferencia de que se empleó un péptido líder kappa de cadena ligera de inmunoglobulina humana para dirigir la
20 secreción de proteínas. Para la producción de proteínas de los candidatos de inmunoglobulina, se cotransfectaron cantidades iguales de ADN del vector de cadena pesada y ligera en HEK-293 adaptadas a la suspensión (número ATCC: CRL-1573). El sobrenadante de cultivo celular se recogió después de cinco días y se purificó usando una columna de purificación por afinidad de Proteína A (columna de Sepharose HiTrap Protein A) operada en un sistema ÄKTA FPLC (ambos de GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza).

25

Tabla 1: Mezcla de cebadores VH - inverso

1	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC GAK GTR MAG CTT CAG GAG TC	SEQ ID NO: 65
2	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTB CAG CTB CAG CAG TC	SEQ ID NO: 66
3	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTG CAG CTG AAG SAR TC	SEQ ID NO: 67
4	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTC CAR CTG CAA CAR TC	SEQ ID NO: 68
5	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTY CAG CTB CAG CAR TC	SEQ ID NO: 69
6	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTY CAR CTG CAG CAR TC	SEQ ID NO: 70
7	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTC CAC GTG AAG CAR TC	SEQ ID NO: 71
8	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG AAS STG GTG GAR TC	SEQ ID NO: 72
9	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC GAV GTG AWG STG GTG GAG TC	SEQ ID NO: 73
10	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG CAG STG GTG GAR TC	SEQ ID NO: 74
11	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC GAK GTG CAM CTG GTG GAR TC	SEQ ID NO: 75
12	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG AAG CTG ATG GAR TC	SEQ ID NO: 76
13	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG CAR CTT GTT GAR TC	SEQ ID NO: 77
14	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC GAR GTR AAG CTT CTC GAR TC	SEQ ID NO: 78
15	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC GAA GTG AAR STT GAG GAR TC	SEQ ID NO: 79
16	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTT ACT CTR AAA SAR TC	SEQ ID NO: 80
17	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTC CAA CTV CAG CAR CC	SEQ ID NO: 81
18	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC GAT GTG AAC TTG GAA SAR TC	SEQ ID NO: 82
19	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG AAG GTC ATC GAR TC	SEQ ID NO: 83

Tabla 2: Mezcla de cebadores VH - directo

1	CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA AAC GGT GAC CGT GGT	SEQ ID NO: 84
2	CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA GAC TGT GAG AGT GGT	SEQ ID NO: 85
3	CCTCCACCACTCGAGCC CGC AGA GAC AGT GAC CAG AGT	SEQ ID NO: 86
4	CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA GAC GGT GAC TGA GGT	SEQ ID NO: 87

30

Tabla 3: Mezcla de cebadores VL - inverso

1	GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATC CAG CTG ACT CAG CC	SEQ ID NO: 88
2	GGCGGTGGC GCT AGC CAA ATT GTT CTC ACC CAG TC	SEQ ID NO: 89
3	GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT GTG MTM ACT CAG TC	SEQ ID NO: 90
4	GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG YTR ACA CAG TC	SEQ ID NO: 91

5	GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTR ATG ACM CAG TC	SEQ ID NO: 92
6	GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT MAG ATR AMC CAG TC	SEQ ID NO: 93
7	GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT CAG ATG AYD CAG TC	SEQ ID NO: 94
8	GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATY CAG ATG ACA CAG AC	SEQ ID NO: 95
9	GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTT CTC AWC CAG TC	SEQ ID NO: 96
10	GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT GWG CTS ACC CAA TC	SEQ ID NO: 97
11	GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT STR ATG ACC CAR TC	SEQ ID NO: 98
12	GGCGGTGGC GCT AGC GAY RTT KTG ATG ACC CAR AC	SEQ ID NO: 99
13	GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT GTG ATG ACB CAG KC	SEQ ID NO: 100
14	GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG ATA ACY CAG GA	SEQ ID NO: 101
15	GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG ATG ACC CAG WT	SEQ ID NO: 102
16	GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG ATG ACA CAA CC	SEQ ID NO: 103
17	GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT TTG CTG ACT CAG TC	SEQ ID NO: 104
18	GGCGGTGGC GCT AGC GAA ACA ACT GTG ACC CAG TC	SEQ ID NO: 105
19	GGCGGTGGCGCT AGC GAA AAT GTK CTS ACC CAG TC	SEQ ID NO: 106
20	GGCGGTGGCGCT AGC CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TC	SEQ ID NO: 107

Tabla 4: Mezcla de cebadores VL - directo

1	ATGCTGAC GC GGC CGC ACG TTT KAT TTC CAG CTT GG	SEQ ID NO: 108
2	ATGCTGAC GC GGC CGC ACG TTT TAT TTC CAA CTT TG	SEQ ID NO: 109
3	ATGCTGAC GC GGC CGC ACG TTT CAG CTC CAG CTT GG	SEQ ID NO: 110
4	ATGCTGAC GC GGC CGC ACC TAG GAC AGT CAG TTT GG	SEQ ID NO: 111

Tabla 5: Cebadores de secuenciación

M13-Directo	GTAAAACGACGGCCAGT	SEQ ID NO: 112
M13-Inverso	AACAGCTATGACCATG	SEQ ID NO: 113
T7	TAATACGACTCACTATAGG	SEQ ID NO: 114
SP6	GATTTAGGTGACACTATAG	SEQ ID NO: 115

5

Ejemplo 3:**Caracterización biológica de anticuerpos anti-TL1A humano****10 ELISA de detección de anticuerpos específicos de TL1A:**

Los títulos de anticuerpos, la especificidad y la producción por hibridomas y los candidatos de anticuerpos recombinantes se determinaron mediante un ELISA directo. Brevemente, placas de 96 pocillos de microtitulación (Costar USA, distribuidor VWR AG, Nyon, Suiza) se recubrieron con 100 µl de TL1A-his humana recombinante a 2 µg/ml en PBS (véase el Ejemplo 1 para la generación de la proteína TL1A-his). Las placas se incubaron durante una noche a 4 °C y luego se bloquearon con PBS BSA al 2 % (albúmina sérica bovina, PAA Laboratories, Pasching, Austria) a temperatura ambiente (TA) durante una hora. La solución de bloqueo se eliminó y se añadieron los sobrenadantes de hibridoma o anticuerpos purificados. Las placas se incubaron entonces a TA durante 30 minutos, luego se lavaron nueve veces con PBS Tween-20 al 0,01 % (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza) y se añadió un anticuerpo de detección anti-ratón H+L de cabra marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza) a una dilución de 1:1000. Para detectar anticuerpos quiméricos recombinantes (véase el Ejemplo 2) que poseen un Fc humano, se usó un anticuerpo de IgG de conejo antihumano marcado con HRP (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza) a una dilución de 1:1000 como anticuerpo de detección. Las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA), se lavaron nueve veces con PBS Tween-20 al 0,01 % y se añadió el sustrato de TMB (Bio-rad Laboratories AG, Reinach, Suiza) a las placas, y la reacción se detuvo después de dos a seis minutos añadiendo H₂SO₄. La absorbancia se leyó entonces a 450 nm por un lector de microplacas (Biotek, Estados Unidos; distribuidor: WITTEC AG, Littau, Suiza). La Figura 1 muestra que los sobrenadantes de hibridomas parentales de diversos clones reconocen la proteína recubierta con TL1A-his humana y no su proteína irrelevante marcada con his.

30

ELISA de bloqueo de TNFRSF25:

La proteína del receptor TNFRSF25 humana recombinante (TNFRSF25) se generó como se indica a continuación: el

ADNc para TNFRSF25 humano (nombre de clon: IRCMp5012F0812D) se adquirió en Source Biosystems (Nottingham, Reino Unido) y la porción extracelular (aminoácidos 25-199) de TNFRSF25 humano (numeración según la secuencia de Uniprot Q93038) se amplificó con sitios de restricción flanqueantes. El producto de PCR resultante que incluía una secuencia de etiqueta 8-His N-terminal se clonó posteriormente en una versión modificada del vector pcDNA3.1 de Invitrogen (Invitrogen AG, Basilea, Suiza) que portaba un promotor CMV, una hormona de crecimiento bovino de poliadenilación, y el péptido líder VJ2C murino para dirigir la secreción de la proteína recombinante. Para la producción de proteínas recombinantes, el vector recombinante se transfectó en células HEK 293 adaptadas a la suspensión (ATCC número CRL 1573) usando reactivo de transfección jetPEI™ (Polyplus-transfection S.A., Strasbourg, Francia, distribuidor: Brunschwig, Basilea, Suiza). El sobrenadante de cultivo celular se recogió después de cinco días y se purificó usando una columna de purificación por afinidad de Proteína A (columna de Sepharose HiTrap Protein A; GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza) operada en un sistema ÄKTA FPLC (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza).

Para determinar si los anticuerpos anti-TL1A generados pueden bloquear la unión de TL1A al receptor TNFRSF25, se desarrolló un ELISA de bloqueo. Se recubrieron placas de microtitulación de noventa y seis pocillos (Costar, Estados Unidos; distribuidor VWR AG, Nyon, Suiza) con 100 µl de TL1A-FC humano recombinante (véase el Ejemplo 1) a 2 µg/ml en PBS o TL1A no marcado recombinante (R&D Systems, Minneapolis, Estados Unidos). Las placas se incubaron durante una noche a 4 °C y luego se bloquearon con PBS BSA al 2 % a TA durante una hora. La solución de bloqueo se eliminó y se añadieron los sobrenadantes de hibridoma o anticuerpos purificados a la placa. Cinco minutos más tarde, se añadieron 50 µl de TNFRSF25-Fc-his humano recombinante (R&D Systems) en 4 µg/ml a cada pocillo. Las placas se incubaron a TA durante 60 minutos, luego se lavaron nueve veces con PBS Tween-20 al 0,01 % y se añadió histidina-HRP anti-poli de ratón (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza) a una dilución de 1:2000. Las placas se incubaron durante 30 minutos a TA, se lavaron 9 veces con PBS Tween-20 al 0,01 % y se añadió el sustrato de TMB (Bio-rad Laboratories AG, Reinach, Suiza) a las placas, y la reacción se detuvo después de 6 minutos añadiendo H₂SO₄. La absorbancia se leyó entonces a 450 nm por un lector de microplacas (Biotek, Estados Unidos; distribuidor: WITTEC AG, Littau, Suiza). La Figura 2 muestra que los anticuerpos purificados pueden bloquear la interacción entre TL1A y TNFRSF25 de una manera dependiente de la dosis.

Inhibición de la secreción de IFN-γ inducida por TL1A por linfocitos T CD4 cebados

Los linfocitos T CD4 cebados por citocinas IL-12 e IL-18 polarizan hacia un fenotipo TH1 y secretan IFN-γ. TL1A ha demostrado que mejora la producción de IFN-γ por linfocitos T CD4 cebados. Por lo tanto se probó si el anticuerpo quimérico 5G6 podría bloquear este aumento dependiente de TL1A en la producción de IFN-γ.

Para purificar los linfocitos T CD4 humanos de las células mononucleares de sangre periférica (PMBC), se recogieron filtros que contenían leucocitos humanos del Blood Collection Centre from La Chaux-de-Fonds, Suiza (Centre de Transfusion Sanguine et Laboratoire de Sérologie, rue Sophie-Mairet 29, CH-2300). Las células se eliminaron de los filtros mediante contraflujo con 60 ml de PBS que contenía 10 U/ml de liguemina (Drossapharm AG, Lucern, Suiza). Las PMBC se purificaron con tubos de filtro de separación sangre de 50 ml (distribuidor: Brunschwig, Basilea, Suiza) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y luego se usaron para la purificación de CD4 con el kit de purificación de linfocitos T CD4 sin tratar de Miltenyi (Gladbach, Alemania) según las instrucciones del fabricante.

El anticuerpo 5G6 se ensayó para determinar si podría inhibir el efecto de TL1A producido de forma natural. Los linfocitos T CD4 cebados con IL-12 e IL-18 se incubaron con monocitos que se habían activado previamente por complejos inmunes (CI), y se midió la producción de IFN-γ. Los monocitos se aislaron de PMBC (véase anteriormente) usando un kit de aislamiento de monocitos II de Miltenyi (Gladbach, Alemania) según las instrucciones del fabricante. La estimulación de monocitos IC se realizó como se indica a continuación: IgG humana chompure (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Newmarket, Reino Unido) se recubrió en una placa de cultivo celular de 12 pocillos (TPP, Trasadingen, Suiza) a 50 µg/ml durante 2 horas a temperatura ambiente en PBS. La placa se lavó entonces con PBS y se incubó con IgG anti-humano de ratón (Jackson ImmunoResearch) durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa cubierta se lavó una vez con PBS antes de la colocación de las placas de los monocitos purificados. Los monocitos estimulados con IC se recogieron después de 48-72 horas de incubación a 37 °C en un incubadora de CO₂ al 5 %.

Para el análisis de citometría de flujo, los monocitos estimulados con IC se tiñeron con un anticuerpo anti-TL1A-PE (GeneTex, distribuido por Lucerna Chem. AG, Lucerna, Suiza) o un control de isotipo de conejo (BD Pharmingen, Allschwil, Suiza) en 10 µg/ml en una placa de microtitulación de 96 pocillos con fondo en V (TPP, Trasadingen, Suiza) a 4 °C durante 30 minutos. El tampón de dilución (tampón FACS) se complementó con PBS con suero de

ternera fetal al 2 % (FCS, Amimed distribuido por Bioconcept, Allschwil, Suiza) y Versene al 10 % (Gibco Life Technologies). Después de la incubación, se añadieron 100 µl de tampón FACS a cada pocillo y la placa se centrifugó a 300 g durante 3 minutos. El sobrenadante se descartó y las muestras se resuspendieron en 100 µl de una solución de anticuerpo secundario de conejo anti-PE en 0,2 µg/ml en tampón FACS. Las muestras se incubaron a 4 °C durante 20 minutos. Se lavó la placa como se describió anteriormente y se resuspendió en 300 µl de tampón FACS y se adquirió inmediatamente en un citómetro de flujo FACSCyan (Beckman Coulter International S.A., Nyon, Suiza). Para la cuantificación de TL1A soluble, el sobrenadante de cultivo de monocitos estimulados con IC se recogió en diferentes momentos (20, 48 y 72 horas) y sTL1A se cuantificó usando el kit ELISA de desarrollo de TL1A humano (Peprotech), según las recomendaciones del fabricante.

Para el co-cultivo de monocitos-linfocitos T, los monocitos estimulados con IC (10^4) y los linfocitos T purificados con CD4 (10^5) se sembraron en placas de fondo plano de 96 pocillos (TPP) con IL-12 (Peprotech) en 8 ng/ml e IL-18 (MBL International, distribuido por LabForce AG, Nunningen, Suiza) en 200 ng/ml en una incubadora de CO₂ a 37 °C. Los sobrenadantes de cultivo se recogieron después de 72 horas y se cuantificó IFN-γ como se describió anteriormente.

Los monocitos estimulados con IC expresaron TL1A en su membrana (mTL1A) (Figura 3A), pero más sustancialmente como un factor soluble (sTL1A) (Figura 3B) e indujeron una fuerte producción de IFN-γ por linfocitos T CD4 co-cultivados (Figura 3C). El anticuerpo 5G6 suprimió totalmente la producción de IFN-γ inducida por los monocitos estimulados por IC mostrando un potente bloqueo del efecto mediado por sTL1A y mTL1A.

Ejemplo 4:

El candidato 5G6 parental se une a ratón, rata, mono cynomolgus y TL1A humano

La reactividad del anticuerpo 5G6 parental (producido como un anticuerpo quimérico con Fc humano) en la parte extracelular de TL1A de diversas especies se ensayó por ELISA. La parte extracelular de proteína TL1A correspondiente a secuencias humanas (*Homo sapiens*), de rata (*Ratus norvegicus*), ratón (*Mus musculus*) y mono cynomolgus (*Macaca fascicularis*) (SEQ ID NOS: 38, 39, 40 y 41, respectivamente) se inmovilizó en placas de 96 pocillos de alta unión (Costar, Estados Unidos; distribuidor VWR AG, Nyon, Suiza) durante una noche a una concentración de 2 µg/ml a 4 °C en PBS. Las placas se bloquearon con albúmina BSA al 2 % (BSA, Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Suiza) a TA durante una hora. La solución de bloqueo se eliminó y se aplicó una dilución de la dosis de anticuerpo 5G6 a las placas. Las placas se incubaron a TA durante 60 minutos, se lavaron seis veces con PBS al 0,01 % Tween-20 y se añadió el sustrato TMB (Bio-rad Laboratories AG, Reinach, Suiza) a las placas. La reacción se detuvo después de 6 minutos mediante la adición de H₂SO₄ y la unión de 5G6 en las diferentes proteínas TL1A se reveló usando un anticuerpo secundario IgG anti-humano marcado con HRP (Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Suiza), añadido a una dilución de 1:1000. Las placas se leyeron para determinar la absorbancia a 450 nm por un lector de microplacas (Biotek, Estados Unidos; distribuidor: WITTEC AG, Littau, Suiza). La Figura 4 muestra que 5G6 reconoció, de una manera dependiente de la dosis, la proteína TL1A de todas las especies ensayadas.

Ejemplo 5:

Humanización del anticuerpo monoclonal de ratón 5G6

Se describe en el presente documento la humanización del anticuerpo 5G6 de ratón anti-TL1A humano que incluye la selección de marcos aceptores humanos, retromutaciones, y mutaciones que conservan y/o mejoran sustancialmente las propiedades de unión de marcos aceptores injertados con CDR humanos.

Diseño de las regiones variables reformadas

Se usó la correspondencia de homología para elegir marcos aceptores humanos para injertar CDR de 5G6. Pueden usarse bases de datos, por ejemplo, una base de datos de genes variables de la línea germinal de los loci de inmunoglobulina de ser humano y ratón (la base de datos IMGT, anteriormente) o VBASE2 (Retter I et al., (2005) Nucleic Acids Res. 33, Base de datos edición D671-D674) o la base de datos de Kabat (Johnson G et al., (2000) Nucleic Acids Res. 28: 214-218) o publicaciones (por ejemplo, Kabat EA et al., anteriormente) para identificar las subfamilias humanas a las que pertenecen las regiones V de cadena pesada y ligera murinas (SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente), y determinar el marco de la línea germinal humana mejor ajustado para usar como molécula aceptora. La selección de secuencias variables de cadena pesada y ligera (VH y VL) dentro de estas subfamilias para su uso como aceptor puede basarse en la homología de secuencia y/o una correspondencia de estructura de

las regiones CDR1 y CDR2 para ayudar a conservar la presentación relativa apropiada de las seis CDR después del injerto.

Por ejemplo, el uso de la base de datos IMGT indica buena homología entre el marco de dominio variable de cadena pesada 5G6 y los miembros de la subfamilia de dominio variable de cadena pesada humana 1. Se observaron homologías e identidades más altas de tanto CDR como secuencias marco para secuencias de línea germinal: IGHV1-2*02 (SEQ ID NO: 3), IGHV1-2*04 (SEQ ID NO: 4), IGHV1-2*05 (SEQ ID NO: 5), IGHV1-2*01 (SEQ ID NO: 6), e IGHV1-46*01 (SEQ ID NO: 7), cada una de las cuales tenía una identidad de secuencia superior al 67 % para toda la secuencia hasta CDR3. IGHV1-2*02 e IGHV1-2*04 mostraron un 69,4 % de identidad de secuencia, mientras que IGHV1-2*01 e IGHV1-46*01 mostraron una identidad de secuencia del 68,4 y 67,3 %, respectivamente.

Usando el mismo enfoque, la secuencia de dominio variable de cadena ligera 5G6 mostró buena homología con los miembros de la subfamilia 1 kappa de dominio variable de cadena ligera humana. Se observaron homologías e identidades más altas de tanto CDR como secuencias marco para secuencias de línea germinal: IGKV1-33*01 (SEQ ID NO: 8) e IGKV1D-33*01 (SEQ ID NO: 9) presentaron la identidad más alta (ambas con una identidad del 80,0 %), seguidas estrechamente por otro grupo que consistía en IGKV1D-12*02 (SEQ ID NO: 10), IGKV1D-12*01 (SEQ ID NO: 11), e IGKV1-12*02 (SEQ ID NO: 12), que presentaban el mismo grado de identidad de secuencia (75,8 %).

Como punto de partida para el proceso de humanización, los dominios variables humanos IGHV1-2*01 (SEQ ID NO: 3), e IGKV1-33*01 (SEQ ID NO: 8) se seleccionaron como aceptores para las CDR de 5G6. Se preparó un primer anticuerpo humanizado de isotipo gamma humano 1 (véase a continuación). El anticuerpo incluía un dominio variable de cadena pesada híbrido de humano-ratón y un dominio variable de cadena ligera híbrido de humano-ratón. El dominio variable de cadena pesada híbrida se basó en el dominio variable de cadena pesada humana IGHV1-2*01 en el que CDR1 y 2 de la línea germinal se reemplazaron respectivamente por CDR1 y 2 de cadena pesada de 5G6. La mejor correspondencia de la secuencia del segmento JH con respecto al marco aceptor humano se identificó a partir de las búsquedas IMGT mencionadas anteriormente.

La secuencia variable de cadena pesada híbrida de humano-ratón resultante que tiene regiones marco IGHV1-2*01 humanas, CDR de ratón 5G6, y la mejor correspondencia de JH con el aceptor humano se denomina en el presente documento como dominio variable de cadena pesada VH1 con SEQ ID NO: 13. De forma similar, el dominio variable de cadena ligera híbrida de humano-ratón usado para este primer candidato de anticuerpo humanizado tenía regiones marco IGKV1-33*01 humanas, CDR de ratón 5G6, y la mejor correspondencia de JK con el aceptor humano, y se denomina en el presente documento como dominio variable de cadena ligera VL1 con SEQ ID NO: 14. El primer anticuerpo humanizado que incluye VH1 y VL1 se abrevia en el presente documento anticuerpo VH1/VL1.

Producción del primer prototipo de anticuerpo humanizado

Las secuencias de ADN codificante (ADNc) para VH1 y VL1 se sintetizaron en un formato scFv por GENEART AG (Regensburg, Alemania) permitiendo de este modo que una única secuencia de ADN incluya ambos dominios variables (SEQ ID NO: 15). Los ADNc de dominio variable individuales se recuperaron de esta construcción de scFv mediante PCR, y se ensamblaron adicionalmente aguas arriba de su secuencia o secuencias de ADNc de dominio constante respectivas usando técnicas de ensamblaje de PCR. Finalmente, los ADNc de cadena pesada y ligera completos se ligaron en vectores independientes que se basan en un vector pcDNA3.1 modificado (Invitrogen, CA, Estados Unidos) que lleva el promotor CMV y una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. El vector específico de cadena ligera permitió la expresión de cadenas ligeras de isotipo kappa humano por ligación del ADNc de dominio variable de cadena ligera de interés frente al ADNc de dominio constante de cadena ligera kappa usando los sitios de enzima de restricción BamHI y BsiWI; mientras que el vector específico de la cadena pesada se diseñó para permitir la ligación del ADNc de dominio variable de cadena pesada de interés frente a la secuencia de ADNc que codifica los dominios constantes humanos de CH1 deIGHG1, de la región bisagra deIGHG1, CH2 deIGHG1 y CH3 deIGHG1 usando los sitios de enzima de restricción BamHI y Sall. Tanto en los vectores de expresión de cadena pesada como ligera, la secreción se dirigió por el péptido líder VJ2C de ratón que contenía el sitio BamHI. El sitio de enzima de la restricción BsiWI está situado en el dominio constante kappa; mientras que el sitio de la enzima de restricción Sall se encuentra en el dominio CH1 deIGHG1.

El anticuerpo VH1/VL1 (que tiene una cadena pesada de SEQ ID NO: 16 y una cadena ligera de SEQ ID NO: 17) se produjo transitoriamente mediante cotransfección de cantidades equivalentes de vectores de cadenas pesadas y ligeras en células HEK293-EBNA1 adaptadas en suspensión (número de catálogo de ATCC®: CRL-10852) usando polietilenimina (PEI, Sigma, Buchs, Suiza). Típicamente, se transfectan 100 ml de células en suspensión a una densidad de 0,8-1,2 millones de células por ml con una mezcla de ADN-PEI que contiene 50 µg de vector de

expresión que codifica la cadena pesada y 50 µg de vector de expresión que codifica la cadena ligera. Cuando se introducen vectores de expresión recombinante que codifican genes de anticuerpos en las células huésped, se producen anticuerpos cultivando adicionalmente las células durante un período de 4 a 5 días para permitir la secreción en el medio de cultivo (EX-CELL 293, medio sin suero de HEK293 Sigma, Buchs, Suiza), complementado con ácido plurónico al 0,1 %, glutamina 4 mM y 0,25 µg/ml de genética).

El anticuerpo VH1/VL1 se purificó a partir del sobrenadante libre de células usando medio de línea de corriente de proteína A recombinante (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza), y se cambió con tampón en una solución salina tamponada con fosfato antes de los ensayos.

Constantes de afinidad de unión cinética por resonancia de plasmón superficial (SPR)

Se midieron las constantes de afinidad de unión cinética (KD) en el anticuerpo capturado de proteína A usando TL1A etiquetado con histidina recombinante como analito. Las mediciones se realizaron en un BIAcore 2000 (GE Healthcare - BIAcore, GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza) a temperatura ambiente, y se analizaron con el software BiaEvaluation (BIAcore; v4.1, GE Healthcare Europe GmbH).

Se activó un chip sensor de grado de investigación CM5 (GE Healthcare Europe GmbH; ref. BR-1000-14) inyectando 35 µl de una solución 1:1 de clorhidrato de N-hidroxisulfosuccinimida (NHS)/1-Etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) (v/v; caudal de 5 µl/min; en las rutas de flujo 1 y 2). La proteína A (ref. P7837; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza) se diluyó a una concentración final de 50 µg/ml en tampón acetato pH 4,5 (GE, Healthcare Europe GmbH, BR-1003-50; una unidad de pH por debajo de µl) y posteriormente se inmovilizó en el chip sensor CM5 activado previamente inyectando 35 µl en ambas rutas de flujo 1 y 2 (5 µl/min); esto correspondió a aproximadamente 1500 unidades de respuesta (RU). El chip sensor de proteína A CM5 se desactivó entonces inyectando 35 µl de solución de etanolamina (5 µl/min). Finalmente, se realizaron dos inyecciones de 10 µl de solución de glicina (GE Healthcare Europe GmbH, ref. BR-1003-54; 10 mM, pH 1,5) para liberar moléculas de proteína A no entrecruzadas. Para las mediciones de afinidad, el anticuerpo quimérico y humanizado almacenado en 1 x de tampón PBS se diluyeron en tampón HBS-EP (GE Healthcare Europe GmbH, ref BR-1001-88; HEPES 0,01 M, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo al 0,005 % P20, pH 7,4) y posteriormente se inyectó en la ruta de flujo 2 del chip de la proteína-A CM5 (30 µl/min) para llegar a aproximadamente 180 RU. Después de esta etapa de captura, el TL1A humano etiquetado con histidina recombinante se inyectó a diferentes concentraciones (1,25 a 125 nM) en la ruta de flujo 1 y 2 (ruta de flujo 1 utilizada como referencia) a 30 µl/min de caudal. Después de cada evento de unión, la superficie se regeneró con tampón de glicina a pH 1,5 inyectado durante 20 s (30 µl/min).

Las mediciones (sensorgrama: fc2-fc1) se ajustaron mejor con un modelo de analito 1:1 sin transferencia de masa. Para tener en cuenta las variaciones experimentales en el anticuerpo capturado de proteína A al comienzo de cada medición, el valor R_{máx} se estableció en local en todos los ajustes. Los tiempos de disociación fueron de al menos 300-600 segundos. Las mediciones se realizaron por duplicado e incluyeron muestras de concentración nula por referencia. El valor de Chi² representa la suma de las diferencias cuadráticas entre los datos experimentales y los datos de referencia en cada punto; mientras que los gráficos de productos residuales indican la diferencia entre los datos experimentales y de referencia para cada punto del ajuste. Tanto Chi² como los valores residuales se usaron para evaluar la calidad de un ajuste entre los datos experimentales y los modelos de enlace individuales.

Retromutaciones de marcos humanos injertados

Puesto que el injerto directo de CDR de los anticuerpos de ratón 5G6 condujo a un candidato sin unión a TL1A humano (Tabla 6), se inició la mutagénesis en la que los residuos humanos son sustituidos por residuos de ratón. Este proceso se denomina retromutación y es el procedimiento más impredecible en la humanización de los anticuerpos monoclonales. Se necesita la identificación y la selección de restos marco críticos del anticuerpo de ratón que han de conservarse para preservar la afinidad mientras que al mismo tiempo se minimiza la inmunogenicidad potencial en el anticuerpo humanizado.

Para identificar residuos que pueden afectar a la mayoría de la conformación de CDR y/o el empaquetamiento del dominio intervariable, se calculó un modelo tridimensional para el par VH1-VL1 de dominios variables utilizando el servidor de modelado de homología de estructura SWISS-MODEL (Arnold K et al., (2006) Bioinformatics, 22(2): 195-201; <http://swissmodel.expasy.org>) configurado en modo automático. El análisis del modelo permitió la selección de un subconjunto de posiciones en función de su influencia putativa en las regiones CDR y/o el empaquetamiento del dominio variable de cadena pesada-cadena. Este subconjunto de posiciones consistía en posiciones variables de cadena pesada: 37, 48, 50, 67, 69, 71 y 75 así como posiciones variables de cadena ligera: 5 y 34 (numeración de

Kabat).

Los candidatos humanizados adicionales con retromutaciones en las posiciones seleccionadas que se han mencionado anteriormente se prepararon usando métodos de síntesis génica y mutagénesis estándar. Una secuencia de ADNc sencilla que incluye los dominios variables VH2 y VL2 (SEQ ID NO: 18) se sintetizó y se usó como un punto de partida para otras mutagénesis. La purificación y expresión de anticuerpos siguieron a los métodos descritos anteriormente. Los candidatos de anticuerpos humanizados se analizaron en cuanto a su afinidad de unión por SPR como se ha descrito previamente.

10 Las propiedades de unión (KD) de los anticuerpos humanizados basados en esta única sustitución o combinación de sustituciones se muestran en la Tabla 6. Entre las variantes humanizadas, el anticuerpo VH3/VL1 tenía la afinidad más alta para el antígeno TL1A, que presentaba una KD más baja del anticuerpo quimérico 5G6.

Termoestabilidad de anticuerpos anti-TL1A humanizados seleccionados mediante calorimetría diferencial de barrido

Las estabildades térmicas de los anticuerpos humanizados se midieron usando calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los perfiles de fusión de anticuerpos monoclonales son característicos de sus isotipos (Garber E & Demarest SJ (2007) Biochem. Biophys. Res. Commun. 355: 751-7), sin embargo, la temperatura de fusión en el punto medio del fragmento FAB puede identificarse fácilmente incluso en el contexto de una IgG de longitud completa. Tal fusión en el punto medio de la porción FAB se usó para controlar la estabilidad monoclonal de los candidatos humanizados.

Las mediciones calorimétricas se realizaron en un microcalorímetro de barrido diferencial VP-DSC (GE Healthcare Europe GmbH). El volumen celular fue de 0,128 ml, la velocidad de calentamiento fue de 200 °C/h, y el exceso de presión se mantuvo a 65 p.s.i. Todos los anticuerpos se usaron a una concentración de 1 mg/ml en PBS (pH 7,4). La capacidad calorífica molar del anticuerpo se estimó por comparación con muestras duplicadas que contenían un tampón idéntico del que se había omitido el anticuerpo. Las capacidades caloríficas molares parciales y las curvas de fusión se analizaron usando procedimientos estándar. Los termogramas se corrigieron en el valor inicial y la concentración se normalizó antes de seguir analizándose usando un modelo diferente de dos estados en el software Origin v7.0.

El fragmento FAB VH5/VL1 variante humanizado mostró una única transición a 83,8°C con una forma y amplitud consistentes con un desplegamiento cooperativo que se observa en general para fragmentos FAB plegados de forma compacta que indican que el proceso de ingeniería tuvo éxito al conservar la estabilidad de FAB. En general, la variante humanizada mostró una buena estabilidad térmica.

Tabla 6: Anticuerpos humanizados anti-TL1A humano

Variante de anticuerpo (IGHG1)	SEQ ID NOs	Retromutaciones	K _D (pM)
		VH/VL	
Quimera	19, 20	N.A./N.A.	728
VH1/VL1	16, 17	N.A./N.A.	sin unión
VH2/VL2	21, 25	VH: V37A-M48I-W50E-V67A-M69L-R71V-I75S VL: N34S-T5N	857
VH3/VL1	22, 17	VH: V37A-M48I-W50E-V67A-R71V	249
VH4/VL1	23, 17	VH: V37A-M48I-W50E-R71V	681
VH5/VL1	24, 17	VH: V37A-W50E-R71V	259

Ejemplo 6:

Los candidatos 5G6 humanizados pueden bloquear la secreción de IFN-γ inducida por TL1A por linfocitos T CD4 cebados

Los candidatos humanizados del anticuerpo 5G6 se ensayaron para determinar si podrían inhibir el aumento dependiente de TL1A en la producción de IFN-γ.

Las linfocitos T CD4 humanos se purificaron de las células mononucleares de sangre periférica (PMBC) como se describe en el Ejemplo 3 anterior. Todos los cultivos de células se realizaron en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640, PAA Laboratories, Pasching, Austria) complementado con suero de ternera fetal inactivado por

calor al 10 % (FCS, Amimed distribuido por Bioconcept, Allschwil, Suiza), aminoácidos no esenciales (PAA, distribuido por Chemie Brunschwig AG, Basilea, Suiza), ultraglutamina (Lonza, Basilea, Suiza), piruvato de sodio (PAA) y mezcla de penicilina/estreptomicina (Gibco Life technologies). Los linfocitos T CD4 purificados (10^5 células/pocillo) se incubaron con IL-12 (Peprotech, Hamburgo Alemania) a 8 ng/ml, IL-18 (MBL International, distribuido por LabForce AG, Nunningen, Suiza) a 200 ng/mL (factores de cebado) y TL1A soluble humano con una etiqueta-his N-terminal (codificada por SEQ ID NO: 118) durante 72 h en presencia de los anticuerpos candidatos humanizados 5G6 de bloqueo (VH3/VL1- SEQ ID NOS: 22 y 17, VH4/VL1- SEQ ID NOS: 23 y 17, VH5/VL1- SEQ ID NOS: 24 y 17 y VH2NL2- SEQ ID NO: 21 y 25), añadidos a las concentraciones 100, 10, 1 y 0,1 g/ml (véanse las tablas en la Figura 5), al mismo tiempo. El control de isotipo se añadió en 100 µg/ml en una placa de cultivo celular de 96 pocillos con fondo plano (TPP AG, Trasadingen, Suiza). Los sobrenadantes se recogieron después de 72 h e IFN-γ se cuantificó por ELISA usando el kit OptEIA (BD Pharmingen, Allschwil, Suiza) según las instrucciones del fabricante. La Figura 5 muestra que los anticuerpos humanizados anti-TL1A fueron capaces de inhibir sustancialmente la producción de IFN-γ.

15 Ejemplo 7:

El anticuerpo humanizado 5G6 es eficaz en un modelo murino de asma alérgica

El asma no se desarrolla espontáneamente en ratones, por lo tanto, para investigar esta enfermedad en ratones ha de inducirse una reacción de tipo asmática en las vías respiratorias. Se ha desarrollado una diversidad de modelos de exposición a alérgenos aguda y en este ejemplo, se usaron ratones BALB/c para desarrollar una respuesta inmunológica sesgada por linfocitos T auxiliares 2 buenos (Th2) (Boyce JA & Austin KF (2005) J Exp Med, 201: 1869-73). La ovoalbúmina, derivada de huevo de gallina es un alérgeno que induce una inflamación pulmonar alérgica fuerte en ratones y, por lo tanto, se usa con frecuencia en modelos murinos de asma alérgica (Kumar RK et al., (2008) Curr Drug Targets, 9: 485-94).

En este ejemplo, se usó el siguiente protocolo de inmunización para inducir asma alérgica: Los ratones BALB/c fueron sensibilizados por inyección i.p. de 100 µg de ovoalbúmina (albúmina de clara de huevo de gallina, grado V, Sigma Aldrich, Suiza) adsorbida en 1 mg de una suspensión de hidróxido de aluminio e hidróxido de magnesio (Imject Alum, Thermo Scientific, Suiza) el día 0 y día 14. El día 28, 30 y 33, los ratones se trataron i.p. con 50 mg/kg de anticuerpo humanizado 5G6 (VH5/VL1; bisagra de formato IgG4 estabilizada; SEQ ID NO: 124 y 17) o una cantidad equivalente de IgG humana de control. Como un control positivo, se usó dexametasona (Sigma, Suiza) en 5 mg/kg. Cuatro horas después del tratamiento, los ratones fueron anestesiados con 30 mg/kg de xilazina y 150 mg/kg de Ketamina (Xylazol y Ketazol de Graeb Veterinary products, Suiza) y se les inyectó por vía intranasal 10 µg de ovoalbúmina. Tres días más tarde, los ratones se sacrificaron y después de la canulación de la tráquea, se realizó un lavado broncoalveolar (BAL) inyectando 2 ml de PBS frío en el pulmón. Se contaron las células en los fluidos de BAL y los eosinófilos se detectaron por citometría de flujo usando CD11c y marcadores de superficie celular Siglec F.

Los resultados se muestran en la Figura 6 donde se puede observar que el tratamiento con el anticuerpo humanizado 5G6 dio como resultado aproximadamente una reducción de 4 veces en el número de eosinófilos en el fluido de BAL de ratones asmáticos.

Ejemplo 8:

45

El anticuerpo humanizado 5G6 es eficaz en un tratamiento de colitis aguda inducida por DSS en ratones

Se han desarrollado muchos modelos animales diferentes de enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) y éstos son herramientas valiosas para investigar la implicación de diversos factores en la patogénesis de IBD y para evaluar las opciones terapéuticas. El modelo de colitis inducida por dextrano sulfato sódico (DSS) es un modelo ampliamente utilizado de la enfermedad inflamatoria intestinal debido a su simplicidad y tiene muchas similitudes con la IBD humana, colitis ulcerosa especialmente (Perše M & Cerar A (2012) J Biomed Biotechnol, 2012; 718617; Wirtz S et al., (2007) Nat. Protoc, 2: 541-6).

Para evaluar el efecto potencial de anticuerpo humanizado 5G6 (VH5/VL1; bisagra formato IgG4 estabilizada; SEQ ID NO: SEQ ID NO: 124 y 17) en IBD, se indujo una afección de colitis aguda en ratones C57B1/6 mediante la administración de DSS al 2 % (PM 36-50 kDa; MP Biomedicals) en el agua de beber del grupo de ensayo durante 5 días. El grupo de control recibió agua del grifo no tratada. Después de la exposición a DSS, se dio agua del grifo al grupo de ensayo de ratones durante 7 días. Los ratones se trataron i.p 3x/semana con 50 mg/kg de anticuerpo

humanizado 5G6 o una cantidad equivalente de control de isotipo. Como un control positivo, se usó ciclosporina (Sandimmune, Novartis Pharma, Suiza) en 5 mg/kg. Los ratones se supervisaron diariamente para determinar la pérdida de peso y la consistencia de las heces. El día 12, todos los ratones se sacrificaron y se midió toda la longitud del colon. Como se muestra en la Figura 7, se puede observar que el tratamiento de ratones con un anticuerpo humanizado 5G6 dio como resultado la reducción del acortamiento del colon inducido por DSS.

Ejemplo 9:

El anticuerpo humanizado 5G6 es eficaz en el tratamiento de colitis TNBS en ratas

La inflamación intestinal en ratas puede ser inducida por administración intrarrectal de ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS). Se cree que la ulceración e inflamación localizada resultante implica una respuesta mediada por linfocitos T contra proteínas autólogas modificadas con hapteno o antígenos lumenales (Wirtz S *et al.*, anteriormente). Los síntomas incluyen diarrea, sangre oculta y pérdida de peso.

Para evaluar el efecto potencial de anticuerpo humanizado 5G6 (VH5/VL1; bisagra formato IgG4 estabilizada; SEQ ID NO: 124 y 17) en IBD, se indujo una afección de colitis en ratas Sprague-Dawley por administración intrarrectal de solución de TNBS (TNBS al 50 %: etanol de 200 grados al 50 %; 16 mg/ml de TNBS (Sigma, Cat. N.º 92822) a 64 mg/kg (4 ml/kg) en el colon de ratas anestesiadas en los grupos de tratamiento. El grupo de control no recibió ninguna solución de TNBS. Dos horas después de la administración de TNBS, las ratas se trataron i.p con una dosis única de anticuerpo humanizado 5G6 (50 mg/kg) o una cantidad equivalente de control de isotipo. Como control positivo, se administró por vía oral prednisolona (Sigma) en una dosis de 10 mg/kg dos horas después de la administración de TNBS y a diario durante los siguientes 5 días. Las ratas se sacrificaron el día 7 y la gravedad de la enfermedad se evaluó como una puntuación del colon usando el siguiente sistema de puntuación:

- 1) Adhesiones: ninguna = 0, mínima = 1, implicación de varios retorcimientos intestinales = 2
- 2) Estrechez: ninguna = 0, leve = 2, dilatación proximal grave = 3
- 3) Úlceras: ninguna = 0, ulceración lineal <1 cm - 1, dos úlceras lineales <1 cm = 2, más sitios de ulceración o una úlcera grande = 3
- 4) Espesor de pared: menos que 1 mm = 0, 1-3 mm = 1, >3 mm = 2

Como se muestra en la Figura 8, se puede observar que el tratamiento de ratas con un anticuerpo humanizado 5G6 dio como resultado la reducción de los parámetros de la enfermedad inducida por TNBS.

35 Ejemplo 10:

La unión del anticuerpo humanizado 5G6 a hTL1A está bloqueada tanto por hDcR3-Fc como por hDR3-Fc

Como se ha analizado anteriormente, TL1A es un ligando para TNFRSF25/DR3 y el receptor señuelo DcR3. DR3 es un receptor que contiene el dominio de muerte que está regulado positivamente durante la activación de linfocitos T, y la interacción de TL1A con DR3 puede promover la expansión de linfocitos T durante la respuesta inmune (Migone TS *et al.*, anteriormente). El receptor señuelo secretado (DcR3), una proteína soluble de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR), bloquea la acción de TL1A. (Kim S & Zhang L anteriormente).

Para evaluar si el anticuerpo humanizado 5G6 puede interferir con la interacción de hTL1A al receptor DR3 y/o al receptor señuelo DcR3, un TL1A humano etiquetado-his se cubrió en 2 µg/ml en una placa de ELISA y se incubó con 20 µg/ml de anticuerpo humanizado 5G6 (VH5/VL1; bisagra formato IgG4 estabilizada; SEQ ID NO: 124 y 17) en presencia de 10 µg/ml de fusiones Fc de los ectodominios de DcR3 humano, DR3 (ambos de R&D systems) o un receptor irrelevante (Ctrl-Fc) seguido de detección con IgG anti-humana conjugada con peroxidasa (específica de Fab). Como puede observarse en la Figura 9, la unión del anticuerpo humanizado 5G6 a hTL1A está bloqueada tanto por hDcR3-Fc como por hDR3-Fc. Esto confirma que la unión del anticuerpo humanizado 5G6 a hTL1A inhibe la interacción de hTL1A tanto con DR3 como con DcR3.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Glenmark Pharmaceuticals S.A.

<120> Anticuerpos que se unen a TL1A y sus usos

<130> Solicitud PCT
 <150> US 61/748.201
 <151> 02-01-2013
 5 <160> 124
 <170> PatentIn versión 3.5
 10 <210> 1
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 15 <400> 1
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Val Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser
 20 25 30
 Trp Met His Trp Ala Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile His Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Val Asp
 65 70 75 80
 Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 85 90 95
 Gly Asp Tyr Tyr Gly Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 2
 <211> 107
 20 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 2
 Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 25

ES 2 689 080 T3

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 3
<211> 114
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Trp Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 4
<211> 114
<212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 689 080 T3

<400> 4

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

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Trp Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Trp Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 5

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

ES 2 689 080 T3

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Trp Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 6

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ser Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Trp Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 7

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

ES 2 689 080 T3

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

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ser Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Trp Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

5 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 10

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

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

<210> 11
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```
<400> 11
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1          5          10          15
```

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

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

<210> 12
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

ES 2 689 080 T3

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

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

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

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

<210> 13
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> dominio variable de cadena pesada VH1

<400> 13
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile His Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> dominio variable de cadena ligera VL1

ES 2 689 080 T3

<400> 14

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 15

<211> 729

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> scFv Geneart VH1-VL1

<400> 15

caggtgcagc	tggtgcagtc	tggcgccgaa	gtgaagaaac	cagggcgccag	cgtgaaggtg	60
tcctgcaagg	ccagcggcta	cacctttacc	agcagctgga	tgcactgggt	gcgccaggct	120
ccaggacagg	gcctggaatg	gatgggctgg	atccacccta	atagcggcgg	caccaactac	180
gcccagaaat	tccagggcag	agtgaccatg	acccgggaca	ccagcatcag	caccgcctac	240
atggaactga	gccggctgag	aagcgacgac	accgccgtgt	actactgcgc	cagaggcgac	300
tactacggct	atgtgtcttg	gtttgcctac	tggggccagg	gcaccctcgt	gacagtgtct	360
agcggaggcg	gaggatctgg	cggcgaggga	agtggcggag	ggggatccga	tatccagatg	420
acccagagcc	ccagcagcct	gtctgccagc	gtgggcgaca	gagtgacaat	cacctgtcag	480
gccagccaga	acatcaacgt	gctgctgaac	tggtatcagc	agaagcccgg	caaggccccc	540
aagctgctga	tctacaaggc	ctccaacctg	cacaccggcg	tgcccagcag	atcttctggc	600
agcggctccg	gcaccgactt	caccttcacc	atcagctccc	tcagcccga	ggatatcgcc	660
acctactact	gccagcaggg	ccagagctac	ccctacacat	tcggccaggg	gaccaagctg	720
gaaatcaag						729

<210> 16
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> cadena pesada con dominio variable VH1

<400> 16
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile His Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

10

ES 2 689 080 T3

180					185					190					
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His
		195					200					205			
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
	210					215					220				
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
225					230					235					240
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
				245					250					255	
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
			260					265					270		
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
		275					280					285			
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
	290					295					300				
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
305					310					315					320
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
				325					330					335	
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
			340					345					350		
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
		355					360					365			
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
	370					375					380				
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
385					390					395					400
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
				405					410					415	
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
			420					425					430		

ES 2 689 080 T3

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 17
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena ligera con dominio variable VL1

<400> 17
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

ES 2 689 080 T3

	180	185	190
	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
	195	200	205
	Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	210		
5	<210> 18		
	<211> 729		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
10	<220>		
	<223> scFv Geneart VH2-VL2		
	<400> 18		
	caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaaggtg	60	
	tcctgcaagg ccagcgggcta cacctttacc agcagctgga tgcactgggc cagacaggct	120	
	ccaggccagg gactggaatg gatcggcgag atccacccca atagcggcgg caccaactac	180	
	gcccagaagt tccagggcag agccaccctg accgtggaca cctctagcag caccgcctac	240	
	atggaactga gccggctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagaggcgac	300	
	tactacggct atgtgtcttg gtttgcctac tggggccagg gcaccctcgt gacagtgtct	360	
	agcggaggcg gaggatctgg cggcggagga agtggcggag ggggatctga catccagatg	420	
	aaccagagcc ccagcagcct gagcgccctcc gtgggagaca gagtgaccat cacctgtcag	480	
	gccagccaga acatcaacgt gctgctgagc tggatatcagc agaagcccgg caaggccccc	540	
	aagctgctga tctacaaggc ctccaacctg cacacggcg tgcccagcag attttctggc	600	
	agcggctccg gcaccgactt caccttcacc atcagctccc tgcagcccga ggatatcgcc	660	
	acctactact gccagcaggg ccagagctac ccctacacat tcggccaggg gaccaagctg	720	
	gaaatcaag	729	
15	<210> 19		
	<211> 451		
	<212> PRT		
	<213> Artificial		
20	<220>		
	<223> cadena pesada 5G6 quimérica		
	<400> 19		
	Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Val Leu Val Arg Pro Gly Ala		
	1 5 10 15		
	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser		
	20 25 30		

ES 2 689 080 T3

Trp	Met	His	Trp	Ala	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
	35						40					45			
Gly	Glu	Ile	His	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
	50					55					60				
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Val	Asp	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Tyr	Val	Ser	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly
			100					105						110	
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser
		115					120					125			
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala
	130					135					140				
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
145					150					155					160
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala
				165					170					175	
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val
			180					185					190		
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His
		195					200					205			
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
	210					215					220				
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
225					230					235					240
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
				245					250					255	
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
			260					265					270		
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val

ES 2 689 080 T3

275					280					285					
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
290					295					300					
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
305					310					315					320
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
325					330					335					
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
340					345					350					
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
355					360					365					
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
370					375					380					
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
385					390					395					400
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
405					410					415					
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
420					425					430					
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
435					440					445					
Pro	Gly	Lys													
450															
<210> 20															
<211> 214															
<212> PRT															
<213> Artificial															
<220>															
<223> cadena ligera 5G6 quimérica															
<400> 20															
Asp	Ile	Gln	Met	Asn	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly
1				5					10					15	
Asp	Thr	Ile	Thr	Ile	Thr	Cys	His	Ala	Ser	Gln	Asn	Ile	Asn	Val	Leu
20					25					30					

ES 2 689 080 T3

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 21
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena pesada con dominio variable VH2

<400> 21
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

ES 2 689 080 T3

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser
 20 25 30
 Trp Met His Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile His Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

ES 2 689 080 T3

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 22
<211> 451
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena pesada con dominio variable VH3

<400> 22
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

ES 2 689 080 T3

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser
 20 25 30
 Trp Met His Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile His Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

ES 2 689 080 T3

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 23
<211> 451
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena pesada con dominio variable VH4

<400> 23
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

ES 2 689 080 T3

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser
 20 25 30
 Trp Met His Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile His Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

ES 2 689 080 T3

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 24

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena pesada con dominio variable VH5

<400> 24

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

ES 2 689 080 T3

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser
 20 25 30
 Trp Met His Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Glu Ile His Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

ES 2 689 080 T3

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 25

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena ligera con dominio variable VL2

<400> 25

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

ES 2 689 080 T3

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Leu
 20 25 30
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 26

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> dominio variable de cadena pesada VH2

<400> 26

ES 2 689 080 T3

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

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

Trp Met His Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile His Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 27

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> dominio variable de cadena pesada VH3

<400> 27

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

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

Trp Met His Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile His Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

ES 2 689 080 T3

[illegible]

ES 2 689 080 T3

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

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

Trp Met His Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Glu Ile His Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 30
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> dominio variable de cadena ligera VL2

<400> 30
Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr

ES 2 689 080 T3

	85	90	95
	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
	100	105	
5	<210> 31 <211> 363 <212> ADN <213> Artificial		
10	<220> <223> dominio variable de cadena pesada VH1		
	<400> 31 caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaagggtg	60	
	tcctgcaagg ccagcgggcta cacctttacc agcagctgga tgcactgggt gcgccaggct	120	
	ccaggacagg gcctggaatg gatgggctgg atccacccta atagcggcgg caccaactac	180	
	gcccagaaat tccagggcag agtgaccatg acccgggaca ccagcatcag caccgcctac	240	
	atggaactga gccggctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagaggcgac	300	
	tactacggct atgtgtcttg gtttgcctac tggggccagg gcaccctcgt gacagtgtct	360	
	agc	363	
15	<210> 32 <211> 363 <212> ADN <213> Artificial		
20	<220> <223> dominio variable de cadena pesada VH2		
	<400> 32 caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaagggtg	60	
	tcctgcaagg ccagcgggcta cacctttacc agcagctgga tgcactgggc cagacaggct	120	
	ccaggccagg gactggaatg gatcggcgag atccaccca atagcggcgg caccaactac	180	
	gcccagaagt tccagggcag agccaccctg accgtggaca cctctagcag caccgcctac	240	
	atggaactga gccggctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagaggcgac	300	
	tactacggct atgtgtcttg gtttgcctac tggggccagg gcaccctcgt gacagtgtct	360	
	agc	363	
25	<210> 33 <211> 363 <212> ADN <213> Artificial		
30	<220> <223> dominio variable de cadena pesada VH3		
	<400> 33		

	caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac cagggcgccag cgtgaagggtg	60
	tcctgcaagg ccagcgggcta cacctttacc agcagctgga tgcactgggc cagacaggct	120
	ccaggccagg gactggaatg gatcggcgag atccacccca atagcggcgg caccaactac	180
	gcccagaagt tccagggcag agccaccatg accgtggaca cctctatcag caccgcctac	240
	atggaactga gccggctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagaggcgac	300
	tactacggct atgtgtcttg gtttgcctac tggggccagg gcaccctcgt gacagtgtct	360
	agc	363
5	<210> 34 <211> 363 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> dominio variable de cadena pesada VH4	
	<400> 34 caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac cagggcgccag cgtgaagggtg	60
	tcctgcaagg ccagcgggcta cacctttacc agcagctgga tgcactgggc cagacaggct	120
	ccaggccagg gactggaatg gatcggcgag atccacccca atagcggcgg caccaactac	180
	gcccagaagt tccagggcag agtgaccatg accgtggaca cctctatcag caccgcctac	240
	atggaactga gccggctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagaggcgac	300
	tactacggct atgtgtcttg gtttgcctac tggggccagg gcaccctcgt gacagtgtct	360
	agc	363
15	<210> 35 <211> 363 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> dominio variable de cadena pesada VH5	
	<400> 35 caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac cagggcgccag cgtgaagggtg	60
	tcctgcaagg ccagcgggcta cacctttacc agcagctgga tgcactgggc cagacaggct	120
	ccaggccagg gactggaatg gatgggcgag atccacccca atagcggcgg caccaactac	180
	gcccagaagt tccagggcag agtgaccatg accgtggaca cctctatcag caccgcctac	240
	atggaactga gccggctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagaggcgac	300
	tactacggct atgtgtcttg gtttgcctac tggggccagg gcaccctcgt gacagtgtct	360
	agc	363
25	<210> 36 <211> 321	

<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
<223> dominio variable de cadena ligera VL1

<400> 36
gatatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgtctgccg gcgtgggga cagagtgaca 60
atcacctgtc aggccagcca gaacatcaac gtgctgctga actggtatca gcagaagccc 120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacaag gcctccaacc tgcacaccgg cgtgcccagc 180
agattttctg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccttca ccatcagctc cctgcagccc 240
gaggatatcg ccacctacta ctgccagcag ggccagagct acccctacac attcggccag 300
gggaccaagc tggaaatcaa g 321

10 <210> 37
<211> 321
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> dominio variable de cadena ligera VL2

<400> 37
gacatccaga tgaaccagag ccccagcagc ctgagcgcct ccgtgggaga cagagtgacc 60
atcacctgtc aggccagcca gaacatcaac gtgctgctga gctggtatca gcagaagccc 120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacaag gcctccaacc tgcacaccgg cgtgcccagc 180
agattttctg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccttca ccatcagctc cctgcagccc 240
gaggatatcg ccacctacta ctgccagcag ggccagagct acccctacac attcggccag 300
gggaccaagc tggaaatcaa g 321

20 <210> 38
<211> 251
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25 <400> 38
Met Ala Glu Asp Leu Gly Leu Ser Phe Gly Glu Thr Ala Ser Val Glu
1 5 10 15

Met Leu Pro Glu His Gly Ser Cys Arg Pro Lys Ala Arg Ser Ser Ser
20 25 30

Ala Arg Trp Ala Leu Thr Cys Cys Leu Val Leu Leu Pro Phe Leu Ala
35 40 45

ES 2 689 080 T3

Gly Leu Thr Thr Tyr Leu Leu Val Ser Gln Leu Arg Ala Gln Gly Glu
 50 55 60
 Ala Cys Val Gln Phe Gln Ala Leu Lys Gly Gln Glu Phe Ala Pro Ser
 65 70 75 80
 His Gln Gln Val Tyr Ala Pro Leu Arg Ala Asp Gly Asp Lys Pro Arg
 85 90 95
 Ala His Leu Thr Val Val Arg Gln Thr Pro Thr Gln His Phe Lys Asn
 100 105 110
 Gln Phe Pro Ala Leu His Trp Glu His Glu Leu Gly Leu Ala Phe Thr
 115 120 125
 Lys Asn Arg Met Asn Tyr Thr Asn Lys Phe Leu Leu Ile Pro Glu Ser
 130 135 140
 Gly Asp Tyr Phe Ile Tyr Ser Gln Val Thr Phe Arg Gly Met Thr Ser
 145 150 155 160
 Glu Cys Ser Glu Ile Arg Gln Ala Gly Arg Pro Asn Lys Pro Asp Ser
 165 170 175
 Ile Thr Val Val Ile Thr Lys Val Thr Asp Ser Tyr Pro Glu Pro Thr
 180 185 190
 Gln Leu Leu Met Gly Thr Lys Ser Val Cys Glu Val Gly Ser Asn Trp
 195 200 205
 Phe Gln Pro Ile Tyr Leu Gly Ala Met Phe Ser Leu Gln Glu Gly Asp
 210 215 220
 Lys Leu Met Val Asn Val Ser Asp Ile Ser Leu Val Asp Tyr Thr Lys
 225 230 235 240
 Glu Asp Lys Thr Phe Phe Gly Ala Phe Leu Leu
 245 250

<210> 39
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 39
 Met Ala Glu Asp Leu Gly Leu Ser Phe Gly Glu Thr Ala Ser Val Glu
 1 5 10 15

ES 2 689 080 T3

Met Leu Pro Glu His Gly Ser Cys Arg Pro Lys Ala Arg Ser Ser Ser
20 25 30

Ala Arg Trp Ala Leu Thr Cys Cys Leu Val Leu Leu Pro Phe Leu Ala
35 40 45

Gly Leu Thr Thr Tyr Leu Leu Val Ser Gln Leu Arg Ala Gln Gly Glu
50 55 60

Ala Cys Val Gln Phe Gln Ala Leu Lys Gly Gln Glu Phe Ala Pro Ser
65 70 75 80

His Gln Gln Val Tyr Ala Pro Leu Arg Ala Asp Gly Asp Lys Pro Arg
85 90 95

Ala His Leu Thr Val Val Arg Gln Thr Pro Thr Gln His Phe Lys Asn
100 105 110

Gln Phe Pro Ala Leu His Trp Glu His Glu Leu Gly Leu Ala Phe Thr
115 120 125

Lys Asn Arg Met Asn Tyr Thr Asn Lys Phe Leu Leu Ile Pro Glu Ser
130 135 140

Gly Asp Tyr Phe Ile Tyr Ser Gln Val Thr Phe Arg Gly Met Thr Ser
145 150 155 160

Glu Cys Ser Glu Ile Arg Gln Ala Gly Arg Pro Asn Lys Pro Asp Ser
165 170 175

Ile Thr Val Val Ile Thr Lys Val Thr Asp Ser Tyr Pro Glu Pro Thr
180 185 190

Gln Leu Leu Met Gly Thr Lys Ser Val Cys Glu Val Gly Ser Asn Trp
195 200 205

Phe Gln Pro Ile Tyr Leu Gly Ala Met Phe Ser Leu Gln Glu Gly Asp
210 215 220

Lys Leu Met Val Asn Val Ser Asp Ile Ser Leu Val Asp Tyr Thr Lys
225 230 235 240

Glu Asp Lys Thr Phe Phe Gly Ala Phe Leu Leu
245 250

<210> 40

<211> 252

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

ES 2 689 080 T3

<400> 40

Met Ala Glu Glu Leu Gly Leu Gly Phe Gly Glu Ala Val Pro Val Glu
1 5 10 15

Met Leu Pro Glu Gly Cys Arg His Arg Arg Glu Ala Arg Thr Gly Leu
20 25 30

Ala Ala Arg Ser Lys Ala Cys Leu Ala Leu Thr Cys Cys Leu Leu Ser
35 40 45

Phe Pro Ile Leu Ala Gly Leu Ser Thr Leu Leu Met Thr Gly Gln Leu
50 55 60

Arg Ile Pro Gly Lys Asp Cys Met Phe Pro Thr Val Thr Glu Glu Arg
65 70 75 80

Ser Ala Pro Ser Ala Gln Pro Val Tyr Thr Pro Ser Arg Asp Lys Pro
85 90 95

Lys Ala His Leu Thr Ile Met Arg Gln Thr Pro Val Pro His Leu Lys
100 105 110

Asn Glu Leu Ala Ala Leu His Trp Glu Asn Asn Leu Gly Met Ala Phe
115 120 125

Thr Lys Asn Arg Met Asn Tyr Thr Asn Lys Phe Leu Val Ile Pro Glu
130 135 140

Ser Gly Asp Tyr Phe Ile Tyr Ser Gln Ile Thr Phe Arg Gly Thr Thr
145 150 155 160

Ser Glu Cys Gly Asp Ile Ser Arg Val Arg Arg Pro Lys Lys Pro Asp
165 170 175

Ser Ile Thr Val Val Ile Thr Lys Val Ala Asp Ser Tyr Pro Glu Pro
180 185 190

Ala His Leu Leu Thr Gly Thr Lys Ser Val Cys Glu Ile Ser Ser Asn
195 200 205

Trp Phe Gln Pro Ile Tyr Leu Gly Ala Met Phe Ser Leu Glu Glu Gly
210 215 220

Asp Arg Leu Met Val Asn Val Ser Asp Ile Ser Leu Val Asp Tyr Thr
225 230 235 240

Lys Glu Asp Lys Thr Phe Phe Gly Ala Phe Leu Ile
245 250

<210> 41

<211> 251
 <212> PRT
 <213> *Macaca fascicularis*

5

<400> 41
 Met Ala Glu Asp Leu Gly Leu Ser Phe Gly Glu Thr Ala Ser Val Glu
 1 5 10 15
 Met Leu Pro Glu His Gly Ser Cys Arg Pro Lys Ala Arg Ser Ser Ser
 20 25 30
 Ala Cys Trp Ala Leu Thr Cys Cys Leu Val Leu Leu Pro Phe Leu Ala
 35 40 45
 Gly Leu Thr Thr Tyr Leu Leu Val Ser Gln Leu Arg Ala Gln Gly Glu
 50 55 60
 Ala Cys Val Gln Leu Gln Asp Leu Lys Gly Gln Glu Phe Ala Pro Ser
 65 70 75 80
 His Gln Gln Val Tyr Ala Pro Leu Arg Ala Asp Gly Asp Lys Pro Arg
 85 90 95
 Ala His Leu Thr Val Val Arg Gln Thr Pro Thr Gln His Leu Lys Asn
 100 105 110
 Gln Phe Pro Ala Leu His Trp Glu His Glu Leu Gly Leu Ala Phe Thr
 115 120 125
 Lys Asn Arg Met Asn Tyr Thr Asn Lys Phe Leu Leu Ile Pro Glu Ser
 130 135 140
 Gly Asp Tyr Phe Val Tyr Ser Gln Val Thr Phe Arg Gly Met Thr Ser
 145 150 155 160
 Glu Cys Ser Glu Ile Arg Gln Ala Gly Arg Pro Asn Lys Pro Asp Ser
 165 170 175
 Ile Thr Val Val Ile Thr Lys Val Thr Asp Ser Tyr Pro Glu Pro Thr
 180 185 190
 Gln Leu Leu Met Gly Thr Lys Ser Val Cys Glu Val Gly Ser Asn Trp
 195 200 205

ES 2 689 080 T3

Phe Gln Pro Ile Tyr Leu Gly Ala Met Phe Ser Leu Gln Glu Gly Asp
210 215 220

Lys Leu Met Val Asn Val Ser Asp Ile Ser Leu Val Asp Tyr Thr Lys
225 230 235 240

Glu Asp Lys Thr Phe Phe Gly Ala Phe Leu Leu
245 250

<210> 42

<211> 1353

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cadena pesada con dominio variable VH1

<400> 42

caggtgcagc	tggtgcagtc	tggcgccgaa	gtgaagaaac	caggcgccag	cgtgaaggtg	60
tcctgcaagg	ccagcgggcta	cacctttacc	agcagctgga	tgcactgggt	gcgccaggct	120
ccaggacagg	gcctggaatg	gatgggctgg	atccacccta	atagcggcgg	caccaactac	180
gcccagaaat	tccagggcag	agtgaccatg	acccgggaca	ccagcatcag	caccgcctac	240
atggaactga	gccggctgag	aagcgacgac	accgccgtgt	actactgcmc	cagaggcgac	300
tactacggct	atgtgtcttg	gtttgcctac	tggggccagg	gcaccctcgt	gacagtgtct	360
agcgcgtcga	ccaagggccc	cagcgtgttc	ccgctagccc	ccagcagcaa	gagcaccagc	420
ggcggcacag	ccgccctggg	ctgcctgggt	aaggactact	tccccgagcc	cgtgaccgtg	480
tcctggaact	ctggagccct	gacctccggc	gtgcacacct	tccccgccgt	gctccagagc	540
agcggcctgt	acagcctgag	cagcgtgggt	acagtgccca	gcagcagcct	gggaaccacg	600
acctacatct	gcaacgtgaa	ccacaagccc	agcaaacacca	aggtggacaa	gaaggtggag	660
cccaagagct	gcgacaagac	ccacacctgc	ccccccctgcc	ctgcccctga	gctgctgggc	720
ggaccctccg	tgttcctgtt	ccccccaag	ccaaggaca	ccctgatgat	cagccggacc	780
cccaggtga	cctgcgtggt	ggtggacgtg	agccacgagg	accctgaggt	gaagttcaat	840
tggtacgtgg	acggcgtgga	ggtgcacaac	gccaagacca	agccccggga	ggaacagtac	900
aacagcacct	accgggtggt	gtccgtgctg	accgtgctgc	accaggactg	gctgaacggc	960
aaggaatata	agtgcaaggt	ctccaacaag	gcctgcctg	cccccatcga	aaagaccatc	1020
agcaaggcca	agggccagcc	cagggagccc	caggtgtaca	ccctgcccc	ctcccgggac	1080
gagctgacca	agaaccaggt	gtccctgacc	tgtctgggtga	agggcttcta	ccccagcgac	1140
atcgccgtgg	agtgggagag	caacggccag	cccagagaaca	actacaagac	cacccccct	1200

ES 2 689 080 T3

gtgctggaca ggcacggcag cttcttcctg tacagcaagc tgaccgtgga caagagccgg 1260
 tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgctcc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac 1320
 acccagaaga gcctgagcct gtcccccggc aag 1353

<210> 43
 <211> 1353
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena pesada con dominio variable VH2

<400> 43
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaagggtg 60
 tcctgcaagg ccagcgggcta cacctttacc agcagctgga tgcaactgggc cagacaggct 120
 ccagggccagg gactggaatg gatcggcgag atccacccca atagcggcgg caccaactac 180
 gcccagaagt tccagggcag agccaccctg accgtggaca cctctagcag caccgcctac 240
 atggaactga gccggctgag aagcgacgac accgcctgtg actactgcgc cagaggcgac 300
 tactacggct atgtgtcttg gtttgcttac tggggccagg gcaccctcgt gacagtgtct 360
 agcgcgtoga ccaagggccc cagcgtgttc ccgctagccc ccagcagcaa gagcaccagc 420
 ggcggcacag ccgccctggg ctgcctggtg aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480
 tcctggaact ctggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctccagagc 540
 agcggcctgt acagcctgag cagcgtggtg acagtgccca gcagcagcct gggaaccacag 600
 acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660
 cccaagagct gcgacaagac ccacacctgc cccccctgcc ctgccctga gctgctgggc 720
 ggaccctccg tgttcctgtt ccccccaag cccaaggaca ccctgatgat cagccggacc 780
 cccgaggtga cctgcgtggt ggtggacgtg agccacgagg accctgaggt gaagtcaat 840
 tggtagctgg acggcgtgga ggtgcacaac gccaaagacca agccccggga ggaacagtac 900
 aacagcacct accgggtggt gtccgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc 960
 aaggaatata agtgcaaggt ctccaacaag gcctgcctg ccccatcga aaagaccatc 1020
 agcaaggcca agggccagcc caggagccc cagggtgata ccctgcccc ctcccgggac 1080
 gagctgacca agaaccaggt gtccctgacc tgtctggtga agggcttcta cccagcgac 1140
 atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cccgagaaca actacaagac cccccccct 1200
 gtgctggaca ggcacggcag cttcttcctg tacagcaagc tgaccgtgga caagagccgg 1260
 tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgctcc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac 1320
 acccagaaga gcctgagcct gtcccccggc aag 1353

<210> 44
 <211> 1353

<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
<223> cadena pesada con dominio variable VH3

<400> 44
caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaagggtg 60
tcctgcaagg ccagcgggcta cacctttacc agcagctgga tgcactgggc cagacaggct 120
ccagggccagg gactggaatg gatcggcgag atccacccca atagcggcgg caccaactac 180
gcccagaagt tccagggcag agccaccatg accgtggaca cctctatcag caccgcctac 240
atggaactga gccggctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcmc cagagcgac 300
tactacggct atgtgtcttg gtttgcctac tggggccagg gcaccctcgt gacagtgtct 360
agcgcgtcga ccaagggccc cagcgtgttc ccgctagccc ccagcagcaa gagcaccagc 420
ggcggcacag ccgccctggg ctgcctggtg aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480
tcctggaact ctggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctccagagc 540
agcggcctgt acagcctgag cagcgtggtg acagtgccca gcagcagcct gggaaaccag 600
acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660
cccaagagct gcgacaagac ccacacctgc cccccctgcc ctgcccctga gctgctgggc 720
ggaccctccg tgttcctgtt ccccccaag cccaaggaca ccctgatgat cagccggacc 780
cccagagtgga cctgcgtggt ggtggacgtg agccacgagg accctgaggt gaagttcaat 840
tggtagctgg acggcgtgga ggtgcacaac gccaaagacca agccccggga ggaacagtag 900
aacagcacct accgggtggt gtccgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc 960
aaggaataca agtgcaaggc ctccaacaag gccctgcctg ccccatcga aaagaccatc 1020
agcaaggcca agggccagcc caggagccc caggtgtaca ccctgcccc ctcccgggac 1080
gagctgacca agaaccaggc gtccctgacc tgtctggtga agggcttcta cccacgcgac 1140
atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cccgagaaca actacaagac cccccccct 1200
gtgctggaca gcgacggcag cttcttcctg tacagcaagc tgaccgtgga caagagccgg 1260
tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgctcc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac 1320
accagaaga gcctgagcct gtccccggc aag 1353

10 <210> 45
<211> 1353
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> cadena pesada con dominio variable VH4

<400> 45

ES 2 689 080 T3

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaagggtg 60
tcctgcaagg ccagcgggcta cacctttacc agcagctgga tgcactgggc cagacaggct 120
ccaggccagg gactggaatg gatcggcgag atccacccca atagcggcgg caccaactac 180
gcccagaagt tccagggcag agtgaccatg accgtggaca cctctatcag caccgcctac 240
atggaactga gccggctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagagggcag 300
tactacggct atgtgtcttg gtttgcctac tggggccagg gcaccctcgt gacagtgtct 360
agcgcgtcga ccaagggccc cagcgtgttc ccgctagccc ccagcagcaa gagcaccagc 420
ggcggcacag ccgccctggg ctgcctggtg aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480
tcctggaact ctggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctccagagc 540
agcggcctgt acagcctgag cagcgtggtg acagtgccca gcagcagcct gggaaaccag 600
acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaagggtggag 660
cccaagagct gcgacaagac ccacacctgc cccccctgcc ctgccctga gctgctgggc 720
ggaccctccg tgttcctgtt ccccccaag cccaaggaca ccctgatgat cagccggacc 780
cccaggtga cctgcgtggt ggtggacgtg agccacgagg accctgaggt gaagttcaat 840
tggtagctgg acggcgtgga ggtgcacaac gccaaagacca agccccggga ggaacagtac 900
aacagcacct accgggtggt gtccgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc 960
aaggaatata agtgcaaggc ctccaacaag gccctgcctg ccccatcga aaagaccatc 1020
agcaaggcca agggccagcc caggagagccc caggtgtaca ccctgcccc ctcccgggac 1080
gagctgacca agaaccaggc gtccctgacc tgtctggtga agggcttcta cccacgcagc 1140
atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cccgagaaca actacaagac cccccccct 1200
gtgctggaca gcgacggcag cttcttcctg tacagcaagc tgaccgtgga caagagccgg 1260
tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgctcc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac 1320
accagaaga gcctgagcct gtcccccggc aag 1353

<210> 46

<211> 1353

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cadena pesada con dominio variable VH5

<400> 46

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaagggtg 60
tcctgcaagg ccagcgggcta cacctttacc agcagctgga tgcactgggc cagacaggct 120
ccaggccagg gactggaatg gatgggcgag atccacccca atagcggcgg caccaactac 180

ES 2 689 080 T3

gccagaagt tccagggcag agtgaccatg accgtggaca cctctatcag caccgcctac 240
 atggaactga gccggctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagaggcgac 300
 tactacggct atgtgtcttg gtttgcctac tggggccagg gcaccctcgt gacagtgtct 360
 agcgcgctga ccaagggccc cagcgtgttc ccgctagccc ccagcagcaa gagcaccagc 420
 ggcggcacag ccgccctggg ctgcctggtg aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480
 tcctggaact ctggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctccagagc 540
 agcggcctgt acagcctgag cagcgtggtg acagtgccca gcagcagcct gggaacccag 600
 acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaagtgagg 660
 cccaagagct gcgacaagac ccacacctgc cccccctgcc ctgcccctga gctgctgggc 720
 ggaccctccg tgttctctgt ccccccaag cccaaggaca ccctgatgat cagccggacc 780
 cccgaggtga cctgcgtggt ggtggacgtg agccacgagg accctgaggt gaagttcaat 840
 tggtagctgg acggcggtga ggtgcacaac gccaaagacca agccccggga ggaacagtac 900
 aacagcacct accgggtggt gtccgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc 960
 aaggaatata agtgcaaggt ctccaacaag gccctgcctg ccccatcga aaagaccatc 1020
 agcaaggcca agggccagcc caggagccc caggtgtaca ccctgcccc ctcccgggac 1080
 gagctgacca agaaccaggt gtccctgacc tgtctggtga agggcttcta cccagcgac 1140
 atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cccgagaaca actacaagac cccccccct 1200
 gtgctggaca gcgacggcag cttcttcctg tacagcaagc tgaccgtgga caagagccgg 1260
 tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgctcc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac 1320
 acccagaaga gcctgagcct gtccccggc aag 1353

<210> 47
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena ligera con dominio variable VL1

<400> 47
 gatatccaga tgaccagag cccagcagc ctgtctgcc gcgtagggcga cagagtgaca 60
 atcacctgtc aggccagcca gaacatcaac gtgtgctga actggtatca gcagaagccc 120
 ggcaaggccc ccaagctgct gatctacaag gcctccaacc tgcacaccgg cgtgcccagc 180
 agattttctg gcaggggctc cggcaccgac ttacacttca ccatcagctc cctgcagccc 240
 gaggatatcg ccacctacta ctgccagcag ggccagagct acccctacac attcggccag 300
 gggaccaagc tggaaatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc 360

	agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa caacttctac	420
	ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tccagagcgg caacagccag	480
	gaaagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc	540
	ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc	600
	ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gc	642
5	<210> 48 <211> 642 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cadena ligera con dominio variable VL2	
	<400> 48 gacatccaga tgaaccagag cccagcagc ctgagcgcct ccgtgggaga cagagtgacc	60
	atcacctgtc aggccagcca gaacatcaac gtgtctgtga gctggtatca gcagaagccc	120
	ggcaaggccc ccaagctgct gatctacaag gcctccaacc tgcacaccgg cgtgcccagc	180
	agattttctg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccttca ccatcagctc cctgcagccc	240
	gaggatatcg ccacctacta ctgccagcag ggccagagct acccctacac attcggccag	300
	gggaccaagc tggaaatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc	360
	agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa caacttctac	420
	ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tccagagcgg caacagccag	480
	gaaagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc	540
	ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc	600
	ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gc	642
15	<210> 49 <211> 1356 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> cadena pesada de 5G6 con dominio variable	
	<400> 49 caggtccagc tccagcaacc tggttctgtg ctggtgaggg ctggagcttc agtgaaggtg	60
	tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agttcctgga tgcactgggc gaagcagagg	120
	cctggacaag gccttgagtg gattggagag attcatccta atagtgggtg tactaactac	180
	aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgtagaca catcctccag cacagcctac	240
	gtggatctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaggggat	300
	tactacggct acgtctcctg gtttgcttac tggggccaag ggactctggt cactgtctcc	360

ES 2 689 080 T3

tcagcctcca ccaagggccc cagcgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gtctaccagc	420
ggcggcacag cagccctggg atgcctgggt aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg	480
agctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagc	540
agcggcctgt acagcctgag cagcgtgggt accgtgccca gcagcagcct gggcaccacag	600
acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag	660
cccaagagct gcgacaagac ccacacctgc cctccctgtc ctgctcctga gctgctcggc	720
ggaccctccg tgttcctgtt ccccccaag cccaaggaca ccctgatgat cagcaggacc	780
cccagagtga cctgcgtggt ggtggacgtg agccacgagg acccagaggt gaagttcaac	840
tgggtacgtg acggcgtgga ggtgcacaac gccaaagacca agcccagaga ggaacagtac	900
aacagcacct acaggggtgt gtccgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc	960
aaagagtaca agtgcaaggt ctccaacaag gccctgccag ccccatcga gaaaaccatc	1020
agcaaggcca agggccagcc acgggagccc caggtgtaca ccctgcccc ctcccgcgag	1080
gagatgacca agaaccaggt gtccctgaca tgtctggtga aaggcttcta cccagcgac	1140
atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cccgagaaca actacaagac cccccccca	1200
gtgctggaca gcgacggcag cttcttcctg tacagcaagc tgaccgtgga caagagcagg	1260
tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac	1320
accagaaga gcctgagcct gtcccccggc aagtga	1356

<210> 50
 <211> 645
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena ligera de 5G6 con dominio variable

<400> 50	
gacatccaga tgaaccagtc tccatccagt ctgtctgcat cccttgaga cacaattacc	60
atcacttgcc atgccagtca gaacattaat gttttgttaa gctggtacca gcagaaacca	120
ggaaatattc ctaaaactctt gatctataag gcttccaact tgcacacagg cgtcccatca	180
aggtttagtg gcagtggatc tggaacaggt ttcacattta ccatcagcag cctgcagcct	240
gaagacatcg ccacttacta ctgtcaacag ggtcaaagtt atccgtacac gttcggaggg	300
gggaccaagc tggaaataaa acggaccgtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc	360
agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa caacttctac	420
ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag	480
gaaagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc	540

	ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagga	600
	ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gctga	645
5	<210> 51 <211> 10 <212> PRT <213> Mus musculus	
10	<400> 51 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser Trp Met His 1 5 10	
15	<210> 52 <211> 8 <212> PRT <213> Mus musculus	
20	<400> 52 Ile His Pro Asn Ser Gly Gly Thr 1 5	
25	<210> 53 <211> 14 <212> PRT <213> Mus musculus	
30	<400> 53 Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr 1 5 10	
35	<210> 54 <211> 6 <212> PRT <213> Mus musculus	
40	<400> 54 Gln Asn Ile Asn Val Leu 1 5	
45	<210> 55 <211> 3 <212> PRT <213> Mus musculus	
50	<400> 55 Lys Ala Ser 1	
	<210> 56 <211> 9 <212> PRT <213> Mus musculus	
	<400> 56 Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr Thr 1 5	
	<210> 57 <211> 11	

<212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> CDR1 extendida de cadena pesada VH5

<400> 57
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser Trp Met His Trp
 1 5 10

10 <210> 58
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> CDR2 extendida de cadena pesada VH5

<400> 58
 Trp Met Gly Glu Ile His Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln
 1 5 10 15

Lys Phe Gln Gly
 20 20

20 <210> 59
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> CDR3 extendida de cadena pesada VH5

<400> 59
 Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
 30 1 5 10

<210> 60
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> CDR1 extendida de cadena ligera VL1

40 <400> 60
 Gln Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Leu Leu Asn Trp Tyr
 1 5 10

45 <210> 61
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> CDR2 extendida de cadena ligera VL1

<400> 61

Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr
1 5 10

<210> 62
<211> 9
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> CDR3 extendida de cadena ligera VL1

<400> 62
Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 63
15 <211> 363
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
20 <223> 5G6 de dominio variable de cadena pesada

<400> 63
caggtccagc tccagcaacc tggttctgtg ctggtgaggc ctggagcttc agtgaagggtg 60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agttcctgga tgcactgggc gaagcagagg 120
cctggacaag gccttgagtg gattggagag attcatccta atagtgggtg tactaactac 180
aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgtagaca catcctccag cacagcctac 240
gtggatctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaggggat 300
tactacggct acgtctcctg gtttgcttac tggggccaag ggactctggt cactgtctcc 360
tca 363

<210> 64
25 <211> 321
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
30 <223> 5G6 de dominio variable de cadena ligera

<400> 64
gacatccaga tgaaccagtc tccatccagt ctgtctgcat cccttggaga cacaattacc 60
atcacttgcc atgccagtca gaacattaat gttttgttaa gctggtacca gcagaaacca 120
ggaaatattc ctaaactctt gatctataag gcttccaact tgcacacagc cgtcccatca 180
aggtttagtg gcagtggatc tggaacaggt ttcacattta ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagacatcg ccacttacta ctgtcaacag ggtcaaagtt atccgtacac gttcggaggg 300
gggaccaagc tggaaataaa a 321

35 <210> 65
<211> 41

<212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Mezcla de cebadores VH - inverso 1

 <400> 65
 gtgatcgcca tggcgtcgac cgakgtmag cttcaggagt c 41

10 <210> 66
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Mezcla de cebadores VH - inverso 2

 <400> 66
 gtgatcgcca tggcgtcgac cgaggtbcag ctbcagcagt c 41

20 <210> 67
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Mezcla de cebadores VH - inverso 3

 <400> 67
 gtgatcgcca tggcgtcgac ccaggtgcag ctgaagsart c 41

30 <210> 68
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Mezcla de cebadores VH - inverso 4

40 <400> 68
 gtgatcgcca tggcgtcgac cgaggtccar ctgcaacart c 41

 <210> 69
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Mezcla de cebadores VH - inverso 5

50 <400> 69
 gtgatcgcca tggcgtcgac ccaggtycag ctbcagcart c 41

55 <210> 70
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>

<223> Mezcla de cebadores VH - inverso 6

<400> 70
gtgatcgcca tggcgtcgac ccaggtycar ctgcagcart c 41

5

<210> 71
<211> 41
<212> ADN
<213> Artificial

10

<220>
<223> Mezcla de cebadores VH - inverso 7

<400> 71
gtgatcgcca tggcgtcgac ccaggtccac gtgaagcart c 41

15

<210> 72
<211> 41
<212> ADN
<213> Artificial

20

<220>
<223> Mezcla de cebadores VH - inverso 8

25

<400> 72
gtgatcgcca tggcgtcgac cgaggtgaas stggtggart c 41

30

<210> 73
<211> 41
<212> ADN
<213> Artificial

35

<220>
<223> Mezcla de cebadores VH - inverso 9

<400> 73
gtgatcgcca tggcgtcgac cgavgtgawg stggtggagt c 41

40

<210> 74
<211> 41
<212> ADN
<213> Artificial

45

<220>
<223> Mezcla de cebadores VH - inverso 10

<400> 74
gtgatcgcca tggcgtcgac cgaggtgcag stggtggart c 41

50

<210> 75
<211> 41
<212> ADN
<213> Artificial

55

<220>
<223> Mezcla de cebadores VH - inverso 11

<400> 75
gtgatcgcca tggcgtcgac cgakgtgcam ctggtggart c 41

5
 <210> 76
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial

10
 <220>
 <223> Mezcla de cebadores VH - inverso 12

15
 <400> 76
 gtgatcgcca tggcgtcgac cgaggtgaag ctgatggart c 41

20
 <210> 77
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial

25
 <220>
 <223> Mezcla de cebadores VH - inverso 13

30
 <400> 77
 gtgatcgcca tggcgtcgac cgaggtgcar ctgttgart c 41

35
 <210> 78
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial

40
 <220>
 <223> Mezcla de cebadores VH - inverso 14

45
 <400> 78
 gtgatcgcca tggcgtcgac cgargtraag ctctcgart c 41

50
 <210> 79
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial

55
 <220>
 <223> Mezcla de cebadores VH - inverso 15

60
 <400> 79
 gtgatcgcca tggcgtcgac cgaagtgaar sttgaggart c 41

65
 <210> 80
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial

70
 <220>
 <223> Mezcla de cebadores VH - inverso 16

75
 <400> 80
 gtgatcgcca tggcgtcgac ccaggttact ctraaasart c 41

80
 <210> 81
 <211> 41
 <212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> Mezcla de cebadores VH - inverso 17
 5
 <400> 81
 gtgatcgcca tggcgtcgac ccaggtccaa ctvcagcarc c 41
 <210> 82
 10 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Mezcla de cebadores VH - inverso 18
 <400> 82
 gtgatcgcca tggcgtcgac cgatgtgaac ttggaasart c 41
 20 <210> 83
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Mezcla de cebadores VH - inverso 19
 <400> 83
 gtgatcgcca tggcgtcgac cgaggtgaag gtcacgart c 41
 30 <210> 84
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Mezcla de cebadores VH - directo 1
 <400> 84
 40 cctccaccac tcgagcccga ggaaacggtg accgtggt 38
 <210> 85
 <211> 38
 <212> ADN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> Mezcla de cebadores VH - directo 2
 50 <400> 85
 cctccaccac tcgagcccga ggagactgtg agagtgg 38
 <210> 86
 <211> 38
 <212> ADN
 55 <213> Artificial
 <220>
 <223> Mezcla de cebadores VH - directo 3

	<400> 86 cctccaccac tcgagcccg c agagacagtg accagagt	38
5	<210> 87 <211> 38 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Mezcla de cebadores VH - directo 4	
15	<400> 87 cctccaccac tcgagcccg g gagacggtg actgaggt	38
20	<210> 88 <211> 35 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Mezcla de cebadores VL - inverso 1	
30	<400> 88 ggcgggtggcg ctagcgayat ccagctgact cagcc	35
35	<210> 89 <211> 35 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Mezcla de cebadores VL - inverso 2	
45	<400> 89 ggcgggtggcg ctagccaaat tgttctcacc cagtc	35
50	<210> 90 <211> 35 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Mezcla de cebadores VL - inverso 3	
	<400> 90 ggcgggtggcg ctagcgayat tgtgmtmact cagtc	35
	<210> 91 <211> 35 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Mezcla de cebadores VL - inverso 4	
	<400> 91 ggcgggtggcg ctagcgayat tgtgytraca cagtc	35

5	<210> 92	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Mezcla de cebadores VL - inverso 5	
10	<400> 92	
	ggcgggtggcg ctagcgayat tgtratgacm cagtc	35
	<210> 93	
	<211> 35	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Mezcla de cebadores VL - inverso 6	
	<400> 93	
	ggcgggtggcg ctagcgayat tmagatramc cagtc	35
20	<210> 94	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
25	<223> Mezcla de cebadores VL - inverso 7	
	<400> 94	
	ggcgggtggcg ctagcgayat tcagatgayd cagtc	35
	<210> 95	
	<211> 35	
30	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Mezcla de cebadores VL - inverso 8	
	<400> 95	
35	ggcgggtggcg ctagcgayat ycagatgaca cagac	35
	<210> 96	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> Mezcla de cebadores VL - inverso 9	
	<400> 96	
	ggcgggtggcg ctagcgayat tgttctcawc cagtc	35
	<210> 97	
45	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Mezcla de cebadores VL - inverso 9	
50	<400> 96	
	ggcgggtggcg ctagcgayat tgttctcawc cagtc	35
	<210> 97	
	<211> 35	
	<212> ADN	
55	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Mezcla de cebadores VL - inverso 9	
	<400> 96	
	ggcgggtggcg ctagcgayat tgttctcawc cagtc	35

	<220>		
	<223> Mezcla de cebadores VL - inverso 10		
5	<400> 97		
	ggcgggtggcg ctagcgayat tggwtsacc caatc	35	
	<210> 98		
	<211> 35		
10	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Mezcla de cebadores VL - inverso 11		
15	<400> 98		
	ggcgggtggcg ctagcgayat tstratgacc cartc	35	
	<210> 99		
20	<211> 35		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
25	<223> Mezcla de cebadores VL - inverso 12		
	<400> 99		
	ggcgggtggcg ctagcgayrt tktgatgacc carac	35	
30	<210> 100		
	<211> 35		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
35	<220>		
	<223> Mezcla de cebadores VL - inverso 13		
	<400> 100		
40	ggcgggtggcg ctagcgayat tgtgatgacb cagkc	35	
	<210> 101		
	<211> 35		
	<212> ADN		
45	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Mezcla de cebadores VL - inverso 14		
	<400> 101		
50	ggcgggtggcg ctagcgayat tgtgataacy cagga	35	
	<210> 102		
	<211> 35		
55	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Mezcla de cebadores VL - inverso 15		

	<400> 102 ggcgggtggcg ctagcgayat tgtgatgacc cagwt	35
5	<210> 103 <211> 35 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Mezcla de cebadores VL - inverso 16	
	<400> 103 ggcgggtggcg ctagcgayat tgtgatgaca caacc	35
15	<210> 104 <211> 35 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Mezcla de cebadores VL - inverso 17	
	<400> 104 ggcgggtggcg ctagcgayat ttgtctgact cagtc	35
25	<210> 105 <211> 35 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Mezcla de cebadores VL - inverso 18	
	<400> 105 ggcgggtggcg ctagcgaaac aactgtgacc cagtc	35
35	<210> 106 <211> 35 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Mezcla de cebadores VL - inverso 19	
	<400> 106 ggcgggtggcg ctagcgaaaa tgtktsacc cagtc	35
45	<210> 107 <211> 38 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Mezcla de cebadores VL - inverso 20	
	<400> 107 ggcgggtggcg ctagccaggc tttgtgact caggaatc	38
55	<210> 108	

	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Mezcla de cebadores VL - directo 1	
	<400> 108	
10	atgctgacgc ggccgcacgt ttattcca gcttgg	36
	<210> 109	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Mezcla de cebadores VL - directo 2	
	<400> 109	
20	atgctgacgc ggccgcacgt ttattcca acttgg	36
	<210> 110	
	<211> 36	
	<212> ADN	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Mezcla de cebadores VL - directo 3	
30	<400> 110	
	atgctgacgc ggccgcacgt ttacgtcca gcttgg	36
	<210> 111	
	<211> 36	
35	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Mezcla de cebadores VL - directo 4	
40	<400> 111	
	atgctgacgc ggccgcacct aggacgtca gtttgg	36
	<210> 112	
45	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
50	<223> cebador M13-Fwd	
	<400> 112	
	gtaaaacgac ggccagt	17
55	<210> 113	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	

	<220>		
	<223> cebador M13-Rev		
5	<400> 113 aacagctatg accatg 16		
	<210> 114 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial		
10			
	<220>		
	<223> cebador T7		
15	<400> 114 taatacgact cactatagg 19		
	<210> 115 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial		
20			
	<220>		
	<223> cebador SP6		
25	<400> 115 gatttaggtg aactatag 19		
	<210> 116 <211> 540 <212> ADN <213> Homo sapiens		
30			
	<400> 116 ctaaaaggac aggagtttgc accttcacat cagcaagttt atgcacctct tagagcagac 60		
	ggagataagc caagggcaca cctgacagtt gtgagacaaa ctccacaca gcactttaa 120		
	aatcagttcc cagctctgca ctgggaacat gaactaggcc tggccttcac caagaaccga 180		
	atgaactata ccaacaaatt cctgctgac ccagagtcgg gagactactt catttactcc 240		
	caggtcacat tccgtgggat gacctctgag tgcagtgaat tcagacaagc aggccgacca 300		
	aacaagccag actccatcac tgtggtcatc accaaggtaa cagacagcta ccctgagcca 360		
	acccagctcc tcatggggac caagtctgta tgcgaagtag gtagcaactg gttccagccc 420		
	atctacctcg gagccatgtt ctctctgcaa gaaggggaca agctaattgt gaacgtcagt 480		
35	gacatctctt tgggtggatta cacaaaagaa gataaaacct tctttggagc cttcttacta 540		
	<210> 117 <211> 1293 <212> ADN <213> artificial		
40			
	<220>		
	<223> construcción de expresión de fusión Fc de TL1A		

<400> 117
atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg atccaccggc 60
ctaaaaggac aggagtttgc accttcacat cagcaagttt atgcacctct tagagcagac 120
ggagataagc caagggcaca cctgacagtt gtgagacaaa ctccacaca gcactttaaa 180
aatcagttcc cagctctgca ctgggaacat gaactaggcc tggccttcac caagaaccga 240
atgaactata ccaacaaatt cctgctgata ccagagtcgg gagactactt catttactcc 300
caggtcacat tccgtgggat gacctctgag tgcagtgaat tcagacaagc aggccgacca 360
aacaagccag actccatcac tgtggtcatc accaaggtaa cagacagcta ccctgagcca 420
acccagctcc tcatggggac caagtctgta tgcaagtag gtagcaactg gttccagccc 480
atctacctcg gagccatggt ctcttgcaa gaaggggaca agctaattgt gaacgtcagt 540
gacatctctt tgggtggatta caaaaagaa gataaaacct tctttggagc cttcttacta 600
caagcttctg gtggtaccca cacctgcccc cctgccccg cccctgagct gctgggcgga 660
cccagcgtgt tctgttcccc cccaagccc aaggacacc tgatgatcag ccggaccccc 720
gaggtgacct gcgtgggtgt ggacgtgagc cagcaggacc ctgaggtgaa gttcaattgg 780
tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc cccgggagga gcagtacaac 840
tccacctacc ggtgtgtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag 900
gaatacaagt gcaaggtgtc caacaaggcc ctgcctgcc ccatcgaaaa gaccatcagc 960
aaggccaagg gccagcccag ggagccccag gtgtacacc tgccccccag ccgggaggag 1020
atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgc ctggtgaagg gcttctacct cagcgacatc 1080
gccgtggagt ggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccctgtg 1140
ctggacagcg acggcagctt cttcctgtac agcaagctga ccgtggacaa gagcaggtgg 1200
cagcagggca acgtgttcag ctgcagcgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 1260
cagaagagcc tgagcctgtc ccccggaag tga 1293

5

<210> 118
<211> 618
<212> ADN
<213> artificial

10

<220>
<223> TL1A secretado con etiqueta his N-terminal
<400> 118

ES 2 689 080 T3

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg atccaccggc 60
catcaccatc atcaccatct aaaaggacag gagtttgac cttcacatca gcaagtttat 120
gcacctctta gacgagacgg agataagcca agggcacacc tgacagttgt gagacaaact 180
cccacacagc actttaaaaa tcagttccca gctctgcact gggaacatga actaggcctg 240
gccttcacca agaaccgaat gaactatacc aacaaattcc tgctgatccc agagtcggga 300
gactacttca tttactccca ggtcacatcc cgtgggatga cctctgagtg cagtgaatc 360
agacaagcag gccgaccaa caagccagac tccatcactg tggatcac caagtaaca 420
gacagctacc ctgagccaac ccagctcctc atggggacca agtctgtatg cgaagtaggt 480
agcaactggt tccagcccat ctacctcgga gccatgttct ccttgcaaga aggggacaag 540
ctaactggtga acgtcagtga catctctttg gtggattaca caaaagaaga taaaaccttc 600
tttgagcct tcttacta 618

<210> 119

<211> 38

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador GlnPr994

<400> 119

gttcaggat ccaccggcct aaaaggacag gagttgc 38

<210> 120

<211> 33

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador GlnPr995

<400> 120

caccagaagc tttagtaag aaggctcaa aga 33

<210> 121

<211> 70

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador GlnPr1542

<400> 121

ctgctgctct gggttccagg atccaccggc caccatcatc atcaccatct aaaaggacag 60

gagtttgac

70

<210> 122

<211> 36

<212> ADN

<213> Artificial

	<220>		
	<223>	Cebador GlnPr1543	
5	<400>	122	
		gatcctcgag ctattatagt aagaaggctc caaaga	36
	<210>	123	
	<211>	70	
10	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador GlnPr1544	
15	<400>	123	
		gatkgttagt caccatggag acagacacac tcctgctatg ggtactgctg ctctgggttc	60
		caggatccac	70
	<210>	124	
20	<211>	448	
	<212>	PRT	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
25	<223>	cadena pesada con bisagra de IgG4 de dominio variable VH5 estabilizada	
	<400>	124	
	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
	1 5 10 15		
	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser		
	20 25 30		

ES 2 689 080 T3

Trp	Met	His	Trp	Ala	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	35	40	45
Gly	Glu	Ile	His	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	50	55	60
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75
Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95
Ala	Arg	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Tyr	Val	Ser	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	100	105	110
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	115	120	125
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	130	135	140
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	145	150	155
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	165	170	175
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	180	185	190
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	195	200	205
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	210	215	220
Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	225	230	235
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	245	250	255
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	260	265	270
Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala			

ES 2 689 080 T3

275		280		285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val				
290		295		300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr				
305		310		315
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr				
		325		330
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu				
		340		345
Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys				
		355		360
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser				
		370		375
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp				
385		390		395
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser				
		405		410
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala				
		420		425
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys				
		435		440
				445

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a TL1A humano, murino, de rata y de cynomolgus que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, y una CDR3 de pesada cadena que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53; y que comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54, una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55, y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56.
2. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo murino, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.
3. El anticuerpo o fragmento del mismo de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o que es al menos un 80 % idéntica a la región no CDR de la secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 1.
4. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una secuencia de la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 26, 27, 28 y 29 o que es al menos un 80 % idéntica a la región no CDR de la secuencia de región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 26, 27, 28 y 29.
5. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 21, 22, 23 y 24 o que es al menos un 80 % idéntica a la región no CDR de la secuencia de región variable de cadena pesada de la secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 21, 22, 23 y 24.
6. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región marco variable de cadena pesada que es el producto o derivado de un gen humano seleccionado del grupo que consiste en IGHV1-2*02 (SEQ ID NO: 3), IGHV1-2*04 (SEQ ID NO: 4), IGHV1-2*05 (SEQ ID NO: 5), IGHV1-2*01 (SEQ ID NO: 6), e IGHV1-46*01 (SEQ ID NO: 7).
7. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 3, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y en el que la región marco variable de cadena pesada comprende al menos una modificación de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en 37, 48, 50, 67, 69, 71 y 75, en el que la posición de aminoácidos de cada miembro grupo se indica de acuerdo con la numeración de Kabat de la región marco variable de cadena pesada correspondiente de un anticuerpo murino correspondiente.
8. El anticuerpo o fragmento del mismo de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
9. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 17 y 25, o comprende una región no CDR que es al menos un 80 % idéntica a la región no CDR de la secuencia de región variable de cadena ligera de la secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 17 y 25.
10. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región marco variable de cadena ligera que es el producto o derivado de un gen humano seleccionado del grupo que consiste en IGKV1-33*01 (SEQ ID NO: 8), IGKV1D-33*01 (SEQ ID NO: 9), IGKV1D-12*02 (SEQ ID NO: 10), IGKV1D-12*01 (SEQ ID NO: 11) e IGKV1-12*02 (SEQ ID NO: 12).
11. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende:

- (a) una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 24; y
- (b) una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o

5

en donde el anticuerpo o fragmento del mismo comprende:

- (a) una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 o SEQ ID NO: 29; y

10

- (b) una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

12. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo se une a hTL1A e inhibe la interacción de hTL1A tanto con DR3 como con DcR3.

15

13. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo se une a TL1A humano con una afinidad (K_D) de 700 pM o menos.

14. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el anticuerpo tiene una temperatura de termoestabilidad de fragmento FAB superior a 80 °C.

20

15. Una composición que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25

16. Un inmunocóncugado que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 unido a un agente terapéutico.

17. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para su uso como un medicamento.

30

18. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16 para su uso en el tratamiento de un trastorno mediado por TL1A seleccionado del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), incluyendo colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, EM, diabetes tipo 1 y tipo 2, psoriasis, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, dermatitis atópica; reacciones o afecciones alérgicas, incluyendo, por ejemplo, asma e inflamación alérgica del pulmón; cánceres, arteriosclerosis, infecciones, enfermedades neurodegenerativas, rechazo de injerto, enfermedades de injerto contra huésped (GVHD) y trastornos/enfermedades cardiovasculares.

35

FIG. 1

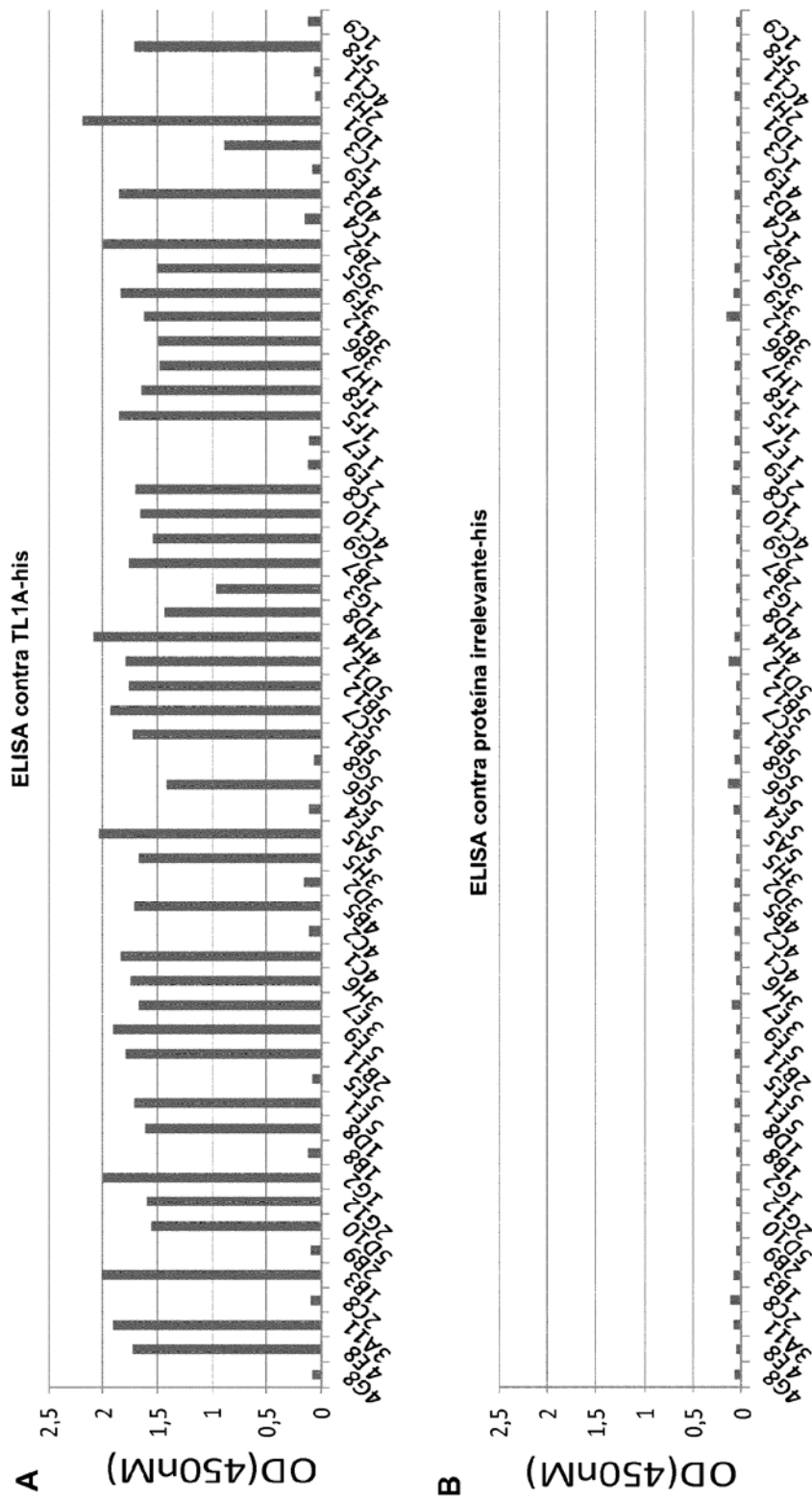


FIG. 2

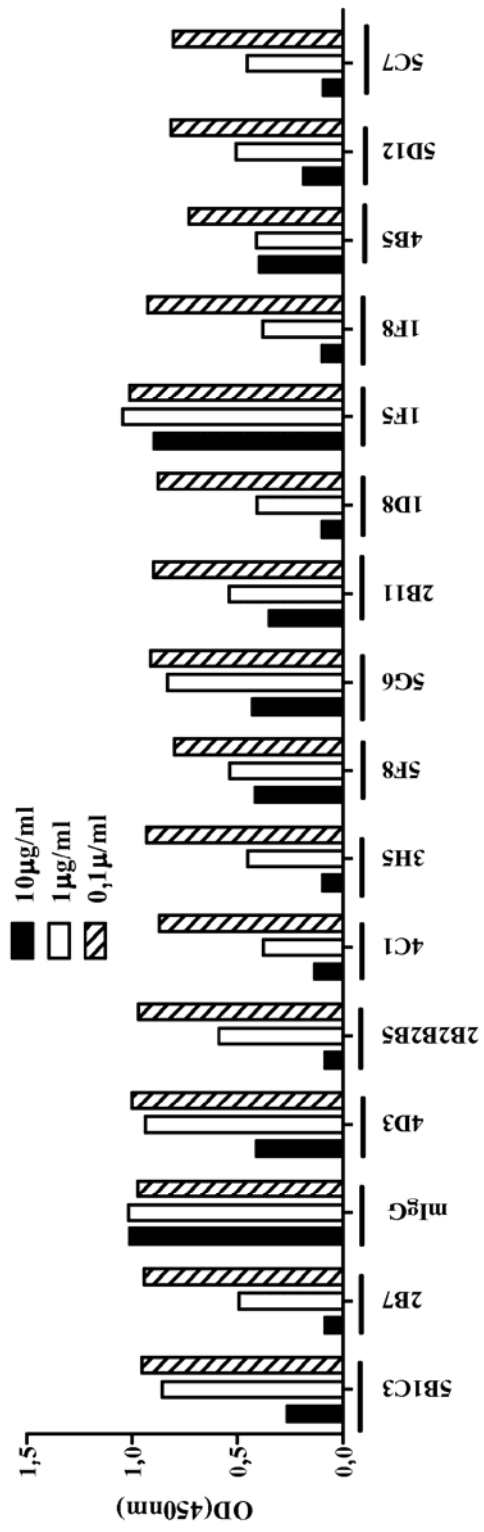


FIG. 3

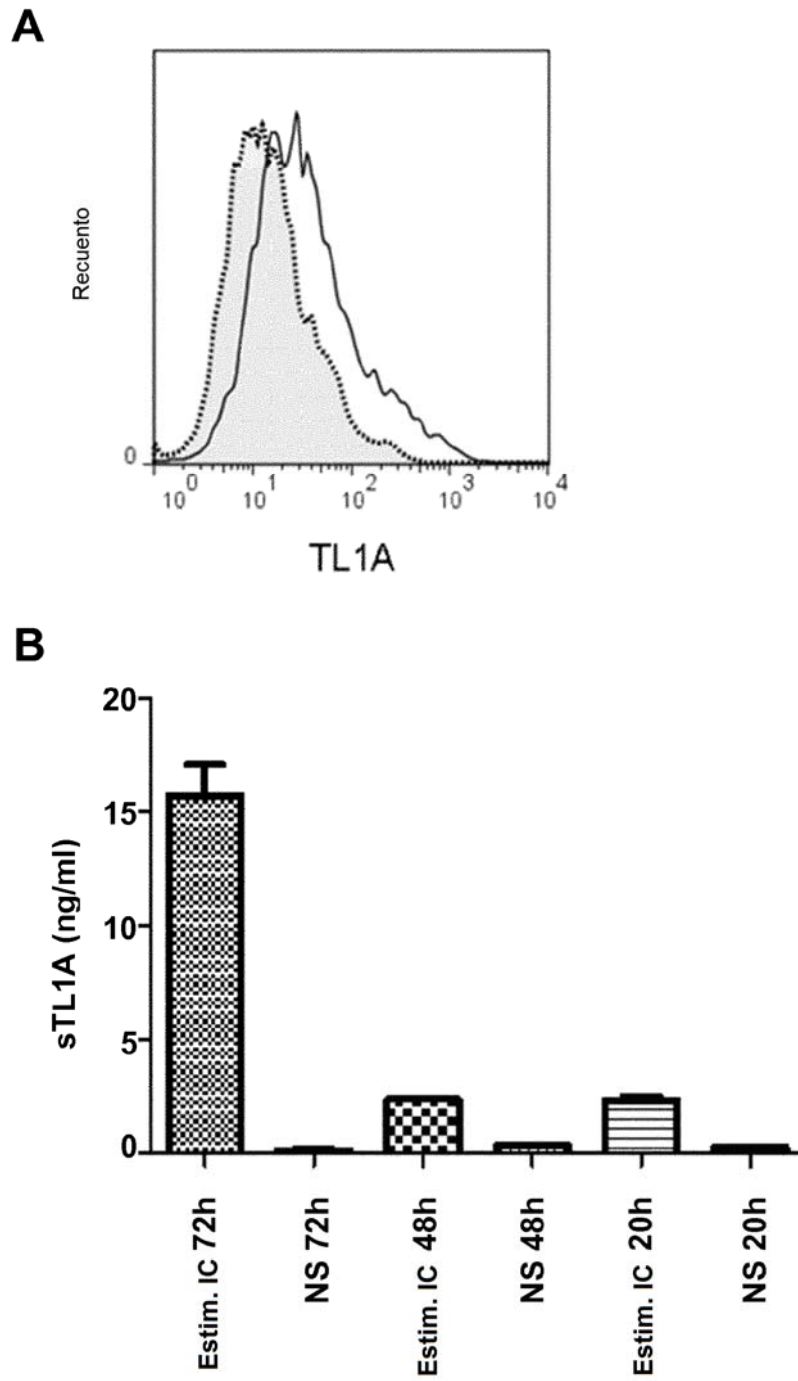
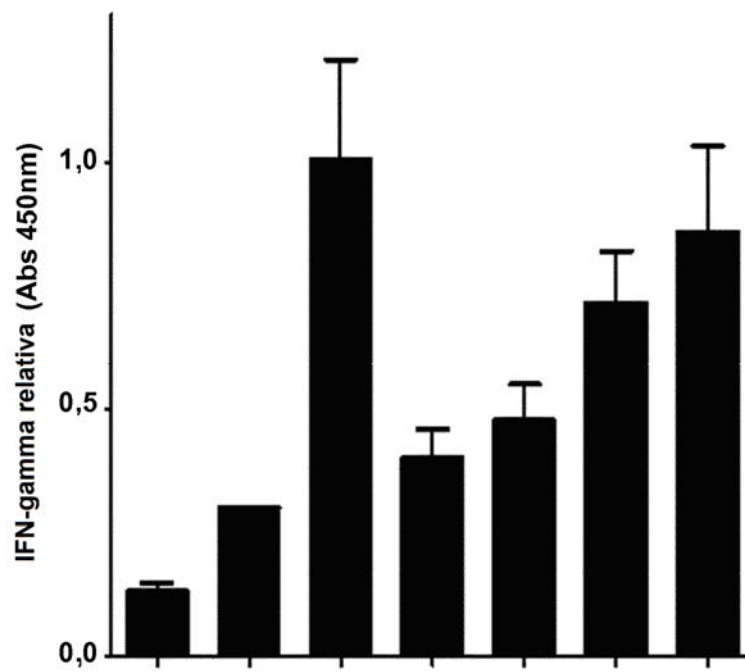


FIG. 3 cont.

C

IL-12 + IL18	-	+	+	+	+	+	+
Monocitos IC	-	-	+	+	+	+	+
5G6 (µg/ml)	-	-	-	10	1	0,1	-
Control de isotipo	-	-	-	-	-	-	+

FIG. 4

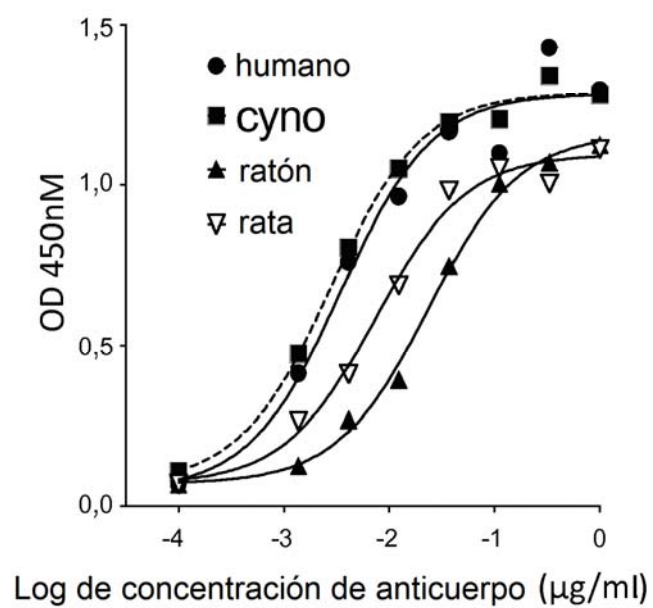


FIG. 5

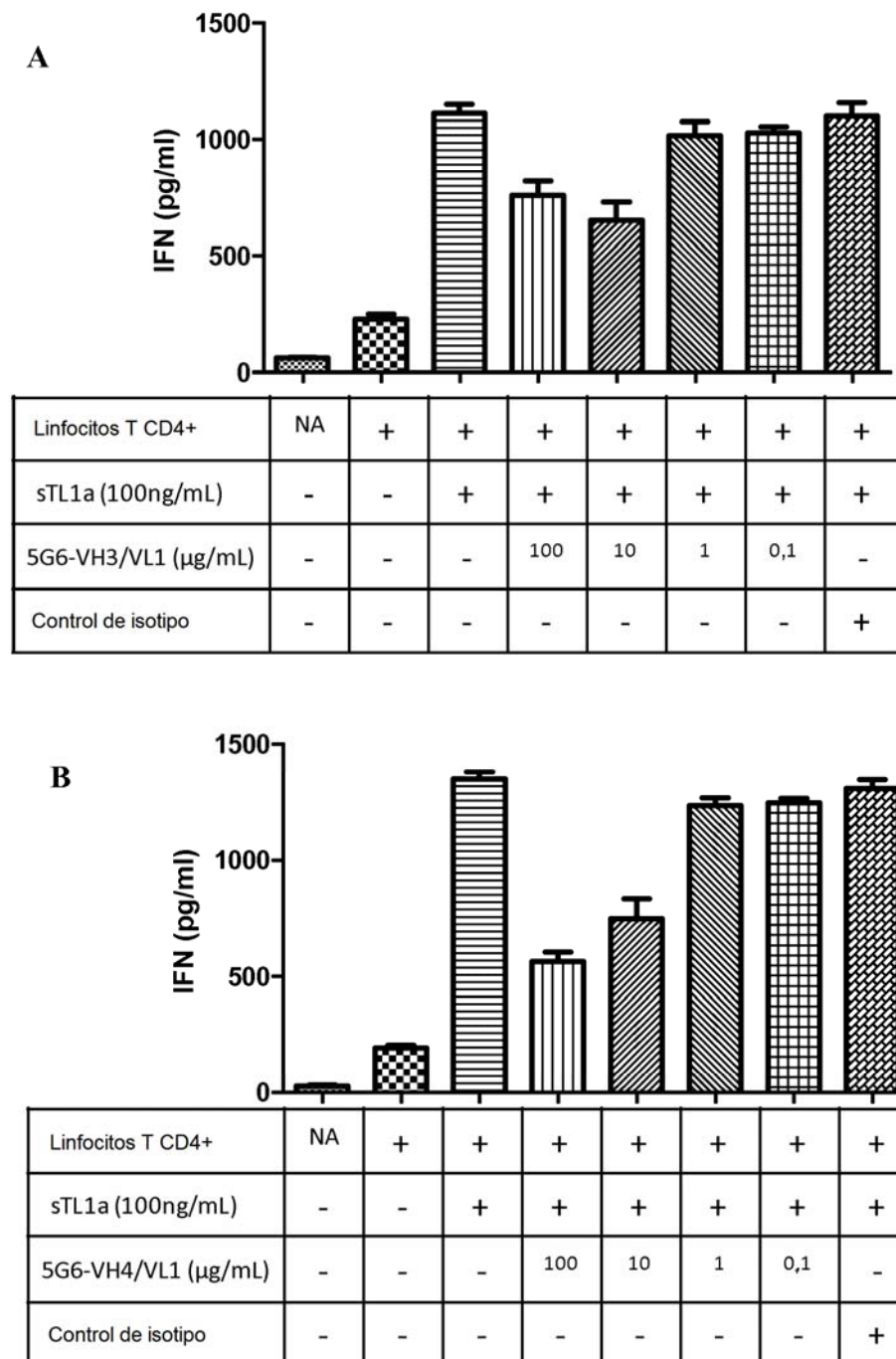
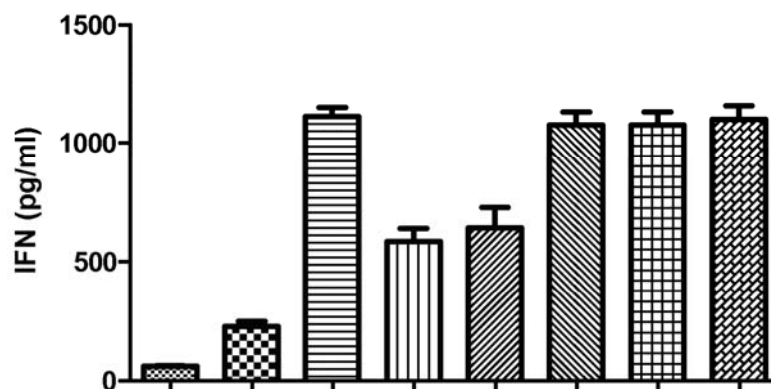


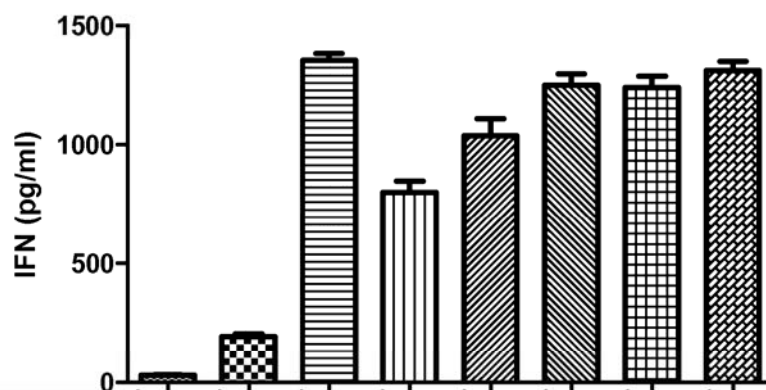
FIG. 5 cont.

C



Linfocitos T CD4+	NA	+	+	+	+	+	+	+
sTL1a (100ng/mL)	-	-	+	+	+	+	+	+
5G6-VH5/VL1 (μg/mL)	-	-	-	100	10	1	0,1	-
Control de isotipo	-	-	-	-	-	-	-	+

D



Linfocitos T CD4+	NA	+	+	+	+	+	+	+
sTL1a (100ng/mL)	-	-	+	+	+	+	+	+
5G6-VH2/VL2 (μg/mL)	-	-	-	100	10	1	0,1	-
Control de isotipo	-	-	-	-	-	-	-	+

FIG. 6

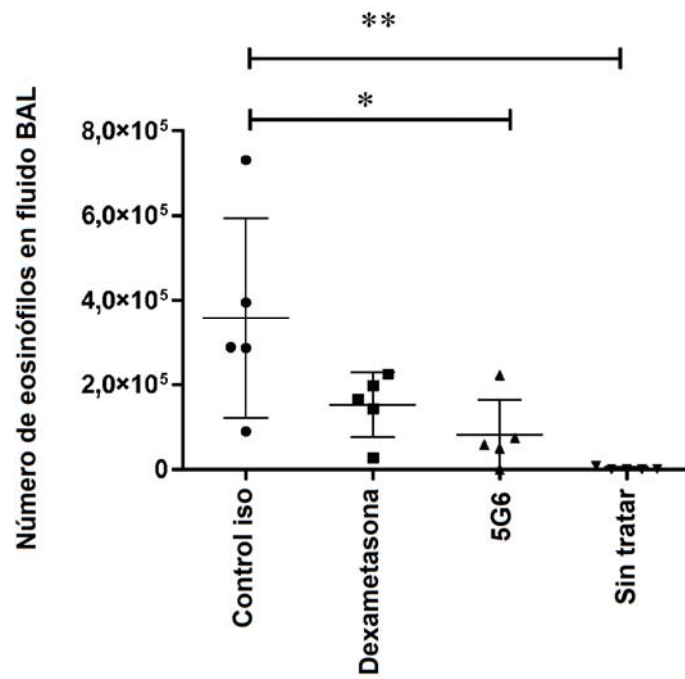


FIG. 7

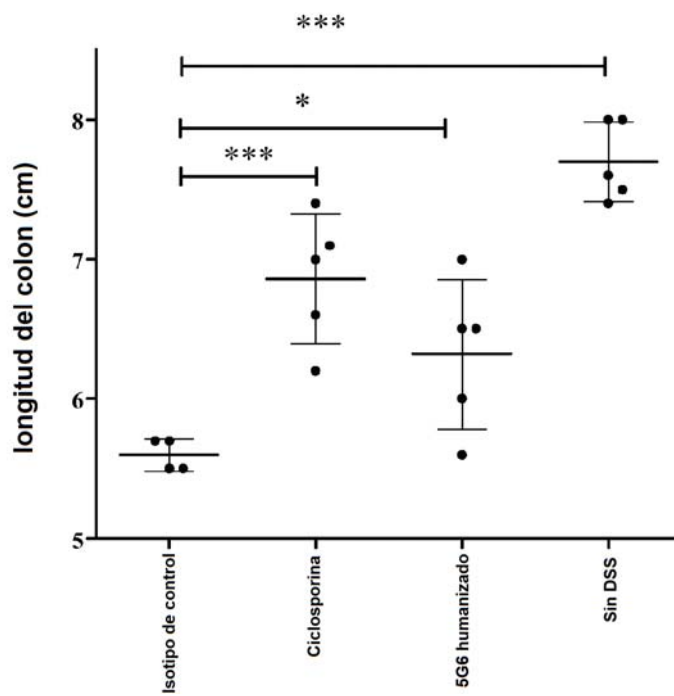


FIG. 8

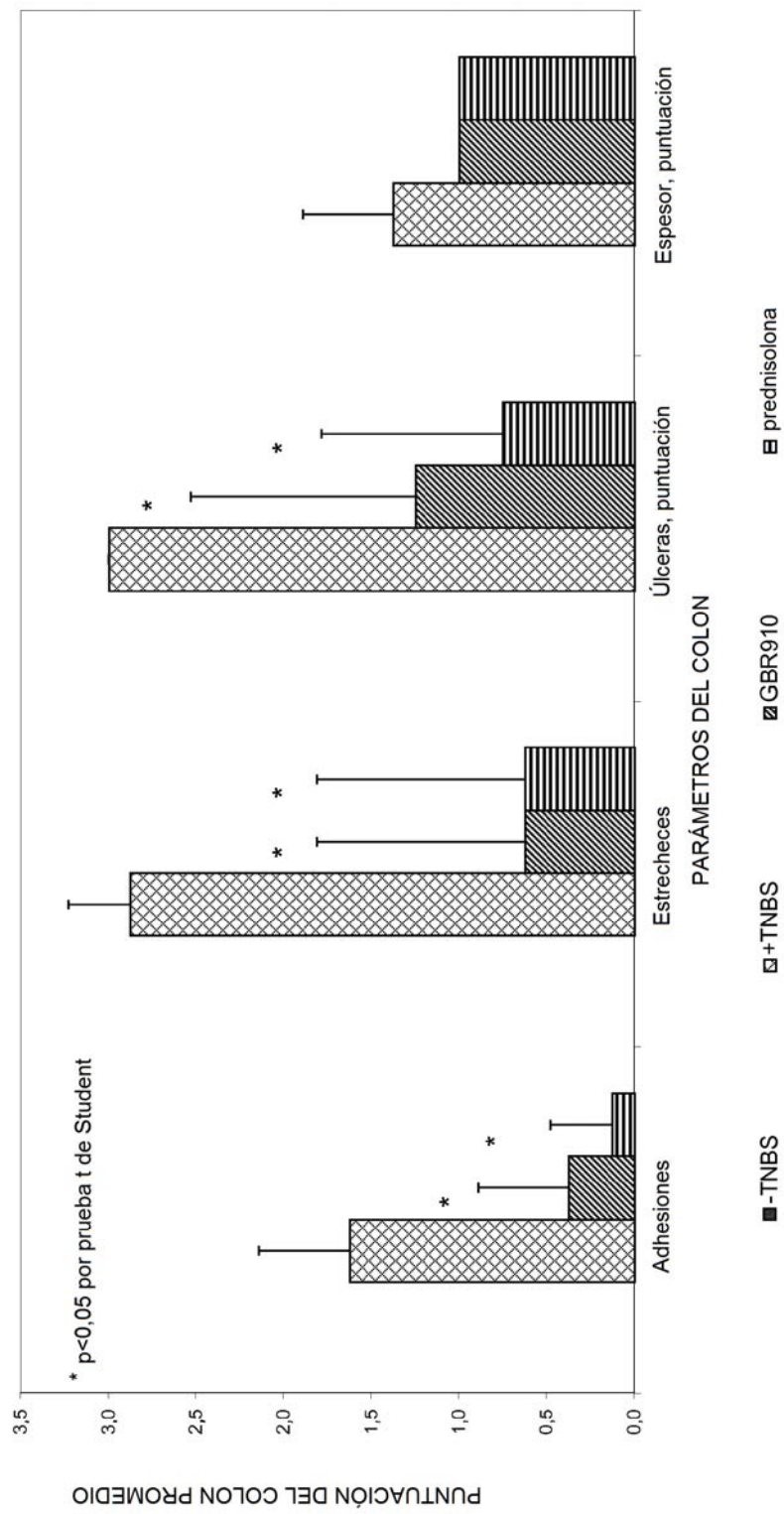


FIG. 9

